

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Zoologie



Mgr. Pavel Just

Syntéza taxonomických metod pro výzkum diverzity pavoukovců

Assessing diversity of arachnids: synthesis of taxonomical methods

DISERTAČNÍ PRÁCE

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. František Štáhlavský, Ph.D.

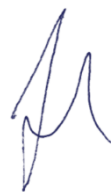
Konzultant: RNDr. Věra Opatová, Ph.D.

Praha, 2024

Prohlášení

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

V Praze, 26.10. 2024

A handwritten signature in blue ink, consisting of a stylized 'P' followed by a cursive 'J' and 'U'.

Mgr. Pavel Just

Poděkování

Rád bych na tomto místě poděkoval kolegům, kamarádům a všem, bez kterých by tato disertační práce nikdy nevznikla.

Velký dík patří mým školitelům Františkovi Štáhlavskému a Věře Opatové, kteří mě odborně vedli a trpělivě mě podporovali celá ta dlouhá léta mého doktorského studia, a kteří mě naučili vážit si správně voňavé hrabanky a dobře fixované tkáně.

Rodině děkuji za neúnavnou podporu, zázemí, a důvěru v mé schopnosti. Jsem vděčný za to, že mí rodiče vždy měli dostatek pochopení a tolerance pro tak obskurní zálibu, jako jsou pavoukovci.

Děkuji Petrovi Dolejšovi, že mě vedl při prvních krocích na arachnologické dráze, a Frantovi Kovaříkovi, že mi pomohl nahlédnout do fascinujícího světa štírů.

Velké poděkování patří Janě Štundlové, Matymu Hiřmanovi, Markovi Jankáskovi a Kubovi Kadlecovi; jejichž bezbřehé množství toho nejvytříbenějšího humoru mě neustále oblažuje a drží ve střehu.

Děkuji všem, kteří mi poskytli materiál, a každému, s kým jsem měl možnost otáčet kameny, probírat prosevy, a po nocích pobíhat s UV lampou na všech těch krásných, podivných, či rovnou děsivých místech. Bylo vás opravdu hodně!

Zvláštní poděkování zasluhují všichni osminozí živočichové, kteří mou rukou nedobrovolně položili svůj život na oltář vědy.

Prohlášení o podílu na publikacích

- I. Just, P., Opatova, V., & Dolejš, P. (2019). Does reproductive behaviour reflect phylogenetic relationships? An example from Central European *Alopecosa* wolf spiders (Araneae: Lycosidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 185(4), 1039-1056.

Podíl P. Justa: sběr materiálu, etologické pokusy, laboratorní práce, analýza dat (etologických i molekulárních), sepisování rukopisu a korekce, korespondence s editorem a recenzenty.



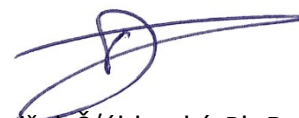
RNDr. Věra Opatová, Ph.D.

- II. Štáhlavský, F., Forman, M., Just, P., Denič, F., Haddad, C. R., & Opatova, V. (2020). Cytogenetics of entelegyne spiders (Arachnida, Araneae) from southern Africa. *Comparative Cytogenetics*, 14(1), 107.

Podíl P. Justa: sběr materiálu, laboratorní práce a zpracování chromozomových preparátů, úprava rukopisu.



RNDr. Věra Opatová, Ph.D.



RNDr. František Štáhlavský, Ph.D.

- III. Štáhlavský, F., Opatova, V., Just, P., Lotz, L. N., & Haddad, C. R. (2018). Molecular technique reveals high variability of 18S rDNA distribution in harvestmen (Opiliones, Phalangiidae) from South Africa. *Comparative Cytogenetics*, 12(1), 41.

Podíl P. Justa: sběr materiálu, laboratorní práce a zpracování chromozomových preparátů, FISH, úprava rukopisu.



RNDr. Věra Opatová, Ph.D.



RNDr. František Štáhlavský, Ph.D.

- IV. Šťáhlavský, F., Nguyen, P., Sadílek, D., Štundlová, J., Just, P., Haddad, C. R., Koç, H., Ranawana, K.B., Stockmann, M., Yağmur, E.A., & Kovařík, F. (2020). Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of buthid scorpions (Chelicerata: Arachnida). *Biological Journal of the Linnean Society*, 131(3), 547-565.

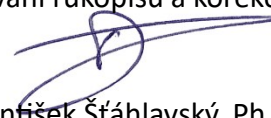
Podíl P. Justa: sběr materiálu, laboratorní práce, zpracování chromozomových preparátů, FISH, analýza dat, úprava rukopisu.



RNDr. František Šťáhlavský, Ph.D.

- V. Just, P., Šťáhlavský, F., Kovařík, F., & Štundlová, J. (2022). Tracking the trends of karyotype differentiation in the phylogenetic context of *Gint*, a scorpion genus endemic to the Horn of Africa (Scorpiones: Buthidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 196(2), 885-901.

Podíl P. Justa: sběr materiálu, laboratorní práce (příprava chromozomových preparátů, FISH, izolace DNA, PCR), analýza dat, sepisování rukopisu a korekce.



RNDr. František Šťáhlavský, Ph.D.

- VI. Just, P., Šťáhlavský, F., Bogusch, P., Astapenkova, A., & Opatova, V. (2023). Dispersal capabilities do not parallel ecology and cryptic speciation in European Cheliferidae pseudoscorpions (Pseudoscorpiones: Cheliferidae). *Diversity*, 15(10), 1040.

Podíl P. Justa: sběr materiálu, laboratorní práce, analýza dat, sepisování rukopisu a korekce.



RNDr. Věra Opatová, Ph.D.



RNDr. František Šťáhlavský, Ph.D.

Abstrakt

Pavoukovci (Arachnida) jsou starobylou, druhově bohatou a ekologicky a morfologicky diverzifikovanou skupinou, jejíž taxonomie je založena primárně na morfologických znacích. Častá morfologická stáze u pavoukovců v kombinaci s omezenou znalostí vnitrodruhové variability morfologických znaků často komplikuje správnou identifikaci druhů a stanovení druhových hranic. Zapojení jiných, než tradičních morfologických přístupů, ale naznačuje, že popsaná druhová diverzita je oproti té skutečné značně podhodnocená. Disertační práce se zaměřuje na posouzení variability vybraných charakteristik různých skupin pavoukovců (Araneae, Opiliones, Scorpiones, Pseudoscorpiones) za využití etologických, cytogenetických a molekulárně fylogenetických metod. V evolučním kontextu byla i) porovnávána variabilita reprodukčního chování slíďáků rodu *Alopecosa*, ii) karyotypová diferenciaci u štírů čeledi Buthidae, a iii) posouzen vliv disperze na speciaci štírků čeledi Cheliferidae. Zároveň byla popsána mezidruhová variabilita cytogenetických charakteristik entelegynních pavouků a sekáčů čeledi Phalangiidae. Výsledky přinesly nový vhled do porozumění druhové diverzity a evoluce jednotlivých skupin a potvrzují nutnost integrace dalších metod doplňujících morfologický přístup při delimitaci druhů a jejich klasifikaci.

Klíčová slova

Delimitace druhů, DNA barcoding, epigamní chování, FISH, forezie, karyotypová evoluce.

Abstract

Arachnids (Arachnida) represent an ancient and specious group, diversified both ecologically and morphologically. Their taxonomy is primarily based on morphological characters; however, commonly present morphological stasis combined with our limited understanding of intraspecific variability, often complicates the species identification as well as delimitation of species boundaries. Implementation of other than traditional morphological approaches suggests that the described diversity is significantly underestimated compared to the real one. The present dissertation thesis evaluates variability of selected characteristics among different arachnid groups (Araneae, Opiliones, Scorpiones, Pseudoscorpiones) by implementing ethologic, cytogenetic and molecular phylogenetic approaches. Evolutionary frame work was used to i) compare courtship behavior variability within the wolf spider genus *Alopecosa*, ii) infer the karyotype differentiation in scorpions of the family Buthidae, and iii) evaluate the effect of dispersal capability on speciation in Cheliferidae pseudoscorpions. Likewise, interspecific variability of cytogenetic characteristics was described for entelegyne spiders and harvestmen from the family Phalangiidae. The results brought new insights into our understanding of the evolution and species diversity of each group and corroborate the necessity of integration of additional methods complementing the morphological approach in classification and species delimitation.

Key words

Courtship behavior, DNA barcoding, FISH, karyotype evolution, phoresy, species delimitation.

Obsah

1. Seznam publikací zahrnutých do disertační práce	1
2. Úvod	2
2.1. Koncept druhu	2
2.2. Pavoukovci	3
2.3. Metody využívané pro delimitaci druhů	5
2.3.1. Morfologie	6
2.3.2. Cytogenetika	6
2.3.3. Molekulární metody	8
2.3.4. Reprodukční chování	10
2.3.5. Integrativní taxonomie	11
3. Cíle	12
4. Výsledky práce v kontextu současného poznání	13
4.1. Reprodukční chování, jeho evoluce a využitelnost pro determinaci druhů	13
4.2. Evoluce karyotypů a karyotypová diverzita	17
4.2.1. Organizace genomu u pavoukovců	17
4.2.2. Molekulárně cytogenetické metody	18
4.2.3. Pohlavní chromozomy	19
4.2.4. Karyotypová variabilita pavouků (Araneae)	20
4.2.5. Karyotypové charakteristiky sekáčů	23
4.2.6. Karyotypová diferenciaci u štírů čeledi Buthidae	25
4.3. Molekulární delimitační přístupy	28
5. Shrnutí a závěr	31
6. Seznam literatury	32
7. Příloha: publikace zařazené do disertační práce	47
7.1. Článek I	48
7.2. Článek II	67
7.3. Článek III	100
7.4. Článek IV	120
7.5. Článek V	140
7.6. Článek VI	158

1. Seznam publikací zahrnutých do disertační práce

- I. Just, P., Opatova, V., & Dolejš, P. (2019). Does reproductive behaviour reflect phylogenetic relationships? An example from Central European *Alopecosa* wolf spiders (Araneae: Lycosidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 185(4), 1039-1056.
- II. Šťáhlavský, F., Forman, M., Just, P., Denič, F., Haddad, C. R., & Opatova, V. (2020). Cytogenetics of entelegyne spiders (Arachnida, Araneae) from southern Africa. *Comparative Cytogenetics*, 14(1), 107.
- III. Šťáhlavský, F., Opatova, V., Just, P., Lotz, L. N., & Haddad, C. R. (2018). Molecular technique reveals high variability of 18S rDNA distribution in harvestmen (Opiliones, Phalangiidae) from South Africa. *Comparative Cytogenetics*, 12(1), 41.
- IV. Šťáhlavský, F., Nguyen, P., Sadílek, D., Štundlová, J., Just, P., Haddad, C. R., Koç, H., Ranawana, K.B., Stockmann, M., Yağmur, E.A., & Kovařík, F. (2020). Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of buthid scorpions (Chelicerata: Arachnida). *Biological Journal of the Linnean Society*, 131(3), 547-565.
- V. Just, P., Šťáhlavský, F., Kovařík, F., & Štundlová, J. (2022). Tracking the trends of karyotype differentiation in the phylogenetic context of *Gint*, a scorpion genus endemic to the Horn of Africa (Scorpiones: Buthidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 196(2), 885-901.
- VI. Just, P., Šťáhlavský, F., Bogusch, P., Astapenkova, A., & Opatova, V. (2023). Dispersal capabilities do not parallel ecology and cryptic speciation in European Cheliferidae pseudoscorpions (Pseudoscorpiones: Cheliferidae). *Diversity*, 15(10), 1040.

V průběhu řešení doktorského projektu jsem se spoluautorsky podílel i na dalších, převážně taxonomických článcích s přesahem do cytogenetiky studovaných druhů. Tyto studie nejsou přímo přiloženy k této disertační práci, ale v textu jsou jejich citace označené podtržením.

2. Úvod

Schopnost přesně identifikovat a odlišovat živočišné druhy hraje klíčovou roli ve zkoumání biologické rozmanitosti a pro člověka má zásadní přesah i do oblastí mimo základní vědecký výzkum (Hey, 2009). V medicíně je nezbytné správné identifikování parazitů a patogenů, což má zásadní vliv na diagnostiku a léčbu infekčních onemocnění (Crites, 1962), v zemědělství určujeme druhy škůdců a tím zvyšujeme účinnost ochrany (Ali et al., 2021) a v ochraně přírody pak rozpoznávání jednotlivých druhů umožňuje aktivně přispívat k udržení biodiverzity (Frankham et al., 2012).

2.1. Koncept druhu

Druhy jsou základními jednotkami biodiverzity a hlavní výsledky evolučních procesů. Přesto je koncept druhu neustálým předmětem diskuzí (Dayrat, 2005; De Queiroz, 2005b, 2005a, 2007, 2011; Naomi, 2011; Sites & Marshall, 2003). Definice druhu prochází v průběhu historie mnoha změnami; existují desítky konceptů, které se liší v tom, jaké aspekty diverzity a evoluce považují za zásadní. Mnohé z těchto konceptů a s nimi spojené definice jsou vzájemně nekompatibilní, což znamená, že mohou vést k odlišným závěrům ohledně hranic a počtů druhů v závislosti na použitém metodologickém rámci (De Queiroz, 2007). Například ekologicky založené koncepty druhu se soustředí na rozdíly v nikách studovaných organismů (Van Valen, 1976), paleontologické koncepty jsou závislé na morfologických rozdílech (Miller, 2001), systematické přístupy kladou důraz na diagnostikovatelnost a monofylii (Nelson & Platnick, 1981), a pro populační genetiku a molekulární systematiku jsou zásadní genetické divergence (Baker & Bradley, 2006).

Klíčem k vyřešení problému různých názorů na pojetí druhu je najít společný prvek, unifikovanou definici druhu (unified species concept) (De Queiroz, 2005). Všechny současné koncepty druhu se shodují v myšlence, že druhy jsou odděleně se vyvíjejícími liniemi metapopulací či jejich částí. Současný převládající názor tedy pokládá za hlavní definující prvek druhu právě nezávislost evolučních linií a další alternativní koncepty druhu jsou považovány pouze za sekundární charakteristiky, čili druhy například nemusí nutně obývat rozdílné niky, nemusí být morfologicky diferenciovány, nebo nemusí mít rozdílné karyotypy (De Queiroz, 2005).

Nezávislost evolučních linií je typicky způsobena izolací linií v prostoru a čase, tj. druhy mezi sebou na genetické úrovni nekomunikují. To může být následkem alopatrické speciace, kdy jsou populace odděleny různými typy geografických bariér (Mallet, 2005). U takto nově vzniklých druhů, obzvlášť pokud jsou vázány na podobné biotopy, ale nemusí nutně existovat evoluční tlaky na morfologickou diferenciaci a dceřiné druhy vykazují morfologickou uniformitu, která však není v korelaci s genetickou diverzitou (Oliveira et al., 2011; Opatova et al., 2016). Morfologická uniformita však není vzácná ani u druhů, které se vyskytují sympatricky či syntopicky a osidlují podobné niky (Bezerra et al., 2020; Christophoryová et al., 2023). V takovém případě může jako reprodukční bariéra sloužit rozdílná sezonalita nebo jiné rozmnožovací období (Simon et al., 2022). U syntopických a synchronních druhů fungují jako efektivní reprodukční bariéra také rozdílné námluvy (Boumans & Johnsen, 2014).

Je však nutno si uvědomit, že zdaleka ne všichni živočichové jsou vizuálně orientovaní, a proto se ani mezi sebou nerozlišují na základě vizuálních vjemů, jako spíše na základě vjemů olfaktorických či seismických (Renou & Anton, 2020; Stritih-Peljhan et al., 2022). Z tohoto důvodu může být vnímání morfologické variability očima člověka poměrně zkreslené a vymezení druhů u morfologicky uniformních, či naopak morfologicky velmi variabilních živočichů je pak obzvlášť komplikované (Lukhtanov, 2019; Rohner & Moczek, 2020).

2.2. Pavoukovci

Jednou ze skupin, která skrývá velkou kryptickou diverzitu, jsou pavoukovci (Oh et al., 2022; Opatova et al., 2016). První pavoukovci (Arachnida) jsou datováni do kambria (před 485 miliony lety), a byli tak jednou z prvních skupin živočichů, která kolonizovala souš. Díky tomu mohli osídlit rozmanité volné niky a velmi rychle radiovat, takže recentní řády pavoukovců vznikly během relativně krátkého časového úseku a velmi dávno (před cca 450 miliony let), a po celou svojí historii si udržely v podstatě stejný vzhled (Lozano-Fernandez et al., 2020). To i v dnešní době komplikuje spolehlivé určení fylogenetických vztahů mezi jednotlivými řády, a to jak morfologickými, tak molekulárními přístupy (Sharma et al., 2014, 2021; Shultz, 1990).

V přírodě mají pavoukovci nezastupitelnou roli v potravních řetězcích, pro člověka ale jejich užitek nespočívá pouze v regulaci škůdců v zemědělství (Saba et al., 2020), ale jejich význam má přesah i do recentně velmi populárního výzkumu jedů a pavoučího vlákna (Bakhshandeh et al., 2021; Guo et al., 2023). Na druhou stranu je mezi pavoukovci řada medicínsky významných druhů, které způsobují zdravotní komplikace jedovatým kousnutím či bodnutím, indukci alergických reakcí a přenášením patogenů (Cabezas-Cruz, 2023; Regan et al., 2020; Squillace, 2020).

Pavoukovci jsou diverzifikovanou skupinou, čítající asi 115 000 druhů (Sullivan & Ozman-Sullivan, 2021; WAC, 2024). Osídlují širokou škálu převážně terestrických biotopů a jsou proto z ekologického hlediska velmi rozrůznění. Rozšíření taxonů je do určité míry dáno jejich schopností šíření a podle ní můžeme pavoukovce v zásadě rozdělit do dvou ekologických skupin – druhy s dobrou schopností šíření a druhy sedentérní (Cobbold & MacMahon, 2012). Například u pavouků se často setkáváme s mobilními druhy, a především „moderní“ entelegynní pavouci se zvládají efektivně šířit aeronauticky (tzv. ballooningem). Ze snovacích žláz totiž mohou vypustit pavučinové vlákno a nechávají se větrem unášet i na velké vzdálenosti, čímž osídlují i odlehlé oblasti jako jsou oceánské ostrovy (Lee et al., 2015; Weyman, 1993). Pravděpodobně díky takovým evolučním výhodám, jako jsou snovací činnost a zmenšení velikosti těla v souvislosti se změnou typu chelicer, jsou pavouci nejrozšířenější a s 52 000 druhy nejpočetnější skupinou pavoukovců. Dobře se šířící druhy mají zpravidla větší areály rozšíření a jejich populace nemusí vykazovat žádnou geografickou strukturu (Kuntner & Agnarsson, 2011). Oproti tomu sedentérní druhy, jako jsou například sklípkaní (Araneae: Mygalomorphae) nebo štírci osídlující půdu, mají obvykle velmi omezené schopnosti šíření, což je způsobeno jejich neschopností překonávat geografické bariéry, a silnou afinitou ke konkrétnímu mikrohabitatu (Wilson et al., 2023). Druhy s malou schopností disperze často vytváří izolované populace, které spolu po genetické stránce nekomunikují a mají proto vysoké tendence k endemismu (Opatova et al., 2016). Jsou však známy i organismy, které se svojí nízkou mobilitu naučily kompenzovat a k transportu využívají větší a mobilnější živočichy (Bartlow & Agosta, 2021). Tento jev nazýváme forezie a aplikují ho mimo jiné štírci žijící nejčastěji ve stromových dutinách a pod kůrou, ale také v tlejících zbytcích rostlin nebo dokonce v hrabance (Poinar et al., 1998). Takové druhy se musí vypořádat s tím, že jimi

osídlované habitaty jsou efemérní a čas od času musí vyhledávat nové, čehož však vlastními silami nejsou schopni a k šíření pak využívají různé druhy létajícího hmyzu (Poinar et al., 1998). Po stránce populačních struktur pak foretičtí štírci zpravidla vykazují obdobné vzorce, jako vysoce mobilní organismy (Pfeiler et al., 2009).

Vazba na podobné, úzce specifické podmínky, často kombinovaná s nízkou schopností disperze, vedou ke snížení genetického toku mezi jednotlivými populacemi, což následně podporuje vznik mikroendemismu (Hlebec et al., 2023; Muriene et al., 2010; Wilson et al., 2023). Tento proces, v kombinaci s ekologickou a fyzickou izolací, přispívá k morfologické stázi, kdy se jednotlivé druhy vyznačují velmi malými změnami ve své tělesné stavbě v průběhu času (Szudarek-Trepto et al., 2021). Stáze je dále posílena specifickým způsobem orientace a komunikace u těchto pavoukovců, která je založena především na chemických a mechanických signálech, jako jsou feromony, vibrace nebo doteky, spíše než na vizuálních podnětech (Walter & Bilde, 2015). V důsledku toho u těchto organismů nevzniká evoluční tlak na výraznou morfologickou diferenciaci, což znamená, že různé druhy mohou vypadat navenek velmi podobně, ačkoliv genetické divergence mezi těmito kryptickými druhy bývají značné (Christophoryová et al., 2023). Fenomén morfologické uniformity může být pro člověka, coby živočicha orientujícího se vizuálně, matoucí, protože druhy, které jsou geneticky odlišné, se mohou navenek jevit identicky. Nemusí však být způsobena pouze morfologickou stází, ale může být výsledkem nedávné divergence nebo konvergentní evoluce (Swift et al., 2016). Detailní genetické a molekulární analýzy často odhalují překvapivě hluboké evoluční rozdíly mezi těmito kryptickými druhy, což má zásadní význam pro pochopení evolučních procesů a biodiverzity (Christophoryová et al., 2023; Hedin, 2001).

2.3. Metody využívané pro delimitaci druhů

Proces delimitace druhu je založen na dvou klíčových prvcích. Prvním z nich je „discovery step“, který představuje fázi objevování potenciálně nových druhů (Carstens et al., 2013; Edwards & Knowles, 2014). Tento krok může být založen na analýze jakýchkoliv dat (morfologických, molekulárních...). Zde výrazně vstupují do hry různé koncepty druhu, na jejichž základě vytipujeme hypoteticky nové druhy. Následně nastupuje „verification step“, což představuje kritický proces ověřování identifikovaných druhů (Carstens et al.,

2013; Edwards & Knowles, 2014). V této fázi se využívají různé taxonomické metody a jejich kombinace, čímž můžeme potvrdit existenci nových druhů, ale také jejich zařazení do taxonomického rámce.

2.3.1. *Morfologie*

Morfologické charakteristiky byly po staletí základem taxonomie a poskytují historicky zakořeněný, každému přístupný a široce akceptovaný základ pro identifikaci druhů. Určité povědomí o tom, že různé druhy mohou mít různý vzhled, má každý, a tvar či struktura jsou často první znaky, které vůbec na daných organismech pozorujeme. Ve srovnání s jinými taxonomickými metodami je morfologie poměrně levná, a navíc morfologické znaky mohou být jedinými charakteristikami, které lze u některých organismů zkoumat – to se týká především fosilního materiálu, či starých a nevhodně skladovaných sbírkových kusů (Wandeler et al., 2007). Morfologická data pak mohou sloužit jako vstupní parametry do následných analýz, jako jsou morfometrie nebo geometrická morfometrie (Slice, 2007).

Současně ale klasická morfologie naráží na mnohá úskalí, jako jsou především časová náročnost a potřeba hlubokých znalostí o variabilitě znaků dané taxonomické skupiny. Variabilitu znaků lze z podstaty věci těžko posuzovat v případě, že máme k dispozici jen malé množství jedinců. To se zpravidla týká druhů skrytě žijících, vzácných a ohrožených (Opatova et al., 2024). Navzdory tomu, že nutnost znalosti variability znaků je ústředním tématem taxonomie, více než třetina recentních popisů pavoukovců je založena jen na jednom jedinci či jednom pohlaví (Bond et al., 2022). U pavoukovců navíc platí, že diagnostické morfologické znaky nesou obvykle jen dospělá stadia a určení juvenilních jedinců na základě morfologie je velmi složité až nemožné. Samostatnou kapitolou jsou potom konvergentní nebo morfologicky uniformní taxony, u nichž jsou morfologické analýzy pro posuzování diverzity prakticky nevyužitelné (Struck et al., 2018; Szudarek-Trepto et al., 2021).

2.3.2. *Cytogenetika*

Jedním z dalších možných metodických přístupů využitelných při delimitaci druhů je cytogenetická analýza, která se v taxonomii využívá především k vyhodnocování počtů

chromozomů a jejich morfologie. Chromozomová inkompatibilita totiž zpravidla funguje jako reprodukční bariéra (King 1993), která je obzvláště funkční u organismů s monocentrickými chromozomy, což jsou chromozomy s lokalizovanou centromerickou oblastí (Hooper et al., 2019). Oproti tomu organismy s holocentrickými chromozomy (ty, které mají kinetochor difúzní po celé délce chromozomu) se do určité míry s chromozomálními polymorfismy dovedou lépe vypořádat (Lukhtanov et al., 2018).

Klasickými cytogenetickými metodami lze získat základní informace o karyotypech, případně detekovat rozsáhlejší chromozomální přestavby a systémy chromozomového určení pohlaví (Král et al., 2006, 2013; Šťáhlavský et al., 2012). Detailnější molekulárně cytogenetické analýzy, využívající fluorescenčně značených sond (FISH – fluorescence *in situ* hybridization), dále umožňují sledovat změny v genomu na menší škále, což přináší další sadu znaků využitelnou v taxonomii a pro vymezení druhů (Taketa et al., 2001). Jedněmi z nejčastěji takto hodnocených úseků jsou klastry 18S rDNA, telomerické repetice, sekvence konkrétních genů, jako například histon H3, a mikrosatelity (Hashimoto et al., 2011; Šťáhlavský et al., 2018; Štundlová et al., 2022).

Při používání cytogenetických přístupů v taxonomii pavoukovců je nutné zohlednit, že některé skupiny mají konzervativní karyotypy. Takovým příkladem jsou některé čeledi entelegynních pavouků, u kterých má většina zástupců uniformní počet chromozomů (např. Gnaphosidae $2n = 22$, Lycosidae $2n = 28$, Salticidae $2n = 28$) (Araujo et al., 2024) a rody štírů čeledi Buthidae ze starého světa (*Androctonus* $2n = 24$, *Compsobuthus* $2n = 22$) (Schneider et al., 2024), u kterých tudíž není možné využít základní cytogenetické charakteristiky coby diagnostické znaky. Podobný problém se týká naopak i skupin s dynamickými karyotypy, u nichž je karyotypová diverzita patrná i na vnitrodruhové úrovni a v rámci jednoho druhu pozorujeme variabilitu v počtech chromozomů, chromozomových přestaveb i molekulárních markerů. Tento fenomén je patrný například u štírů čeledi Buthidae v rámci rodů *Tityus* ($2n = 5\text{--}32$, přičemž *T. bahiensis* $2n = 5\text{--}19$) nebo *Gint* ($2n = 18\text{--}45$, přičemž *G. dabakalo* $2n = 23\text{--}27$) (Schneider et al., 2009; Schneider et al. 2024).

Jedním z hlavních metodických úskalí cytogenetiky pavoukovců je potřeba živého materiálu ve správném reprodukčním stádiu. K posouzení morfologie chromozomů jsou u pavoukovců nejvhodnější meioticky dělící se jádra germinálních buněk, avšak

gametogeneze probíhá u této třídy často jen v určitých a poměrně úzkých obdobích (u samců pavouků např. těsně před posledním svlékáním), a záchyt jader v požadovaném stádiu buněčného dělení je proto založen z velké části na náhodě. Navíc kultivace buněk a aplikace cytostatik (např. kolchicinu), u obratlovců rutinně využívána k zastavení buněčného cyklu (Hsu & Pomerat, 1953), se u bezobratlých neřadí mezi zavedené metody. Dalším komplikujícím faktorem je, že u bezobratlých nelze využít konvenční techniky pruhování, které např. umožňují podrobněji identifikovat homologické chromozomy či jejich úseky. Moderní cytogenomické metody, ačkoliv jsou u jiných skupin organismů aplikovány již poměrně standardně (Rovatsos et al., 2024; Sassi et al., 2023), na rutinní využití u pavoukovců stále spíše čekají.

2.3.3. Molekulární metody

Během posledních let získal DNA barcoding, coby nejpřístupnější molekulární metoda, popularitu jako efektivní a dostupný nástroj pro determinaci vzorků a popisování diverzity (DeSalle & Goldstein, 2019; Yu et al., 2021). Veřejné databáze, jako je BOLD (Ratnasingham & Hebert, 2007) a GenBank (Benson et al., 2012), shromažďují velké množství barcodingových dat pro širokou škálu taxonů, což usnadňuje identifikaci vzorků prostřednictvím porovnání se známými referenčními sekvencemi (DeWaard et al., 2019a). Díky své rychlosti, nízkým nákladům a standardizaci nabízí DNA barcoding široké spektrum aplikací, které mají přesah do mnoha oblastí výzkumu. Co se týče identifikace vzorků, bývá používán v analýzách environmentální DNA (Schenk et al., 2020; Senapati et al., 2019), hodnocení regionální diverzity (DeWaard et al., 2019b; Lopez-Vaamonde et al., 2021), analýzách potravy a kořisti (Johnson et al., 2021; Unger et al., 2020), ale také ve forenzních analýzách a v ochraně přírody (Chang et al., 2021; Davidson-Watts et al., 2006; Delić et al., 2017; Neves et al., 2020; Sembiring et al., 2015), zemědělství (Madden et al., 2019), nebo lidské medicíně (Hoang et al., 2019). Podobně je také využíván pro identifikaci a přiřazení různých vývojových stadií, pohlaví nebo kast v rámci jednoho druhu (Alcántar-Escalera et al., 2013; Fisher & Smith, 2008; Grzywacz et al., 2021).

U živočichů je mitochondriální gen *cox1* (cytochrom c oxidáza 1) široce používán jako barcodová sekvence (Hebert et al., 2003a; Hebert et al., 2003b). Ta je také rutinně implementována pro hodnocení vnitrodruhové populační struktury a fylogenetické

inference, zejména když je doplněna sekvencemi jiných, zejména jaderných, genů (Hajibabaei et al., 2007). Mnoho studií o vymezení druhů spoléhá na *cox1* nebo jiná jednolokusová data v kroku „species discovery“ (detekce potenciálních druhů), pokud daný taxon nevykazuje snadno identifikovatelné morfologické rysy (Dupuis et al., 2012; Edwards & Knowles, 2014). Existence kryptických druhů (geneticky diferencovaných, ale morfologicky identických taxonů), byla pomocí dat z barcodingu zjištěna v mnoha nepříbuzných liniích živočichů, například u hlístic (Schenk et al., 2020), hmyzu (Hebert et al., 2003a; Smith et al., 2007), ryb (Hubert et al., 2008) nebo žab (Stuart et al., 2006). U pavoukovců je tento stav velmi běžný a v podstatě dokumentovaný ze všech řádů, byl zjištěn u roztočů (Pfingstl et al., 2021), bičovců (Reveillion et al., 2020), sekáčů (Schönhofer & Martens, 2010), pavouků (Starrett & Hedin, 2007), štírů (Parmakelis et al., 2013), solifug (Garcia et al., 2024), roztočovců (Sato et al., 2024), bičnatců, krátkochlostů, štírenek (Clouse et al., 2017) a štírků (Muster et al., 2021; Ohira et al., 2018).

2.3.3.1. Delimitační metody založené na sekvenčních datech

Jako první krok v delimitaci druhů bývají v posledních letech rutinně využívány molekulární delimitační metody, založené na sekvenčních datech z jednoho nebo více lokusů (Hlebec et al., 2023; Xu et al., 2020). V zásadě lze tyto metody rozdělit do dvou hlavních kategorií, a to na distanční (distance based), a na ty využívající jako podklad fylogenetické stromy (tree based) (Fontaneto et al., 2015). Distanční metody, které aplikují například programy ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery) (Puillandre et al., 2012), ASAP (Assemble Species by Automatic Partitioning) (Puillandre et al., 2021) nebo TCS (Clement et al., 2000), nepracují na základě fylogenetických stromů, nýbrž k sortování vzorků do předpokládaných (putative) druhů využívají rozdíly v genetických distancích. Obecně platí, že genetické distance mezi jedinci jednoho druhu jsou menší, než mezi jedinci různých druhů. Oproti tomu tree-based metody, jako například PTP (Poisson Tree Process) (Zhang et al., 2013) a GMYC (General Mixed Yule Coalescent) (Pons et al., 2006) v topologii detekují přechody mezi vnitropopulačními mechanismy a speciací.

Výsledky molekulární delimitace se mohou lišit v závislosti na použitém přístupu, parametrech analýz a robustnosti datasetu (Ahrens et al., 2016; Luo et al., 2018). Zároveň mají jednotlivé metody menší či vyšší tendence k nadhodnocování či podhodnocování

výsledného počtu delimitovaných druhů (Carstens et al., 2013; Luo et al., 2018). V současných studiích je standardem, že se na daném datasetu využívá více typů molekulárně delimitačních metod a následně se hledá kongruence (Ortiz & Francke, 2016; Petzold & Hassanin, 2020). Genetická data tedy nesuplují taxonomickou práci a definované druhy zůstávají nadále subjektivním pojmem.

2.3.4. Reprodukční chování

Dalším způsobem, jakým lze rozlišit jednotlivé druhy, je pomocí etologických metod (Montanarin et al., 2011; Schuchmann et al., 2016). Zejména reprodukční chování nabízí celou paletu prvků, které mohou vykazovat druhovou specifitu (Chiarle et al., 2013). Námluvy fungují jako velmi efektivní prekopulační bariéra a jejich druhová specifita hraje roli zejména u příbuzných druhů, které se vyskytují syntopicky a jejichž rozmnožovací období se překrývají (Chiarle & Isaia, 2013).

Během námluv se uplatňuje multimodální signalizace, sestávající zejména z olfaktorických, vizuálních a seismických signálů (Rypstra et al., 2009; Uetz et al., 2016). Takové signály jsou druhově specifické a mají za úkol zamezit druhovému křížení a často také posuzovat kvalitu dvořícího se partnera. Jednotlivé prvky námluv a jejich kombinace proto nesou celou řadu znaků, dle kterých od sebe dokážeme rozlišit i morfologicky uniformní druhy (Chiarle & Isaia, 2013; Kronestedt, 1990). Přesto však bývá reprodukční chování v taxonomii a pro vymezování druhů využíváno jen zřídka. Narážíme zde totiž na celou řadu metodických úskalí, jako je například nutnost mít živý materiál v období rozmnožování, které bývá zejména u pavouků poměrně krátké a probíhá zpravidla jednou za život. Vizuálně se orientující druhy při námluvách často předvádí nápadné tance, jejichž pozorování a vyhodnocování není příliš technicky náročné, avšak složitější situace nastává u analýz seismických a olfaktorických signálů, na které je potřeba pokročilejší přístrojové vybavení (Elias et al., 2004).

2.3.5. *Integrativní taxonomie*

Integrativní taxonomie je přístup, který kombinuje několik metodických přístupů a zakládá se na principu „discovery step“ a „verification step“. Multidisciplinární přístup, zahrnující nejčastěji morfologii, morfometrii, geometrickou morfometrii, cytogenetiku, genetiku a etologii, má uplatnění zejména při studiu morfologicky uniformních taxonů a u taxonů, u kterých není dobře známa variabilita morfologických znaků (Edwards & Knowles, 2014). Zapojení více přístupů umožňuje řešit i komplikovanější otázky taxonomie a má i následný přesah do systematiky a zejména do porozumění evolučních procesů (Opatova et al. 2016; Christophoryová et al. 2023).

Mimo výše jmenované přístupy nalézáme mezidruhové rozdíly i v dalších aspektech života organismů, nejčastěji týkajících se ekologie, etologie a fyziologie (Andersson, 1990; Maltseva et al., 2021; Movin et al., 2022; Pyron et al., 2023). Tyto doplňkové metody mohou dobře sloužit pro verifikaci primárních kroků druhové delimitace. Z ekologického hlediska slouží k delimitaci druhů například niche modelling, modelující potenciální rozšíření organismů na základě znalostí o jejich preferencích prostředí a geografických podmínkách (Opatova et al., 2016). Podobně lze také nahlížet na hostitelskou specifitu paraziticky žijících druhů, či na analýzu mikrobiomu (Maggioni et al., 2020; Mallott & Amato, 2021). Při studiu komunikace u skupin jako je hmyz, ptáci, netopýři či obojživelníci se hojně uplatňuje bioakustika, která zaznamenává a vyhodnocuje druhově specifické akustické projevy (Obrist et al., 2010), u jiných živočichů komunikujících olfaktoricky lze pro rozlišení druhů použít chemickou analýzu feromonů a jiných chemických signálů (Buchinger & Li, 2020). Z dalších metod má v taxonomii své místo i histologie (Kira et al., 2024), a to díky zkoumání mikroskopických struktur tkání, které mohou poskytovat informace o fylogenetických vztazích a rozdílech mezi jednotlivými populacemi či druhy. Poslední revoluci v delimitačních analýzách a při určování druhů přinesla umělá inteligence, zapojující konvoluční neuronové sítě a strojové učení (Derkarabetian et al., 2019; Karbstein et al., 2024; Pyron, 2023).

3. Cíle

Disertační práce se zaměřuje na využití různých metod pro výzkum druhové diverzity pavoukovců. V práci jsem se věnoval hodnocení diverzity u čtyř řádů pavoukovců (Araneae, Opiliones, Scorpiones, Pseudoscorpiones) za účelem lépe porozumět druhové variabilitě vybraných charakteristik a posoudit jejich potenciál v delimitaci druhů a taxonomii.

V průběhu řešení disertačního projektu jsem se věnoval těmto konkrétním cílům:

1. Zhodnotit evoluci druhově specifických epigamních projevů pro druhovou delimitaci u modelové skupiny pavouků z čeledi Lycosidae;
2. Zjistit variabilitu chromozomových charakteristik u vybraných linií pavoukovců z řádů Araneae, Opiliones a Scorpiones;
3. Posoudit vliv chromozomových přestaveb jako mechanismu diverzifikace karyotypu;
4. Identifikovat mechanismy karyotypové evoluce štírů čeledi Buthidae;
5. Posoudit vliv schopnosti disperze na populační strukturu a speciaci štírků.

4. Výsledky práce v kontextu současného poznání

4.1. Reprodukční chování, jeho evoluce a využitelnost pro determinaci druhů

Druhově specifické námluvy jsou nezbytné pro rozpoznání potenciálního partnera k páření a vytvářejí klíčovou prekopulační reprodukčně izolační bariéru (Ptacek, 2000). U blízce příbuzných druhů s překrývajícími se areály rozšíření a synchronními rozmnožovacími obdobími jsou často námluvy nejdůležitějším mechanismem pro zabránění hybridizace a rozdíly v námluvách u takových druhů byly zaznamenány napříč živočišnou říší, pavoukovce nevyjímaje (Baker, 1991; Dondale, 1964; Fitzpatrick & Gray, 2001; Gerhardt, 1994; Martins, 1996).

Námluvy u pavouků spočívají ve vysílání třech základních typů signálů směrem k opačnému pohlaví a cílí tak na olfaktorické, seismické a vizuální smysly. Slídáci mají relativně dobře vyvinutý zrak, a proto jsou vizuální signály, jako je postoj těla a složité pohyby nohou, často ústředním prvkem jejich námluv (Clemente et al., 2010). Přední nohy a makadla samečků mohou nést modifikace typu kontrastního zbarvení, ztlustění nebo chomáčků hustých chloupků, což zesiluje vizuální signály vysílané samicím (Hebets & Uetz, 2000). Mimo to mají slídáci, podobně jako většina ostatních skupin pavouků, schopnost velmi citlivě vnímat i olfaktorické signály (typicky feromony) a vibrace, které při námluvách samci produkují především „dupáním“ či „bubnováním“ nohama a makadly o podklad (Hebets, 2008).

Slídáci, coby druhově početná a kosmopolitní čeleď pavouků, často slouží jako modelová skupina pro ekologické, etologické a fyziologické studie, a reprodukční chování bylo studováno především u rodů *Schizocosa*, *Pardosa* a *Alopecosa* (Chiarle et al., 2013; Dahlem et al., 1987; Hebets, 2008; Uetz et al., 2016; Uetz & Norton, 2007). Druhy v těchto rodech byly tradičně hlouběji členěny na základě morfologických znaků do komplexů druhů a druhových skupin, kde jsou samice nezhodně morfologicky uniformní (Kronestedt, 1990; Topfer-Hofmann et al., 2000). Vzhledem k tomu, že taxonomie založená na morfologii je v těchto případech často nespolehlivá, musí být pro správnou identifikaci druhů implementovány alternativní metody. Rozdíly v námluvách a v průběhu kopulace se tak ukázaly jako velmi užitečný nástroj pro rozpoznání druhů a vymezení kryptických druhů (Chiarle & Isaia, 2013; Kronestedt, 1990; Stratton, 1997).

Středoevropští slíďáci rodu *Alopecosa* bývají tradičně klasifikováni do čtyř druhových skupin (*pulverulenta* group, *fabrilis* group, *striatipes* group a *sulzeri* group), vymezených na základě morfologie jejich genitálií (Lugetti & Tongiorgi, 1969). Jednotlivé druhy v těchto druhových skupinách se překrývají ve svém rozšíření, fenologii a denní aktivitě (Bayram, 1995; Dahl, 1908; Hofmann & Haupt, 1990; Szinetár et al., 2005). Navíc se dospělci i blízké příbuzných a podobných druhů mohou vyskytovat syntopicky, což vyžaduje mechanismy pro zabránění hybridizaci. Přestože jsou mezi slíďáky rodu *Alopecosa* i hojně a běžně se vyskytující druhy, jejich námluvám byla donedávna věnována spíše okrajová pozornost. Stejně tak je ze značné části neznámá evoluce prvků námluv a páření. V přiloženém článku jsme se snažili interpretovat vzorce reprodukčního chování vybraných druhů rodu *Alopecosa* v evolučním kontextu (**Článek I**). K rekonstrukci fylogenetických vztahů mezi studovanými druhy jsme použili fragmenty jednoho mitochondriálního a dvou jaderných genů a hodnotili jsme jejich tradiční zařazení do druhových skupin založených na morfologických znacích.

V naší práci jsme na základě 79 pozorování popsali průběh reprodukčního chování čtrnácti evropských druhů rodu *Alopecosa*. Vzorce námluv i kopulací vykazovaly vysokou mezidruhovou diverzitu a zároveň specifitu na úrovni druhů a druhových skupin. U všech analyzovaných druhů byly námluvy zahájeny chemickými a seismickými signály, spočívajícími v trhavých pohybech končetin, bubnováním makadly a předními nohama o podklad a v třesení zadečku. Později byly u většiny druhů, s výjimkou těch žijících v norách či aktivních v noci, doplněny námluvy i o vizuální prvky, zahrnující především zvedání předních párů nohou do vzduchu. Překvapivě se makadla nepodílejí na vysílání vizuálních signálů, jako je to běžné například u rodu *Pardosa* (Chiarle et al., 2013), nýbrž jsou používána jen k produkci vibrací.

Přestože se zasnubními tanci slíďáků literatura příležitostně zabývá, o průběhu samotné kopulace máme jen velmi fragmentární údaje, ačkoliv i v tomto směru lze nalézt specifické znaky, které mohou pomoci rozlišit i morfologicky uniformní druhy. Obecně se má za to, že podčeledi zachovávající plesiomorfnní znaky (např. *Sosippinae*, *Venoniinae* a *Allocosinae*) vykazují během každé inserce embolu do pohlavního otvoru samice více expanzí hematodochy (Stratton et al., 1996), zatímco u podčeledi *Lycosinae* byly zaznamenány jak kopulace s jednou expanzí na každou inserci (rody *Arctosa*, *Trochosa*,

Schizocosa a *Pavocosa*), tak vícečetné expanze na každou inzerci (rod *Hygrolycosa*) (Stratton et al., 1996). Naše výsledky naznačují, že u rodu *Alopecosa* může být průběh kopulace variabilní jak na mezidruhové, tak na vnitrodruhové úrovni. Většina druhů analyzovaných v naší studii prováděla více hematodochálních expanzí na každou inzerci, zatímco kopulace u *A. sulzeri* byla charakterizována jednou inzercí každého embolu s jednou až dvěma expanzemi. Kromě toho čtyři druhy (*A. farinosa*, *A. mariae*, *A. psammophila* a *A. solitaria*) projevovaly vysokou vnitrodruhovou variabilitu v počtu inzercí embolu, avšak převážně byl dodržen vzorec jedné hematodochální expanze na každou inzerci.

Ačkoliv fylogenetické analýzy rodu *Alopecosa* nebyly naším primárním záměrem a některé hlubší nody nemají dostatečnou podporu, získali jsme určitý vhled do vztahů mezi podčeleděmi čeledi Lycosidae a dokázali jsme odhadnout evoluci reprodukčního chování u rodu *Alopecosa*. Předně, naše analýzy nepotvrdily monofylii rodu *Alopecosa*, na což naráží i starší literatura (Zyuzin & Logunov, 2000), a s výjimkou *pulverulenta* group se nepodařilo najít monofylii ani v dalších druhových skupinách, jmenovitě *fabrilis* group a *striatipes* group. Jako první jsme také pozorovali, že podčeleď Pardosinae, tradičně přijímaná taxonomická jednotka, čítající přes 600 druhů (WSC 2024), je vnitřní skupinou podčeledi Lycosinae. Následující molekulárně fylogenetické studie na větším datasetu pak ukázaly nejen polyfylii podčeledí Pardosinae a Lycosinae (Piacentini & Ramírez, 2019), ale i parafylii celé čeledi Lycosidae (Kulkarni et al., 2023).

Taxonomie druhů patřících do *pulverulenta* group je komplikovaná, jelikož morfologické znaky na samičích genitáliích často nepostačují k rozlišení jednotlivých druhů (např. *A. pulverulenta* vs. *A. cuneata* nebo *A. aculeata* vs. *A. taeniata*). Proto je nezbytné k jejich správné identifikaci používat i jiné typy znaků, jako je například reprodukční chování (Kronstedt 1990). Naše fylogenetické analýzy vyhodnotily druhy, patřící tradičně do *pulverulenta* group, jako monofylum. Zároveň tyto druhy sdílejí konzervativní prvky námluv a kopulací, které jsou pro tuto skupinu exkluzivní. Oproti tomu druhové skupiny *fabrilis* group a *striatipes* group se na základě našich analýz jeví jako parafyletické, přičemž *A. farinosa* spolu se severoamerickým druhem *A. kochi* (oba *fabrilis* group) sedí zcela mimo zbývající druhy rodu, a také námluvy a kopulace se od ostatních druhů rodu odlišují. *Alopecosa sulzeri*, jediný náš zástupce skupiny *sulzeri* group, jehož náležitost do rodu

Alopecosa bývá občas zpochybňována (Zyuzin & Logunov, 2000), pak vytváří sesterskou linii všem zbývajícím druhům rodu, což je patrné i na jeho unikátním průběhu námluv a kopulací. Zbývajících druhy patří do *fabrilis/striatipes* group (bez *A. kochi* + *A. farinosa*) a *A. psammophila*, který nebyl doposud zařazen do žádné druhové skupiny, vytváří monofylum, ve kterém lze nalézt jak sdílené, tak druhově specifické prvky reprodukčního chování.

Pozorovali jsme námluvy a kopulační chování 14 evropských druhů rodu *Alopecosa* a identifikovali jsme 17 odlišných prvků námluv zahrnujících pohyby makadel, nohou, zadečku a celého těla. Námluvy se obvykle skládají z trhavých pohybů celého těla, zatímco vizuální a vibrační signály jsou primárně realizovány pomocí předních nohou. Vzorce jak námluv, tak kopulací jsou složité a ukazují konzervované prvky sdílené příbuznými druhy [např. chvění zadečku (O_Q) u všech pozorovaných zástupců rodu, případně tření cymbiem o podklad (P_CR) u *pulverulenta* group] a také druhově specifické prvky či jejich unikátní kombinace [např. zvedání nohou (L_R) u *A. farinosa*, resp. bubnování nohama (L_T) a poskakování (B_H) u *A. taeniata*]. Délka kopulace se pohybovala od 2 sekund po více než dvě hodiny, a v závislosti na druhu zahrnovala mezi jednou a 18 inzercí embolu a až 65 hematodochálních expanzí na každou inzerci. Rozdíly v chování při námluvách a kopulacích byly také zaznamenány u parapatrických populací *A. farinosa*. Naše výsledky potvrzují, že druhově specifické vzorce námluv a kopulací mohou být účinným nástrojem pro identifikaci příbuzných a morfologicky obtížně rozlišitelných druhů a poskytujeme kontrolní výčet konkrétních prvků, které ve svém reprodukčním chování zahrnuje každý druh. Výsledky fylogenetických analýz jsou podpořeny našimi behaviorálními daty a výrazně nabourávají tradiční členění do druhových skupin založených na morfologii (Lugetti & Tongiorgi, 1969). Druhy z *pulverulenta* group tvořily monofylum, avšak zástupci *striatipes* a *fabrilis* group vykazují parafylii a polyfylii. Navíc jsme v předložené publikaci nedokázali potvrdit monofylii rodu *Alopecosa*, ani celé podčeledi Lycosinae.

Díky rutinnímu využívání sekvenčních dat se v posledních letech stále častěji objevují práce, které mapují epigamní projevy a sekundární pohlavní znaky na fylogenetické stromy (Frank et al., 2023; Girard et al., 2021; Starrett et al., 2022). Napříč čeleděmi pavouků se ukazuje, že námluvy skutečně slouží jako efektivní prekopulační bariéra a signifikantní rozdíly jsou patrné i mezi sesterskými druhy (Dondale, 1964; Maes et al., 2004; **Článek I**).

Kombinací fylogenetických a etologických dat tak získáváme náhled do evoluce rozmnožovacího chování dané skupiny a jeho využitelnosti pro delimitaci druhů.

4.2. Evoluce karyotypů a karyotypová diverzita

Cytogenetika je u pavoukovců zkoumána z mnoha úhlů pohledu, a mnoho z těchto přístupů nalézá potenciální využití v taxonomii, ať už jde o základní karyotypové charakteristiky jako je diploidní počet, morfologie chromozomů a mechanismy jejich přestaveb, nebo detailnější pohled do struktury chromozomů za využití fluorescenční *in situ* hybridizace (Ávila Herrera et al., 2021; Kovařík et al., 2018, 2022; Reyes Lerma et al., 2021; Štáhlavský et al., 2021). I přes probíhající výzkum a intenzivní snahy o mapování karyotypů pavoukovců stále existují celé linie, u kterých postrádáme i základní informace o jejich chromozomech, popřípadě jsou známe údaje pouze fragmentární a nemají výpovědní hodnotu co se variability týče (Vázquez et al., 2021).

4.2.1. Organizace genomu u pavoukovců

Počet chromozomů napříč pavoukovci je velmi diverzifikovaný, přičemž hnací silou vedoucí ke změnám karyotypů jsou, vedle relativně vzácných polyploidizací (Král et al., 2019), převážně různé typy chromozomálních přestaveb, které ovlivňují strukturu karyotypu a mohou tak mít zásadní efekt jako mezidruhov故事 bariéra (Plíšková et al., 2016; Štundlová et al., 2019). Uvažuje se, že nejčastěji se u pavoukovců vyskytují přestavby typů centrické (resp. Robertsonovské) fúze a rozpady, reciproké translokace a inverze (Ávila Herrera et al., 2021; Štáhlavský & Král, 2004). Je patrné, že různé skupiny pavoukovců vykazují různě silné tendence k uniformitě či naopak variabilitě karyotypů, což je do značné míry ovlivněno formou distribuce kinetochoru na jednotlivých chromozomech. U většiny cytogeneticky zkoumaných linií byly prokázány monocentrické chromozomy, které mají kinetochor umístěný na lokalizované centromere (Štáhlavský et al., 2012; Štundlová et al., 2019; Vázquez et al., 2021; **Článek II, Článek III**). Poloha centromery pak určuje morfologii chromozomu, která je buď akrocentrická/telocentrická (centromera je umístěna poblíž telomerické oblasti), nebo sub-/metacentrická (centromera je lokalizována blíže středu chromozomu). Obecně by se dalo předpokládat, že organismy s monocentrickými

chromozomy bývají méně tolerantní ke změnám v karyotypu, jelikož přestavby mohou komplikovat párování chromozomů v meioze a také generovat acentrické/dicentrické fragmenty (Shakoori et al., 2017). Z toho důvodu by chromozomální polymorfismy u těchto linií měly být méně časté a rozdíly v karyotypech by bylo možné chápat jako mezidruhové bariéry, což přímo nabízí možnost využití cytogenetických charakteristik v druhově delimitačních analýzách (Štáhlavský et al., 2018). U pavouků nadčeledi Dysderoidea, štírů čeledi Buthidae a několika skupin acariformních roztočů však nezávisle na sobě vznikly chromozomy holokinetické, tj. takové, které mají kinetochor rozmístěný difúzně po celé délce chromozomu (Dernburg, 2001; Král et al., 2019; Schneider et al., 2009; Wensch et al., 1994). U holokinetických chromozomů nelze určovat morfologii jako u chromozomů monocentrických, jelikož jsou makrostrukturně uniformní a vykazují pouze velikostní rozdíly. U organismů s holokinetickými chromozomy lze očekávat větší toleranci k chromozomálním přestavbám, a tudíž i jejich větší akumulaci (Schneider et al., 2009; **Článek IV, Článek V**). Přítomnost jak monocentrických, tak holokinetických linií činí z pavoukovců ideální model pro porovnávání karyotypových specifíků u takto rozdílných systémů.

4.2.2. Molekulárně cytogenetické metody

Limitovaná využitelnost standardních pruhovacích technik u bezobratlých komplikuje možnost detekce homologních chromozomů a jejich úseků. U pavoukovců se za účelem identifikace konkrétních chromozomů využívá zejména mapování oblasti nukleolárního organizátoru (NOR), který obsahuje tandemové repetice genů pro ribozomální RNA (28S, 5,8S a 18S rRNA) (Král et al., 2013). V minulosti byla detekce takových úseků a chromozomů, které je nesou, limitována na techniku stříbření, která však odhalila pouze NOR aktivně přepisované v předcházející interfázi (Forman et al., 2013). Pokroky v cytogenetice umožnily zavedení fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) i na modelech z řad pavoukovců. FISH je metoda, umožňující vizualizaci částí chromozomů, na které nasedají specifické fluorescenčně značené sondy. Takovýmto značením je možné vizualizovat například telomerické repetice, což může v případě zjištění intersticiálního signálu indikovat recentní přestavbu, při které se telomera ocitla uvnitř chromozomu (Rego & Marec, 2003). Zdaleka nejčastěji je však FISH aplikována na úseky 18S rDNA,

respektive oblasti potenciálních NOR. Výhodou oproti konvenčnímu stříbření je v tomto případě skutečnost, že vizualizovány jsou všechny přítomné lokusy, nikoliv pouze ty, které byly transkripčně aktivní v předchozí interfázi. Počet a pozice takto vizualizovaných úseků pak poskytuje další sadu znaků potenciálně využitelných v druhově delimitačních analýzách a může mít přesah i do závěrů o vyšší taxonomii (**Článek II, Článek III, Článek IV, Článek V**).

4.2.3. Pohlavní chromozomy

Velkou pozornost v současné cytogenetice získává také evoluce pohlavních chromozomů pavoukovců (Král et al., 2006; 2011; 2013; Sember et al., 2020). Pohlavní chromozomy (gonosomy) se vyvíjejí z páru autosomů, poté co získají geny určující pohlaví. Časem pohlavní chromozomy procházejí evolučními změnami, které potlačují rekombinaci v okolí oblasti určující pohlaví, což umožňuje nezávislou evoluci chromozomů X a Y, respektive Z a W (Abbott et al., 2017). Nerekombinující oblast pohlavního chromozomu, nazývaného allosom (Y nebo W), pak podléhá redukci počtu genů, akumulaci repetitivní DNA, heterochromatinizaci a z toho vyplývajícím morfologickým změnám tohoto chromozomu. Často se allosom postupně zmenšuje, degeneruje a může být nakonec z karyotypu úplně vyloučen (Král et al., 2006). V rámci pavoukovců se setkáváme s velmi pestrými systémy chromozomového určení pohlaví, zahrnujícími jak skupiny s morfologicky nediferencovanými, tj. kryptickými pohlavními chromozomy (např. u štírů, štírenek a bičovců), tak skupiny s diferencovanými pohlavními chromozomy (např. u pavouků a štírků) (Král et al., 2006; 2008; 2011; 2013; Reyes Lerma et al., 2021). Vzácně je v literatuře, konkrétně u dvou druhů sekáčů, popisován výskyt systému ZW (Tsurusaki & Cockendolpher, 1990), většina pavoukovců s diferencovanými pohlavními chromozomy však vykazuje systémy odvozené z XY, kdy je heterogametickým pohlavím samec (Král et al., 2006; Šťáhlavský et al., 2012). Zdaleka nejpestřejší plejádu systémů chromozomálního určení pohlaví pak vykazují pavouci, u nichž je za ancestrální stav považován systém X_1X_2O , přičemž samčí karyotyp zahrnuje chromozomy X_1X_2 a samičí $X_1X_1X_2X_2$ (Král et al., 2011). V odvozených stavech pak v samčím karyotypu nalézáme až 13 chromozomů X (*Macrothele calpeiana*; Král et al., 2013). U jiných druhů, zejména u haplogynních pavouků, byla zaznamenána i přítomnost chromozomů Y v jejich ancestrálním stavu X_1X_2Y

i v následujících z toho odvozených systémech. Komplexnější problematika se týká výskytu tzv. neopohlavních chromozomů, jež vznikají přestavbami mezi autosomy a gonosomy známými například u čeledí Salticidae, Agelenidae a Sparassidae (Ávila Herrera et al., 2021). Změny pohlavních chromozomů mohou potenciálně vést k rychlému vzniku nových reprodukčních bariér a rozdíly na této úrovni tudíž lze teoreticky využít jako charakteristiky k delimitaci druhů.

4.2.4. Karyotypová variabilita pavouků (*Araneae*)

Pavouci jsou tradičně děleni do tří hlavních skupin; bazální Mesothelae a Mygalomorphae vykazují typicky vyšší počty chromozomů ($2n\sigma = 80$ nebo 96 u Mesothelae; $2n\sigma = 14$ – 128 ; průměrně 61 u Mygalomorphae) (Král et al., 2013), a Araneomorphae, dělící se na polyfyletické Haplogynae se zachovanými plesiomorfními znaky, a monofyletické Entelegynae. Karyotyp haplogynních pavouků sestává, s výjimkou pravděpodobně polypoidní čeledi Caponiidae ($2n\sigma = 55$ – 152) (Král et al., 2019) z typicky menšího počtu dvouramenných chromozomů ($2n\sigma = 9$ – 33 , průměr 21). Také „moderní“ pavouci, tvořící skupinu Entelegynae, mají nižší diploidní počet chromozomů ($2n\sigma = 10$ – 52 , průměr 27), avšak jsou co do karyotypů mnohem méně diverzifikovaní a jednotlivé čeledi zpravidla vykazují konzervativní počet predominantně akrocentrických chromozomů (Araujo et al. 2024). Z dosavadních výsledků je tudíž zřejmé, že karyotypová variabilita různých skupin pavouků je dosti odlišná a jejich potenciál ve využití pro taxonomické účely bude různý, jak potvrdily i naše výsledky.

V rámci našeho datasetu z jižní Afriky jsme analyzovali cytogenetická data pro 38 druhů pavouků z podřádu Entelegynae patřících do 16 čeledí (**Článek II**). Kromě kosmopolitního druhu *Oecobius putus* (Oecobiidae) byly všechny druhy karyotypovány poprvé. Jako vůbec první jsme publikovali cytogenetické charakteristiky čeledí Ammoxenidae a Gallieniellidae a podčeledi Prodidominae (Gnaphosidae), která byla ještě nedávno (Azevedo et al., 2018) považována za samostatnou čeleď. $2n$ zkoumaných druhů se pohybovalo od 19 do 42. Pozorované systémy pohlavních chromozomů byly buď X_0 , X_1X_20 nebo $X_1X_2X_30$. Nejběžnějším systémem byl X_1X_20 (zjištěn u 75 % druhů). Akrocentrická morfologie celého chromozomového komplementu byla zjištěna u 92 % druhů. Chromozomy zbývajících

druhů pravděpodobně také byly akrocentrické, ale vzhledem k metodickým artefaktům jsme nebyli schopni určit morfologii všech chromozomů. Námi analyzované druhy jsme rozdělili do čtyř hlavních skupin: Araneoidea, Oecobioidea, klád RTA (kromě Dionycha) a Dionycha (rozčleněná do tří částí), podle jejich zařazení do fylogeneze Entelegynae (Wheeler et al., 2017).

Araneoidea

Zkoumaní zástupci čeledí Tetragnathidae ($2n = 24$) a Theridiidae ($2n = 21, 22$) svými karyotypy nijak neodchylovali od jiných zástupců těchto čeledí publikovaných dříve (Tetragnathidae: $2n = 24$ u 71 % druhů, Theridiidae: $2n = 21, 22$ u 80 % druhů), jejich karyotypy tedy můžeme považovat za konzervativní, a analýzy provedené standardními cytogenetickými metodami jsou jen málo využitelné v taxonomii těchto skupin (Araujo et al., 2024).

Oecobioidea

Tato nadčeď, reprezentována v naší studii čeleděmi Hersiliidae a Oecobiidae, vykazuje o něco vyšší variabilitu (Oecobiidae $2n = 19-42$; Araujo et al. 2024), která spočívá v tendenci k redukci diploidního počtu, která je patrná nejen u čeledi Hersiliidae (Forman, pers. comm.), ale i mezi jednotlivými druhy rodu *Oecobius*, kde fúzí i pohlavní chromozomy a karyotypové vzorce námi studovaných druhů byly $2n = 19; X_0$, respektive $2n = 25; X_1X_2X_3X_0$. V takových případech lze pak karyotypové charakteristiky využít i jako doplňkovou metodu pro delimitaci druhů.

RTA: non-Dionycha

Nenápadnou úroveň diferenciacie jsme sledovali i na karyotypech čeledí Ctenidae ($2n = 28$), Oxyopidae ($2n = 28$), Sparassidae ($2n = 42$) a Thomisidae ($2n = 23, 28$). Studované druhy se co do chromozomů obecně neliší od ostatních zástupců svých čeledí (Araujo et al. 2024), a ty proto nejsou dobrým znakem využitelným v delimitačních procesech.

Výjimkou je rod *Borboropactus* (Thomisidae) ($2n = 28$), jež má v diploidním komplementu více chromozomů než ostatní zástupci čeledi ($2n = 23$ u 86 % druhů). Tím utvrzuje svou bazální pozici v rámci čeledi (Wheeler et al., 2017).

RTA: Dionycha A (Prodidominae+Gnaphosoidea)

Do našeho datasetu jsme zahrnuli zástupce osmi čeledí a podčeledi Prodidominae, která byla v době publikování článku považována za podčeleď čeledi Gnaphosidae (Azevedo et al., 2018), kam byla přiřazena na základě morfologických znaků. Výsledky našich cytogenetických analýz ukázaly na zásadní rozdíly v architektuře karyotypu mezi podčeledí Prodidominae a všemi ostatními čeleděmi patřícími do Gnaphosoidea, Gnaphosidae nevyjímaje. Celá nadčeleď je totiž typická uniformními karyotypy sestávajícími z 22 chromozomů a systémem určení pohlaví X_1X_2O (Araujo et al., 2024), kdežto u podčeledi Prodidominae jsme pozorovali zvětšení počtu chromozomů na 28 u neurčeného druhu rodu *Theuma*, respektive na 29 chromozomů u druhu *Prodidomus simoni*, u něž se změna počtu chromozomů dotýkala i gonosomů ($X_1X_2X_3O$). Ačkoliv byly karyotypy uvnitř skupin Gnaphosoidea a Prodidominae konzervativní a jejich využitelnost k delimitaci druhů je tak velmi limitovaná, odlišnosti karyotypů u rodů *Theuma* a *Prodidomus* poukazovaly na výlučné postavení podčeledi Prodidominae. Tuto úvahu nakonec potvrdila i molekulárně fylogenetická data, na jejichž základě byla podčeleď Prodidominae vyjmuta z Gnaphosidae a získala zpět rank samostatné čeledi (Azevedo et al., 2022).

RTA: Dionycha B

Čeledi Cheiracanthiidae a Selenopidae vykazovaly nízkou variabilitu karyotypů. Zástupci čeledi Cheiracanthiidae mívají typicky $2n = 26$ (Araujo et al., 2024), u námi zkoumaného druhu *Cheiramiona kirkspriggsi* jsme zaznamenali $2n = 24$, což poukazuje na proběhlou fúzní událost. U čeledi Selenopidae jsme na pěti druzích demonstrovali dva karyotypy, u čtyř z nich se jednalo o $2n = 26$, X_1X_2O , pátý druh patřící do rodu *Selenops* vykazoval karyotyp $2n = 29$ $X_1X_2X_3O$. Třetí čeledí v této skupině jsou skákavky (Salticidae), pověstné značnou karyotypovou uniformitou, kdy se od nejběžnějšího karyotypu $2n = 28$ významně

odchyluje jen několik málo ze 171 cytogeneticky probádaných druhů (Araujo et al., 2024). My jsme analyzovali devět druhů této početné a diverzifikované čeledi, a všechny z nich se držely uniformního karyotypu $2n = 28, X_1X_2O$, což eliminuje využitelnost karyotypových znaků v této čeledi.

Distribuce 18S rDNA lokusů

V době naší studie byly známy údaje o pozici 18S rDNA lokusů pouze u pěti druhů entelegynních pavouků a počet takto analyzovaných druhů se výrazně nezvýšil ani dodnes (Cavenagh et al., 2022). My jsme metodou FISH identifikovali pozice lokusů 18S rDNA u 11 druhů z osmi čeledí, čímž jsme citelně zvýšili počet druhů, u kterých je tato charakteristika známa. Ve všech případech se 18s rDNA lokusy nacházely v distální pozici na dlouhých ramenech autozomů. Počet signálů se, v závislosti na druhu, pohyboval mezi jedním a pěti, a rozdílné počty jsme pozorovali i u druhů, které jinak vykazovaly makrostrukturně podobné karyotypy, například u dvou druhů rodu *Olios* (Sparassidae, jeden, resp. pět signálů 18s rDNA) či u rodu *Selenops* (Selenopidae, jeden, resp. čtyři lokusy). To ilustruje, že detailnější pohled do organizace genomu může poskytnout další sadu znaků využitelnou v taxonomii i u skupin s domněle uniformními karyotypy (Cavenagh et al., 2022).

4.2.5. Karyotypové charakteristiky sekáčů

O cytogenetice sekáčů jsme donedávna měli jen velmi sporé údaje, které naznačovaly uniformitu v počtech a morfologii chromozomů mezi zástupci všech čtyř evolučních linií (Cyphophthalmi, Eupnoi, Dyspnoi a Laniatores). I navzdory nerovnoměrnému prozkoumání jednotlivých podřádů, kdy největší pozornost byla věnována zejména podřádu Eupnoi, je však zřejmé, že sekáči představují karyotypově variabilní skupinu. S tím, jak byly postupně popisovány nové karyotypy, se začala projevovat diverzita v počtu chromozomů (Cyphophthalmi $2n = 24–52$, medián 30; Eupnoi $2n = 10–36$, medián 22; Dyspnoi $2n = 10–28$, medián 16; Laniatores $2n = 25–109$, medián 81) (Tsurusaki et al., 2024). Jedním z faktorů, které ovlivňují karyotypovou variabilitu některých druhů sekáčů, je přítomnost B chromozomů. To jsou chromozomy, které jsou nepárové a má se za to, že jsou nekódující. Při meioze se pak do dceřiných buněk rozestupují náhodně a způsobují tak změny v počtu

chromozomů i v rámci jednoho druhu (např. 0–18 B chromozomů u druhu *Metagagrella tenuipes*) (Tsurusaki, 1993). U některých druhů byla reportována i vnitrodruhová či mezipopulační variabilita v počtu chromozomů, která může být důsledkem fixací chromozomových přestaveb v karyotypu na lokální úrovni, jelikož sekáči jsou málo mobilní a často vytvářejí izolované populace (Murienne et al., 2010). Diverzita se týká i různých systémů určení pohlaví – od pohlavních chromozomů nediferencovaných, přes druhy se systémem XY, až po dva druhy s domnělým systémem ZW (Tsurusaki & Cokendolpher, 1990; Tsurusaki et al., 2024).

V naší studii jsme analyzovali pět jihoafrických zástupců rodů *Guruia* a *Rhampsinitus* čeledi Phalangiidae (Eupnoi), která má centrum rozšíření na severní polokouli, a přinesli jsme vůbec první poznatky o chromozomech sekáčů z afrotropického regionu (**Článek III**). Navíc jsme jako první aplikovali FISH s 18S rDNA na sekáčích čeledi Phalangiidae. Výsledky cytogenetických analýz u *Guruia africana* ($2n = 24$) a čtyř druhů rodu *Rhampsinitus* ($2n = 24, 26, 34$) ukazují, že africké druhy sdílejí základní charakteristiky karyotypu s dosud analyzovanými zástupci čeledi Phalangiidae ze severní polokoule. Podrobné informace o karyotypech jsou však k dispozici pouze u poloviny ze čtrnácti druhů, zatímco záznamy o zbývajících sedmi druzích obsahují pouze počty chromozomů (Jindrova et al., 2020; Tsurusaki et al. 2024). U čeledi Phalangiidae se počet chromozomů pohybuje od $2n = 16$ u *Oligolophus tridens* (C.L. Koch, 1836) (Tsurusaki 2007 in: Pinto-da-Rocha et al., 2007) po $2n = 36$ u *Rilaena triangularis* (Herbst, 1799) (Sokolow, 1929), přičemž karyotypy jsou převážně tvořeny dvouramennými chromozomy.

Obecně se předpokládá, že ancestrálním stavem je u pavoukovců jeden pár nukleolárních organizátorů (18S rDNA clusterů) (Forman et al., 2013). U námi studovaných druhů jsme tento počet zjistili pouze u druhu *R. qachasneki*, zatímco u ostatních druhů bylo 18S rDNA lokusů až sedm. Zajímavé je, že u dvou druhů (*R. leighi* a *R. capensis*) byly 18S rDNA clustery heterozygotní a navíc jsme našli mezipopulační rozdíly v jejich počtu, což můžeme přisoudit akumulaci mutací u izolovaných studovaných populací. Alternativním vysvětlením je, že tyto polymorfní populace jsou ve skutečnosti kryptické druhy, a heterozygotní 18S rDNA clustery indikují hybridy vzniklé křížením jedinců ze dvou nezávislých populací. Další zajímavostí je přítomnost heteromorfních bivalentů u 18S rDNA nesoucích chromozomů. Úseky těchto lokusů byly vždy na jednom chromozomu násobně

delší než na druhém chromozomu v bivalentu. Tato heteromorfie byla zaznamenána u samců *R. leighi* a samic *R. capensis*, což by mohlo, ač velmi nejistě, poukazovat na existenci pohlavních chromozomů XY u druhu *R. leighi*, respektive ZW u *R. capensis*. K přesnějším závěrům by však bylo nutné detailně prostudovat průběh meiozy u obou pohlaví zmiňovaných druhů, případně implementovat CGH (comparative genome hybridization).

Sekáči jsou tak další skupinou, která ukazuje neočekávanou variabilitu v karyotypech, která je ještě patrnější při zahrnutí molekulárně cytogenetických technik (FISH). V kombinaci s dalšími metodami je tak cytogenetika sekáčů potenciálně vhodná pro druhově delimitační analýzy.

4.2.6. Karyotypová diferenciace u štírů čeledi Buthidae

Štíři patří mezi jednu z nejstarších skupin pavoukovců a byli jedněmi z prvních členovců, kteří kolonizovali souš (Dunlop, 2010). Navzdory pozornosti a výzkumu, který se jim v posledních letech dostává, se stále nedaří spolehlivě rozřešit fylogenetické vztahy mezi čeleděmi (Santibáñez-López et al., 2019; Sharma et al., 2015). Kromě toho jsou štíři extrémně konzervativní skupinou organismů se silnou morfologickou uniformitou, která ztěžuje delimitaci a identifikaci druhů či jejich příslušnost do vyšších taxonomických jednotek. Morfologická uniformita však značně kontrastuje s diverzitou genetickou a cytogenetickou, a proto jsou recentně cytogenetické charakteristiky relativně rutinně implementovány při popisech nových druhů (Kovařík et al., 2018, 2022; Kovařík & Štáhlavský, 2019).

Čeď Buthidae tvoří s více než 1200 druhy nejpočetnější a zároveň nejprobádanější čeď štírů, která osídlila všechny kontinenty vyjma Antarktidy a zahrnuje většinu ze štířích druhů, jejichž bodnutí může být pro člověka smrtelně nebezpečné (Albuquerque et al., 2013). Fylogenetické analýzy staví čeď Buthidae v rámci celého řádu do bazální pozice spolu s čeleděmi Pseudochactidae a Chaerilidae (Sharma et al., 2015). Z cytogenetického hlediska se buthidní štíři vyznačují holokinetickými chromozomy, typicky v nižším počtu ($2n = 5-36$), a dvěma hlavními evolučními liniemi, které se liší co do úrovně konzervativnosti diploidních počtů (**Článek IV**). Obecně lépe probádaní novosvětští štíři

této čeledi vykazují vyšší variabilitou v diploidních počtech a vyšší tendence k chromozomálním přestavbám, oproti tomu starosvětští zástupci této čeledi mají spíše konzervativní karyotypy, což se projevuje především na rodové úrovni. Při detailnějších analýzách a zapojením molekulárně cytogenetických markerů je však diverzita na jemnější škále patrná i u rodů s uniformními diploidními počty, a to i na vnitrodruhové úrovni (**Článek IV, Článek V**).

Jak naše, tak dříve publikovaná data poukazují na nebývalou incidenci strukturních heterozygotů napříč celou čeledí Buthidae (Adilardi et al., 2016; Mattos et al., 2018; Shanahan, 1989; **Článek IV, Článek V**). Přestavby u holokinetických chromozomů vedou ke vzniku multivalentních asociací, kterými jsou nejčastěji kvadrivalenty (vzniklé reciprokými translokacemi) nebo trivalenty (vzniklé fúzí či rozpadem chromozomů). Evoluční dopad takových strukturních změn je nejistý, očekává se však, že mohou mít i adaptivní funkci, či zastávat úlohu pohlavních chromozomů (Adilardi et al., 2016; Mattos et al., 2018; Schneider et al., 2009; Shanahan, 1989). Vlivem nízké mobility štirů a tím způsobenému sníženému genovému toku mohou být multivalentní asociace relativně snadno fixovány. Ke správnému posouzení dopadu strukturní heterozygoty a chromozomálního polymorfismu je však zásadní dostatečně pochopit variabilitu uvnitř studovaného taxonu a výsledky posuzovat ideálně ve fylogenetickém kontextu (**Článek V**).

Diferenciací karyotypů ve fylogenetickém kontextu u čeledi Buthidae jsme se zabývali ve dvou našich studiích, čímž jsme u této čeledi více než dvojnásobně zvýšili počet druhů s popsány karyotypy (Schneider et al. 2024). První práce byla zaměřena primárně na distribuci NORů (18S rDNA clusterů) napříč spektrem rodů pokrývajících velkou část doposud neznámé jak geografické, tak systematické diverzity (**Článek IV**). Ve druhé studii jsme se zaměřili na detailnější popisy karyotypů u málo probádaného rodu *Gint*, endemického pro roh Afriky, a pomocí molekulárně fylogenetických nástrojů jsme odhadli vztahy mezi druhy a jejich jednotlivými populacemi (**Článek V**).

Naše výsledky potvrzují základní cytogenetické charakteristiky čeledi Buthidae. Ve všech fylogenetických skupinách jsme identifikovali nízké počty chromozomů $2n = 6-45$ (průměr 22) s holokinetickou organizací, achiasmatickou meiózu u samců, absencí morfologicky diferencovaných pohlavních chromozomů a vysokou frekvencí (cca u 30 % druhů) multivalentních asociací v první meiotickém dělení samců. Lokusy 18S rDNA byly

detekovány u všech zkoumaných druhů a kromě několika případů vykazovala distribuce tohoto markeru silný fylogenetický pattern podporující rozdělení Laurasijské skupiny '*Buthus*' od ostatních linií čeledi, které diverzifikovaly v Gondwaně. Linie „*Buthus group*“, do níž spadají zástupci s Laurasijským původem, vykazující téměř výhradně jeden pár 18S rDNA lokusů v intersticiální pozici. Výjimkou jsou rody *Hottentotta* a *Buthacus*, které mají 18S rDNA lokalizovaný terminálně (**Článek IV**). Náš navazující článek, zaměřený na karyotypovou variabilitu u rodu *Gint* (taktéž '*Buthus*' group), pak zdůrazňuje značnou dynamiku karyotypů, která se podepisuje i na lokalizaci (terminální a subterminální) a počtu (dva až tři) 18S rDNA lokusů u tohoto rodu. Zmiňovaná variabilita byla pozorována i na vnitrodruhové úrovni, což poukazuje na existenci více cytotypů v rámci jednoho druhu a dokresluje turbulentní situaci v organizaci karyotypů v rodu *Gint* (**Článek V**). U všech zbývajících linií čeledi Buthidae jsou 18S rDNA lokusy vázány striktně na terminální pozici, avšak jejich počet se pohybuje mezi dvěma a sedmi.

Z výše uvedeného příkladu vyplývá, že 18S rDNA není vždy vhodným markerem využitelným v druhově delimitačních analýzách, může však pomoci poukázat na různé trendy karyotypové evoluce zkoumaných linií.

Protože štitři rodu *Gint* vykazují vysokou prevalenci chromozomálních přestaveb, rozhodli jsme se mimo konvenčního 18S rDNA markeru lokalizovat metodou FISH i telomerické repetice (TTAGG)*n*. Domnívali jsme se, že jelikož jsou strukturní změny v karyotypu u tohoto rodu pravděpodobně recentní či dokonce stále probíhající, mohli bychom zachytit intersticiální telomerický signál (ITS), nebo naopak konce chromozomů neukončené telomerickými repeticemi. ITS se zatím podařilo detekovat ve větší míře v rámci rodu *Pandinus s.l.* (Scorpionidae) (Štundlová, 2019) a dvou druhů rodu *Scorpiops* (Scorpiopidae) (Štáhlavský et al., 2021), zástupců štírů s monocentrickými chromozomy. ITS v těchto případech poukazuje na nedávno proběhlé chromozomové fúze (Štundlová, 2019). Ostatní druhy štírů, u kterých byla doposud pozice (TTAGG)*n* zkoumána, však žádné intersticiální telomerické repetice nevykazovaly, a to i v případě, že se jednalo o druhy s evidentními chromozomálními přestavbami (Adilardi et al., 2015, 2016; Mattos et al., 2018; Ojanguren-Affilastro et al., 2017; Ubinski et al., 2018). U námi studovaného rodu *Gint* jsme došli k totožnému závěru, tj. pozice (TTAGG)*n* byla vždy soustředěna pouze na telomerickou oblast chromozomu. To nasvědčuje, že i) body zlomů na chromozomech jsou

rychle opraveny syntézou *de novo* telomerických sekvencí (Pennaneach et al., 2006; Vermeesch & Price, 1994), případně jsou na tato místa přeneseny telomery z nepoškozených chromozomů (telomere capture; Meltzer et al., 1993) a že ii) nově vzniknuvší intersticiální telomerické úseky jsou vzápětí redukovány molekulární erozí.

Čeled' Buthidae, význačná holokinetickými chromozomy, demonstruje linie jak s uniformními, tak rozrůzněnými a dynamickými karyotypy. Zmiňovanou chromozomovou uniformitu či variabilitu lze pozorovat na různých úrovních zkoumání od diploidního počtu a makrostrukturních přestaveb až po repetitivní sekvence. Z toho důvodu nejsou u buthidních štírů cytogenetické znaky příliš vhodné pro druhově delimitační analýzy, avšak tento typ dat může výborně sloužit jako přidaná hodnota při taxonomických studiích jako jedna z doplňkových charakteristik druhů či vyšších taxonomických jednotek. Trendy ve směřování evoluce karyotypu jednotlivých linií a nastiňování možných faktorů, které tyto trendy ovlivňují, je pak možné odhalovat v kombinaci s molekulárně genetickými daty.

4.3. Molekulární delimitační přístupy

Štírci jsou skupinou zatíženou silnou morfologickou uniformitou, což značně komplikuje vymezení druhů na základě tradičních morfologických a morfometrických přístupů (Beier, 1963; Christophoryova et al., 2011). Nízká morfologická diverzita tak má za následek podhodnocení skutečné diverzity, kterou můžeme pozorovat například na genetické úrovni. Zapojení molekulárně genetických metod v poslední době vedlo k identifikování nových, dříve přehlížených druhů, a to i v regionech s relativně dlouhou tradicí taxonomického výzkumu (Christophoryová et al., 2023; Muster et al., 2021).

Schopnost disperze zásadně ovlivňuje distribuci druhů a podepisuje se na genetické struktuře populací (Harms et al., 2019). Některé organismy s omezenými možnostmi šíření, mezi které štírci patří, proto k transportu využívají mobilnějšího hostitele. Takovýto způsob disperze, zvaný foreze, je tradičně předpokládáný téměř výhradně u druhů žijících pod kůrou či ve stromových dutinách, kdežto druhy žijící v půdě či hrabance jsou považovány za striktně sedentární a tím pádem vytvářející geograficky izolované populace s nízkou genetickou strukturou (Opatova & Štáhlavský, 2018; Poinar et al., 1998).

V **Článku VI** jsme se zaměřili na čtyři široce rozšířené a hojně se vyskytující rody štírků čeledi Cheliferidae (*Chelifer*, *Dactylochelifer*, *Hysterochelifer* a *Rhacochelifer*), na kterých jsme se snažili vykládat genetická data v ekologickém kontextu. To mělo za cíl poskytnout nový úhel pohledu na jejich diverzitu, rozšíření, životní strategie a evoluční historii.

Získali jsme dataset více než 200 jedinců čeledi Cheliferidae, pokrývající 66 % evropské diverzity na úrovni rodů. Na našem souboru jsme analyzovali sekvence genu *cox1*, který je standardně využíván jako zvířecí barcode, a tuto matici jsme podrobili jak základním fylogenetickým analýzám, tak čtyřem molekulárním druhově delimitačním metodám (ASAP, TCS, PTP a GMYC).

U štírků je známo, že mají zrychlený substituční rate, což v důsledku komplikuje snahy o spolehlivé rekonstrukce fylogeneze a navazující druhově delimitační analýzy (Arabi et al., 2012). Efekt rychlejší akumulace mutací je o to více patrný, když analyzujeme pouze relativně krátký úsek genetické informace, který je poměrně variabilní i u jiných skupin živočichů. Molekulární druhově delimitační analýzy potom můžou nadhodnocovat skutečný počet identifikovaných druhů, respektive nezávislých linií (Kekkonen & Hebert, 2014). Tento jev jsme v naší studii zohlednili tím, že jsme za směrodatnější volili spíše konzervativní metody (typicky ASAP), které nemají takové tendence k over-splittingu, jako metody jiné (např. TCS).

Barcodové sekvence použité v naší studii podle očekávání nedokázaly spolehlivě rozřešit hlubší fylogenetické vztahy na úrovni čeledi, nicméně linie, vymezující morfologicky definované rody, se ukázaly jako dobře podpořené. To svědčí o tom, že pro úroveň rodu je tradiční, na morfologii založená delimitace, spolehlivým taxonomickým nástrojem. Na druhou stranu jsme pomocí molekulárních delimitačních metod identifikovali nezávislé linie uvnitř v současnosti rozeznávaných druhů u všech čtyř zkoumaných rodů, což svědčí o vysoké prevalenci kryptické diverzity v rámci čeledi Cheliferidae.

V naší studii popisujeme případy sdílení haplotypů i na velké geografické vzdálenosti a nízkou geografickou strukturu populací, což je typickým znakem druhů, u kterých je popsáno šíření pomocí foreze. Na genetické úrovni proto tento způsob disperze dokresluje u druhů, u nichž je způsob šíření již znám (*Chelifer cancroides* a *Rhacochelifer maculatus*) (Poinar et al. 1998), a na základě podobných patternů

předpokládáme forezi i u některých linií v rodech *Dactylochelifer* a *Hysterochelifer*. Překvapivě jsme pozorovali velké areály a malou geografickou strukturu i u některých linií obývajících hrabanku, což indikuje, že i domněle sedentérní druhy štírků mohou využívat k transportu forezi, a v tom případě jsou možnými vektory různé druhy hmyzu, jejichž larvy se vyvíjí v půdě. Jelikož je foreze u štírků jen řídce dokumentovaná (Poinar et al. 1998) a její důkazy pochází primárně jen z náhodných záchytů, můžou genetická data nepřímo sloužit jako důkaz tohoto způsobu šíření i u málo studovaných druhů. Nedostatek geografické struktury populací byl nejnápadnější u druhu *C. cancroides*, u kterého jsme zaznamenali sdílení haplotypů na vzdálenost téměř 7000 km. Jelikož je tento druh synantropní, dá se mluvit o tom, že mu jako foretický hostitel slouží člověk. Různé úrovně geografické struktury populací jsme dokumentovali i u blízce příbuzných taxonů, kdy jsme například v rodu *Hysterochelifer* pozorovali linie jak geograficky úzce limitované, tak s areály výrazně většími, pokrývajícími značnou část mediteránu.

Sedentérní štírci jsou dobře známí vysokou úrovní kryptické diverzity (Harrison et al., 2014; Ohira et al., 2018), avšak recentní výzkumy odhalují totožný jev i u druhů foretických, které byly tradičně považovány za široce rozšířené (Christophoryová et al., 2023; Opatova & Štáhlavský, 2018). Vzhledem ke komplikované taxonomii štírků čeledi Cheliferidae (založené převážně jen na morfologických znacích vázaných na jedno pohlaví), a jejich často skrytému způsobu života, nám stále mohou chybět relativně základní znalosti jejich diverzity, rozšíření a ekologie. Barcodingová data mohou být tedy použita jako první krok ve výzkumu, který následně umožní zvolit vhodný metodologický rámec pro zajištění lepších diagnostických znaků a definování stabilních taxonomických jednotek.

5. Shrnutí a závěr

V průběhu řešení doktorského projektu se podařilo zpracovat široké spektrum pavoukovců z různých řádů. Zvláštní důraz byl kladený na výzkum jejich diverzity, a to především za využití multidisciplinárního přístupu (**Článek I, Článek IV, Článek V, Článek VI**). Integrace více metod dovolila nejen přesněji odhadovat skutečnou druhovou bohatost, ale v případě, že je dostupná rekonstrukce fylogenetických vztahů, umožnila nastiňovat možné evoluční trendy i životní strategie (**Článek I, Článek II, Článek III, Článek IV, Článek V, Článek VI**).

Taxonomie pavoukovců se i v dnešní době zakládá primárně na morfologických znacích. Implementací jiných než morfologických metod (primárně těch založených na genetických datech) se však ukazuje, že morfologická diverzita neodráží diverzitu skutečnou. Napříč řády pavoukovců se setkáváme s taxony, které zejména vlivem života v podobném typu prostředí a obecně malým tlakem na morfologickou diferenciaci podléhají morfologické uniformitě a s ní související kryptické diverzitě. Následně, v kombinaci s malou znalostí variability morfologických znaků či jejich úplnou absencí, vyvstávají problémy se správnou delimitací jednotlivých druhů. Během mého disertačního projektu jsem otázku vymezení druhů řešil integrací více nezávislých metod, založených primárně na genetických, cytogenetických a etologických datech. Nepřekvapivě se ukázalo, že i) využitelnost jednotlivých metod a jejich výpovědní hodnota se mezi různými skupinami liší a ii) kryptická diverzita je běžným fenoménem u všech mnou zkoumaných řádů pavoukovců (**Článek I, Článek II, Článek III, Článek IV, Článek V, Článek VI**).

Jako primární nástroj pro získání základního odhadu diverzity se osvědčilo DNA barcodování, tj. sekvenování standardizovaného úseku DNA (u pavoukovců 658bp sekvence genu *cox1*). Výhodou takového přístupu je především relativní rychlost a dostupnost. Výsledky prvotního rozdělení do nezávislých evolučních linií na základě barcodování je pak možné verifikovat zahrnutím dalších metod. Zároveň slouží získané fylogenetické stromy jako základní páteř pro mapování jiných typů znaků, v mém případě se jednalo především o znaky etologické a cytogenetické, a to pak dovoluje odhadovat evoluční trendy v daných liniích. Přesah sekvenčních dat spočívá i v tom, že nenesou pouze informace o fylogenezi, ale do určité míry můžou sloužit jako proxy pro zjišťování životních strategií organismů, o jejichž životě se jinak údaje získávají obtížně (**Článek VI**).

6. Seznam literatury

- Abbott, J. K., Nordén, A. K., & Hansson, B. (2017). Sex chromosome evolution: Historical insights and future perspectives. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1854), 20162806.
- Adilardi, R. S., Ojanguren-Affilastro, A. A., Mattoni, C. I., & Mola, L. M. (2015). Male and female meiosis in the mountain scorpion *Zabius fuscus* (Scorpiones, Buthidae): Heterochromatin, rDNA and TTAGG telomeric repeats. *Genetica*, 143, 393–401.
- Adilardi, R. S., Ojanguren-Affilastro, A. A., & Mola, L. M. (2016). Sex-linked chromosome heterozygosity in males of *Tityus confluens* (Buthidae): A clue about the presence of sex chromosomes in scorpions. *PLoS One*, 11(10), e0164427.
- Ahrens, D., Fujisawa, T., Krammer, H.-J., Eberle, J., Fabrizi, S., & Vogler, A. P. (2016). Rarity and incomplete sampling in DNA-based species delimitation. *Systematic Biology*, 65(3), 478–494.
- Albuquerque, C. M. R. de, Santana Neto, P. de L., Amorim, M. L. P., & Pires, S. C. V. (2013). Pediatric epidemiological aspects of scorpionism and report on fatal cases from *Tityus stigmurus* stings (Scorpiones: Buthidae) in State of Pernambuco, Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46, 484–489.
- Alcántar-Escalera, F. J., García-Varela, M., Vázquez-Domínguez, E., & Pérez-Ponce de León, G. (2013). Using DNA barcoding to link cystacanths and adults of the acanthocephalan *P. olynthus brevis* in central Mexico. *Molecular Ecology Resources*, 13(6), 1116–1124.
- Ali, Q., Ahmar, S., Sohail, M. A., Kamran, M., Ali, M., Saleem, M. H., Rizwan, M., Ahmed, A. M., Mora-Poblete, F., do Amaral Júnior, A. T., & others. (2021). Research advances and applications of biosensing technology for the diagnosis of pathogens in sustainable agriculture. *Environmental Science and Pollution Research*, 28, 9002–9019.
- Andersson, L. (1990). The driving force: Species concepts and ecology. *Taxon*, 39(3), 375–382.
- Arabi, J., Judson, M. L., Deharveng, L., Lourenço, W. R., Cruaud, C., & Hassanin, A. (2012). Nucleotide composition of CO1 sequences in Chelicerata (Arthropoda): Detecting new mitogenomic rearrangements. *Journal of Molecular Evolution*, 74, 81–95.
- Araujo, D., Schneider, M. C., Paula-Neto, E., & Cella, D. M. (2024). *The spider cytogenetic database. Version 13.0.* www.arthropodacytogenetics.bio.br/spiderdatabase
- Ávila Herrera, I. M., Král, J., Pastuchová, M., Forman, M., Musilová, J., Kořínková, T., Štáhlavský, F., Zrzavá, M., Nguyen, P., Just, P., & others. (2021). Evolutionary pattern of karyotypes and meiosis in pholcid spiders (Araneae: Pholcidae): Implications for reconstructing chromosome evolution of araneomorph spiders. *BMC Ecology and Evolution*, 21(1), 75.
- Azevedo, G. H., Bougie, T., Carboni, M., Hedin, M., & Ramírez, M. J. (2022). Combining genomic, phenotypic and Sanger sequencing data to elucidate the phylogeny of the two-clawed spiders (Dionycha). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 166, 107327.
- Azevedo, G. H., Griswold, C. E., & Santos, A. J. (2018). Systematics and evolution of ground spiders revisited (Araneae, Dionycha, Gnaphosidae). *Cladistics*, 34(6), 579–626.
- Baker, M. C. (1991). Response of male indigo and lazuli buntings and their hybrids to song playback in allopatric and sympatric populations. *Behaviour*, 119(3–4), 225–242.

- Baker, R. J., & Bradley, R. D. (2006). Speciation in mammals and the genetic species concept. *Journal of Mammalogy*, 87(4), 643–662.
- Bakhshandeh, B., Nateghi, S. S., Gazani, M. M., Dehghani, Z., & Mohammadzadeh, F. (2021). A review on advances in the applications of spider silk in biomedical issues. *International Journal of Biological Macromolecules*, 192, 258–271.
- Bartlow, A. W., & Agosta, S. J. (2021). Phoresy in animals: Review and synthesis of a common but understudied mode of dispersal. *Biological Reviews*, 96(1), 223–246.
- Bayram, A. (1995). Diurnal activity of *alopocosa pulverulent a* (Clerck 1757)(Lycosidae, Araneae). *Communications Faculty of Sciences University of Ankara Series C Biology*, 13.
- Beier, M. (1963). Ordnung Pseudoscorpionidea (Afterskorpione). *Bestimmungsbucher Zur Bodenfauna Europas*, 1, 1–313.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2012). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D36–D42.
- Bezerra, A. M. R., Castiglia, R., Pereira, L. G., Moreira, J. C., & Bonvicino, C. R. (2020). Molecular systematics of the genus *Necromys* (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) reveals two cryptic and syntopic species in western Cerrado of Brazil. *Zoologischer Anzeiger*, 285, 147–158.
- Bond, J. E., Godwin, R. L., Colby, J. D., Newton, L. G., Zahnle, X. J., Agnarsson, I., Hamilton, C. A., & Kuntner, M. (2022). Improving Taxonomic Practices and Enhancing Its Extensibility—An Example from Araneology. *Diversity*, 14(1), Article 1. <https://doi.org/10.3390/d14010005>
- Boumans, L., & Johnsen, A. (2014). Species-specific communication bars interspecific mating between syntopic species of *Zwicknia* stoneflies (Plecoptera: Capniidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 113(4), 969–980. <https://doi.org/10.1111/bij.12372>
- Buchinger, T. J., & Li, W. (2020). The evolution of (non) species-specific pheromones. *Evolutionary Ecology*, 34(4), 455–468.
- Cabezas-Cruz, A. (2023). Grand challenges in arachnid microbiota and diseases. In *Frontiers in Arachnid Science* (Vol. 2, p. 1215831). Frontiers Media SA.
- Carstens, B. C., Pelletier, T. A., Reid, N. M., & Satler, J. D. (2013). How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology*, 22(17), 4369–4383.
- Cavenagh, A. F., Rincão, M. P., Dias, F. C., Brescovit, A. D., & Dias, A. L. (2022). Chromosomal diversity in three species of *Lycosa* Latreille, 1804 (Araneae, Lycosidae): Inferences on diversification of diploid number and sexual chromosome systems in Lycosinae. *Genetics and Molecular Biology*, 45(1), e20200440.
- Chang, C.-H., Tsai, M.-L., Huang, T.-T., & Wang, Y.-C. (2021). Authentication of fish species served in conveyor-belt sushi restaurants in Taiwan using DNA barcoding. *Food Control*, 130, 108264.
- Chiarle, A., & Isaia, M. (2013). Signal complexity and modular organization of the courtship behaviours of two sibling species of wolf spiders (Araneae: Lycosidae). *Behavioural Processes*, 97, 33–40.
- Chiarle, A., Kronestedt, T., & Isaia, M. (2013). Courtship behavior in European species of the genus *Pardosa* (Araneae, Lycosidae). *The Journal of Arachnology*, 41(2), 108–125.

- Christophoryová, J., Krajčovičová, K., Štáhlavský, F., Španiel, S., & Opatova, V. (2023). Integrative Taxonomy Approach Reveals Cryptic Diversity within the Phoretic Pseudoscorpion Genus *Lamprochernes* (Pseudoscorpiones: Chernetidae). *Insects*, 14(2), 122.
- Christophoryova, J., Štáhlavský, F., & Fedor, P. (2011). An updated identification key to the pseudoscorpions (Arachnida: Pseudoscorpiones) of the Czech Republic and Slovakia. *Zootaxa*, 2876(1), 35–48.
- Clement, M., Posada, D., & Crandall, K. A. (2000). TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9(10), 1657–1659.
- Clemente, C. J., McMaster, K. A., Fox, E., Meldrum, L., Stewart, T., & Main, B. Y. (2010). The visual system of the Australian wolf spider *Lycosa leuckartii* (Araneae: Lycosidae): Visual acuity and the functional role of the eyes. *The Journal of Arachnology*, 38(3), 398–406.
- Clouse, R. M., Branstetter, M. G., Buenavente, P., Crowley, L. M., Czekanski-Moir, J., General, D. E. M., Giribet, G., Harvey, M. S., Janies, D. A., Mohagan, A. B., & others. (2017). First global molecular phylogeny and biogeographical analysis of two arachnid orders (Schizomida and Uropygi) supports a tropical Pangean origin and mid-Cretaceous diversification. *Journal of Biogeography*, 44(11), 2660–2672.
- Cobbold, S., & MacMahon, J. (2012). Guild mobility affects spider diversity: Links between foraging behavior and sensitivity to adjacent vegetation structure. *Basic and Applied Ecology*, 13(7), 597–605.
- Crites, J. L. (1962). Morphology as a basis of identification and classification of parasites. *The Journal of Parasitology*, 652–655.
- Dahl, F. (1908). *Die Lycosiden oder Wolfspinnen Deutschlands und ihre Stellung im Haushalte der Natur: Nach statistischen Untersuchungen dargestellt* (Vol. 88). Halle.
- Dahlem, B., Gack, C., & Martens, J. (1987). Balzverhalten von Wolfspinnen der Gattung *Alopecosa* (Arachnida: Lycosidae). *Zoologische Beiträge (NF)*, 31, 151–164.
- Davidson-Watts, I., Walls, S., & Jones, G. (2006). Differential habitat selection by *Pipistrellus pipistrellus* and *Pipistrellus pygmaeus* identifies distinct conservation needs for cryptic species of echolocating bats. *Biological Conservation*, 133(1), 118–127.
- De Queiroz, K. (2005). A unified concept of species and its consequences for the future of taxonomy. *Proceedings of the California Academy of Sciences*.
- De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56(6), 879–886.
- Delić, T., Trontelj, P., Rendoš, M., & Fišer, C. (2017). The importance of naming cryptic species and the conservation of endemic subterranean amphipods. *Scientific Reports*, 7(1), 3391.
- Derkarabetian, S., Castillo, S., Koo, P. K., Ovchinnikov, S., & Hedin, M. (2019). A demonstration of unsupervised machine learning in species delimitation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 139, 106562.
- Dernburg, A. F. (2001). Here, there, and everywhere: Kinetochore function on holocentric chromosomes. *The Journal of Cell Biology*, 153(6), F33–F38.

- DeSalle, R., & Goldstein, P. (2019). Review and interpretation of trends in DNA barcoding. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7, 302.
- deWaard, J. R., Levesque-Beaudin, V., deWaard, S. L., Ivanova, N. V., McKeown, J. T., Miskie, R., Naik, S., Perez, K. H., Ratnasingham, S., & Sobel, C. N. (2019). Expedited assessment of terrestrial arthropod diversity by coupling Malaise traps with DNA barcoding. *Genome*, 62(3), 85–95.
- DeWaard, J. R., Ratnasingham, S., Zakharov, E. V., Borisenko, A. V., Steinke, D., Telfer, A. C., Perez, K. H., Sones, J. E., Young, M. R., & Levesque-Beaudin, V. (2019). A reference library for Canadian invertebrates with 1.5 million barcodes, voucher specimens, and DNA samples. *Scientific Data*, 6(1), 308.
- Dondale, C. D. (1964). Sexual behavior and its application to a species problem in the spider genus *Philodromus* (Araneae: Thomisidae). *Canadian Journal of Zoology*, 42(5), 817–827.
- Dunlop, J. A. (2010). Geological history and phylogeny of Chelicerata. *Arthropod Structure & Development*, 39(2–3), 124–142.
- Dupuis, J. R., Roe, A. D., & Sperling, F. A. (2012). Multi-locus species delimitation in closely related animals and fungi: One marker is not enough. *Molecular Ecology*, 21(18), 4422–4436.
- Edwards, D. L., & Knowles, L. L. (2014). Species detection and individual assignment in species delimitation: Can integrative data increase efficacy? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1777), 20132765.
- Elias, D. O., Mason, A. C., & Hoy, R. R. (2004). The effect of substrate on the efficacy of seismic courtship signal transmission in the jumping spider *Habronattus dossenus* (Araneae: Salticidae). *Journal of Experimental Biology*, 207(23), 4105–4110.
- Fisher, B. L., & Smith, M. A. (2008). A revision of Malagasy species of *Anochetus* mayr and *Odontomachus* latreille (Hymenoptera: Formicidae). *PLoS One*, 3(5), e1787.
- Fitzpatrick, M. J., & Gray, D. A. (2001). Divergence between the courtship songs of the field crickets *Gryllus texensis* and *Gryllus rubens* (Orthoptera, Gryllidae). *Ethology*, 107(12), 1075–1085.
- Fontaneto, D., Flot, J.-F., & Tang, C. Q. (2015). Guidelines for DNA taxonomy, with a focus on the meiofauna. *Marine Biodiversity*, 45, 433–451.
- Forman, M., Nguyen, P., Hula, V., & Král, J. (2013). Sex chromosome pairing and extensive NOR polymorphism in *Wadicosa fidelis* (Araneae: Lycosidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 141(1), 43–49.
- Frank, S.-C., Christensen, K., Lourenço, R., Harms, D., & Buzatto, B. (2023). Mating behavior of the Sydney funnel-web spider (Atracidae: *Atrax robustus*) and implications for the evolution of courtship in mygalomorph spiders. *Journal of Zoology*, 320(3), 169–178.
- Frankham, R., Ballou, J. D., Dudash, M. R., Eldridge, M. D., Fenster, C. B., Lacy, R. C., Mendelson III, J. R., Porton, I. J., Ralls, K., & Ryder, O. A. (2012). Implications of different species concepts for conserving biodiversity. *Biological Conservation*, 153, 25–31.
- Garcia, E. L., Hansen, Q. G., & Cushing, P. E. (2024). Camel spider trait evolution demonstrates repeated patterns of convergence (Arachnida: Solifugae: Eremobatidae). *Insect Systematics and Diversity*, 8(1), 4.

Gerhardt, H. C. (1994). The evolution of vocalization in frogs and toads. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 293–324.

Girard, M. B., Elias, D. O., Azevedo, G., Bi, K., Kasumovic, M. M., Waldock, J. M., Rosenblum, E. B., & Hedin, M. (2021). Phylogenomics of peacock spiders and their kin (Salticidae: Maratus), with implications for the evolution of male courtship displays. *Biological Journal of the Linnean Society*, 132(3), 471–494. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blaa165>

Grzywacz, A., Jarmusz, M., Walczak, K., Skowronek, R., Johnston, N. P., & Szpila, K. (2021). DNA barcoding identifies unknown females and larvae of *Fannia* R.-D. (Diptera: Fanniidae) from carrion succession experiment and case report. *Insects*, 12(5), 381.

Guo, R., Guo, G., Wang, A., Xu, G., Lai, R., & Jin, H. (2023). Spider-Venom Peptides: Structure, Bioactivity, Strategy, and Research Applications. *Molecules*, 29(1), 35.

Hajibabaei, M., Singer, G. A., Hebert, P. D., & Hickey, D. A. (2007). DNA barcoding: How it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *TRENDS in Genetics*, 23(4), 167–172.

Harms, D., Roberts, J. D., & Harvey, M. S. (2019). Climate variability impacts on diversification processes in a biodiversity hotspot: A phylogeography of ancient pseudoscorpions in south-western Australia. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 186(4), 934–949. <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlz010>

Harrison, S. E., Guzik, M. T., Harvey, M. S., & Austin, A. D. (2014). Molecular phylogenetic analysis of Western Australian troglobitic chthoniid pseudoscorpions (Pseudoscorpiones: Chthoniidae) points to multiple independent subterranean clades. *Invertebrate Systematics*, 28(4), 386–400.

Hashimoto, D., Ferguson-Smith, M., Rens, W., Foresti, F., & Porto-Foresti, F. (2011). Chromosome mapping of H1 histone and 5S rRNA gene clusters in three species of *Astyanax* (Teleostei, Characiformes). *Cytogenetic and Genome Research*, 134(1), 64–71.

Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313–321.

Hebert, P. D., Ratnasingham, S., & De Waard, J. R. (2003). Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(suppl_1), S96–S99.

Hebets, E. A. (2008). Seismic signal dominance in the multimodal courtship display of the wolf spider *Schizocosa stridulans* Stratton 1991. *Behavioral Ecology*, 19(6), 1250–1257.

Hebets, E. A., & Uetz, G. W. (2000). Leg ornamentation and the efficacy of courtship display in four species of wolf spider (Araneae: Lycosidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 47, 280–286.

Hedin, M. C. (2001). Molecular insights into species phylogeny, biogeography, and morphological stasis in the ancient spider genus *Hypochilus* (Araneae: Hypochilidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 18(2), 238–251.

Hey, J. (2009). Why should we care about species. *Nature Education*, 2(2).

- Hlebec, D., Podnar, M., Kučinić, M., & Harms, D. (2023). Molecular analyses of pseudoscorpions in a subterranean biodiversity hotspot reveal cryptic diversity and microendemism. *Scientific Reports*, 13(1), 430.
- Hoang, M. T. V., Irinyi, L., Chen, S. C., Sorrell, T. C., Group, I. B. of M. F. W., & Meyer, W. (2019). Dual DNA barcoding for the molecular identification of the agents of invasive fungal infections. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1647.
- Hofmann, I., & Haupt, J. (1990). Spatial and temporal distribution of five syntopic species of the genus *Alopecosa* (Araneae, Lycosidae) and some remarks on their ecology. *Bulletin of European Society of Arachnology*, 1, 153–158.
- Hooper, D. M., Griffith, S. C., & Price, T. D. (2019). Sex chromosome inversions enforce reproductive isolation across an avian hybrid zone. *Molecular Ecology*, 28(6), 1246–1262.
- Hsu, T., & Pomerat, C. M. (1953). Mammalian chromosomes in vitro: II. A method for spreading the chromosomes of cells in tissue culture. *Journal of Heredity*, 44(1), 23–30.
- Hubert, N., Hanner, R., Holm, E., Mandrak, N. E., Taylor, E., Burrridge, M., Watkinson, D., Dumont, P., Curry, A., Bentzen, P., & others. (2008). Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *PLoS One*, 3(6), e2490.
- Jindrova, H., Hiřman, M., Sadilek, D., Bezděčka, P., & Št'áhlavský, F. (2020). Distribution of 18S rDNA clusters in Central European harvestmen of the suborder Eupnoi (Arachnida: Opiliones). *European Journal of Entomology*, 117.
- Johnson, N. S., Lewandoski, S. A., & Merkes, C. (2021). Assessment of sea lamprey (*Petromyzon marinus*) diet using DNA metabarcoding of feces. *Ecological Indicators*, 125, 107605.
- Karbstein, K., Kösters, L., Hodač, L., Hofmann, M., Hörandl, E., Tomasello, S., Wagner, N. D., Emerson, B. C., Albach, D. C., Scheu, S., & others. (2024). Species delimitation 4.0: Integrative taxonomy meets artificial intelligence. *Trends in Ecology & Evolution*, 39(8), 771–784.
- Kekkonen, M., & Hebert, P. D. (2014). DNA barcode-based delineation of putative species: Efficient start for taxonomic workflows. *Molecular Ecology Resources*, 14(4), 706–715.
- Kira, S., Namba, T., Hiraishi, M., Nakamura, T., Otani, Y., Kon, Y., & Ichii, O. (2024). Species-specific histological characterizations of renal tubules and collecting ducts in the kidneys of cats and dogs. *PloS One*, 19(7), e0306479.
- Kovářík, F., Lowe, G., Just, P., Ibrahim Awale, A., Sh Abdirahman Elmi, H., & Št'áhlavský, F. (2018). Scorpions of the Horn of Africa (Arachnida: Scorpiones). Part XV. Review of the genus *Gint* Kovářík et al., 2013, with description of three new species from Somaliland (Scorpiones, Buthidae). *Euscorpius*, 2018(259), 1–41.
- Kovářík, F., Lowe, G., Št'áhlavský, F., & Just, P. (2022). The genus *Barbaracurus* in Saudi Arabia (Scorpiones: Buthidae), with description of a new species. *Euscorpius*, 2022(365), 1–26.
- Kovářík, F., & Št'áhlavský, F. (2019). Revision of the genus *Reddyanus* from Southeast Asia, with description of five new species from Cambodia, Malaysia, Thailand and Vietnam (Scorpiones: Buthidae). *Euscorpius*, 2019(295), 1–45.
- Král, J., Forman, M., Kořínková, T., Lerma, A. C. R., Haddad, C. R., Musilová, J., Řezáč, M., Herrera, I. M. Á., Thakur, S., Dippenaar-Schoeman, A. S., & others. (2019). Insights into the karyotype and

genome evolution of haplogyne spiders indicate a polyploid origin of lineage with holokinetic chromosomes. *Scientific Reports*, 9(1), 3001.

Král, J., Kořínková, T., Forman, M., & Kravcová, L. (2011). Insights into the meiotic behavior and evolution of multiple sex chromosome systems in spiders. *Cytogenetic and Genome Research*, 133(1), 43–66.

Král, J., Kořínková, T., Kravcová, L., Musilová, J., Forman, M., Herrera, I. M. Á., Haddad, C. R., Vítková, M., Henriques, S., Vargas, J. G. P., & others. (2013). Evolution of karyotype, sex chromosomes, and meiosis in mygalomorph spiders (Araneae: Mygalomorphae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 109(2), 377–408.

Král, J., Kováč, L., Štáhlavský, F., Lonský, P., & L'uptáčík, P. (2008). The first karyotype study in palpigrades, a primitive order of arachnids (Arachnida: Palpigradi). *Genetica*, 134, 79–87.

Král, J., Musilová, J., Štáhlavský, F., Řezáč, M., Akan, Z., Edwards, R. L., Coyle, F. A., & Almerje, C. R. (2006). Evolution of the karyotype and sex chromosome systems in basal clades of araneomorph spiders (Araneae: Araneomorphae). *Chromosome Research*, 14, 859–880.

Kronstedt, T. (1990). Separation of two species standing as *Alopecosa aculeata* (Clerck) by morphological, behavioural and ecological characters, with remarks on related species in the pulverulenta group (Araneae, Lycosidae). *Zoologica Scripta*, 19(2), 203–225.

Kulkarni, S., Wood, H. M., & Hormiga, G. (2023). Advances in the reconstruction of the Spider Tree of Life: A roadmap for spider systematics and comparative studies. *Cladistics*, 39(6), 479–532.

Kuntner, M., & Agnarsson, I. (2011). Phylogeography of a successful aerial disperser: The golden orb spider *Nephila* on Indian Ocean islands. *BMC Evolutionary Biology*, 11, 1–10.

Lee, V. M., Kuntner, M., & Li, D. (2015). Ballooning behavior in the golden orbweb spider *Nephila pilipes* (Araneae: Nephilidae). *Frontiers in Ecology and Evolution*, 3, 2.

Lopez-Vaamonde, C., Kirichenko, N., Cama, A., Doorenweerd, C., Godfray, H. C. J., Guiguet, A., Gomboc, S., Huemer, P., Landry, J.-F., Laštůvka, A., & others. (2021). Evaluating DNA barcoding for species identification and discovery in European gracillariid moths. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 9, 626752.

Lozano-Fernandez, J., Tanner, A. R., Puttick, M. N., Vinther, J., Edgecombe, G. D., & Pisani, D. (2020). A Cambrian–Ordovician Terrestrialization of Arachnids. *Frontiers in Genetics*, 11. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2020.00182>

Lugetti, G., & Tongiorgi, P. (1969). Ricerche sul genere *Alopecosa* Simon (Araneae-Lycosidae). *Atti Della Societa Toscana Di Scienze Naturali, Memorie, Serie B*, 76, 1–100.

Lukhtanov, V. (2019). Species delimitation and analysis of cryptic species diversity in the XXI century. *Entomological Review*, 99, 463–472.

Lukhtanov, V. A., Dincă, V., Friberg, M., Šíchová, J., Olofsson, M., Vila, R., Marec, F., & Wiklund, C. (2018). Versatility of multivalent orientation, inverted meiosis, and rescued fitness in holocentric chromosomal hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(41), E9610–E9619.

Luo, A., Ling, C., Ho, S. Y., & Zhu, C.-D. (2018). Comparison of methods for molecular species delimitation across a range of speciation scenarios. *Systematic Biology*, 67(5), 830–846.

- Madden, M. J., Young, R. G., Brown, J. W., Miller, S. E., Frewin, A. J., & Hanner, R. H. (2019). Using DNA barcoding to improve invasive pest identification at US ports-of-entry. *PLoS One*, *14*(9), e0222291.
- Maes, L., Vanacker, D., Pardo, S., & Maelfait, J.-P. (2004). Comparative study of courtship and copulation in five Oedothorax species. *Belgian Journal of Zoology*, *134*(2), 29–35.
- Maggioni, D., Schiavo, A., Ostrovsky, A. N., Seveso, D., Galli, P., Arrigoni, R., Berumen, M. L., Benzoni, F., & Montano, S. (2020). Cryptic species and host specificity in the bryozoan-associated hydrozoan Zanclea divergens (Hydrozoa, Zancleidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *151*, 106893.
- Mallet, J. (2005). Speciation in the 21st century. *Heredity*, *95*(1), 105–109.
- Mallott, E. K., & Amato, K. R. (2021). Host specificity of the gut microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(10), 639–653.
- Maltseva, A. L., Varfolomeeva, M. A., Ayanka, R. V., Gafarova, E. R., Repkin, E. A., Pavlova, P. A., Shavarda, A. L., Mikhailova, N. A., & Granovitch, A. I. (2021). Linking ecology, morphology, and metabolism: Niche differentiation in sympatric populations of closely related species of the genus Littorina (Neritrema). *Ecology and Evolution*, *11*(16), 11134–11154.
- Martins, E. P. (1996). *Phylogenies and the comparative method in animal behavior*. Oxford University Press, USA.
- Mattos, V. F., Carvalho, L. S., Carvalho, M. A., & Schneider, M. C. (2018). Insights into the origin of the high variability of multivalent-meiotic associations in holocentric chromosomes of Tityus (Archaeotityus) scorpions. *PLoS One*, *13*(2), e0192070.
- Meltzer, P. S., Guan, X.-Y., & Trent, J. M. (1993). Telomere capture stabilizes chromosome breakage. *Nature Genetics*, *4*(3), 252–255.
- Miller, W. (2001). The structure of species, outcomes of speciation and the ‘species problem’: Ideas for paleobiology. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, *176*(1–4), 1–10.
- Montanarin, A., Kaefer, I. L., & Lima, A. P. (2011). Courtship and mating behaviour of the brilliant-thighed frog Allobates femoralis from Central Amazonia: Implications for the study of a species complex. *Ethology Ecology & Evolution*, *23*(2), 141–150.
- Movin, N., Gamova, T., Surmach, S. G., Slaght, J. C., Kisleiko, A., Eaton, J. A., & Rheindt, F. E. (2022). Using bioacoustic tools to clarify species delimitation within the Blakiston’s Fish Owl (Bubo blakistoni) complex. *Avian Research*, *13*, 100021.
- Murienne, J., Karaman, I., & Giribet, G. (2010). Explosive evolution of an ancient group of Cyphophthalmi (Arachnida: Opiliones) in the Balkan Peninsula. *Journal of Biogeography*, *37*(1), 90–102.
- Muster, C., Spelda, J., Rulik, B., Thormann, J., von der Mark, L., & Astrin, J. J. (2021). The dark side of pseudoscorpion diversity: The German Barcode of Life campaign reveals high levels of undocumented diversity in European false scorpions. *Ecology and Evolution*, *11*(20), 13815–13829.
- Nelson, G., & Platnick, N. (1981). *Systematics and biogeography*.

- Neves, J. M., Almeida, J. P., Sturaro, M. J., Fabre, N. N., Pereira, R. J., & Mott, T. (2020). Deep genetic divergence and paraphyly in cryptic species of Mugil fishes (Actinopterygii: Mugilidae). *Systematics and Biodiversity*, 18(2), 116–128.
- Obrist, M. K., Pavan, G., Sueur, J., Riede, K., Llusia, D., Márquez, R., & others. (2010). Bioacoustics approaches in biodiversity inventories. *Abc Taxa*, 8, 68–99.
- Oh, J.-H., Kim, S., & Lee, S. (2022). DNA barcodes reveal population-dependent cryptic diversity and various cases of sympatry of Korean leptonetid spiders (Araneae: Leptonetidae). *Scientific Reports*, 12(1), 15528.
- Ohira, H., Sato, K., Tsutsumi, T., Kaneko, S., & Choi, H.-J. (2018). DNA barcoding suggested the existence of cryptic species and high biodiversity of South Korean pseudoscorpions (Arachnida, Pseudoscorpiones). *Journal of Asia-Pacific Biodiversity*, 11(3), 399–407.
- Ojanguren-Affilastro, A. A., Adilardi, R. S., Cajade, R., Ramirez, M. J., Ceccarelli, F. S., & Mola, L. M. (2017). Multiple approaches to understanding the taxonomic status of an enigmatic new scorpion species of the genus Tityus (Buthidae) from the biogeographic island of Paraje Tres Cerros (Argentina). *PloS One*, 12(7), e0181337.
- Oliveira, I. S., Lacorte, G. A., Fonseca, C. G., Wieloch, A. H., & Mayer, G. (2011). Cryptic speciation in Brazilian Epiperipatus (Onychophora: Peripatidae) reveals an underestimated diversity among the peripatid velvet worms. *Plos One*, 6(6), e19973.
- Opatova, V., Bond, J. E., & Arnedo, M. A. (2016). Uncovering the role of the Western Mediterranean tectonics in shaping the diversity and distribution of the trap-door spider genus Ummidia (Araneae, Ctenizidae). *Journal of Biogeography*, 43(10), 1955–1966.
- Opatova, V., Bourguignon, K., & Bond, J. E. (2024). Species delimitation with limited sampling: An example from rare trapdoor spider genus Cyclocosmia (Mygalomorphae, Halonoproctidae). *Molecular Ecology Resources*, 24(3), e13894.
- Opatova, V., & Štáhlavský, F. (2018). Phoretic or not? Phylogeography of the pseudoscorpion *Chernes hahnii* (Pseudoscorpiones: Chernetidae). *The Journal of Arachnology*, 46(1), 104–113.
- Ortiz, D., & Francke, O. F. (2016). Two DNA barcodes and morphology for multi-method species delimitation in Bonnetina tarantulas (Araneae: Theraphosidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 101, 176–193.
- Parmakelis, A., Kotsakiozi, P., Stathi, I., Poulikarakou, S., & Fet, V. (2013). Hidden diversity of Euscorpius (Scorpiones: Euscorpiidae) in Greece revealed by multilocus species-delimitation approaches. *Biological Journal of the Linnean Society*, 110(4), 728–748.
- Pennaneach, V., Putnam, C. D., & Kolodner, R. D. (2006). Chromosome healing by de novo telomere addition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 59(5), 1357–1368.
- Petzold, A., & Hassanin, A. (2020). A comparative approach for species delimitation based on multiple methods of multi-locus DNA sequence analysis: A case study of the genus *Giraffa* (Mammalia, Cetartiodactyla). *PLoS One*, 15(2), e0217956.
- Pfeiler, E., Bitler, B. G., Castrezana, S., Matzkin, L. M., & Markow, T. A. (2009). Genetic diversification and demographic history of the cactophilic pseudoscorpion *Dinocheirus arizonensis* from the Sonoran Desert. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52(1), 133–141.

- Pfingstl, T., Lienhard, A., Baumann, J., & Koblmüller, S. (2021). A taxonomist's nightmare—Cryptic diversity in Caribbean intertidal arthropods (Arachnida, Acari, Oribatida). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 163, 107240.
- Piacentini, L. N., & Ramírez, M. J. (2019). Hunting the wolf: A molecular phylogeny of the wolf spiders (Araneae, Lycosidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 136, 227–240.
- Pinto-da-Rocha, R., Machado, G., & Giribet, G. (2007). *Harvestmen: The biology of Opiliones*. Harvard University Press.
- Plíšková, J., Kovařík, F., Košulič, O., & Štáhlavský, F. (2016). Description of a new species of *Heterometrus* Ehrenberg, 1828 (Scorpiones: Scorpionidae) from Thailand with remarks about the utilization of cytogenetic data in taxonomy of the genus. *Annales Zoologici*, 66(3), 467–476.
- Poinar Jr, G. O., Curcic, B. P., & Cokendolpher, J. C. (1998). Arthropod phoresy involving pseudoscorpions in the past and present. *Acta Arachnologica*, 47(2), 79–96.
- Pons, J., Barraclough, T. G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D. P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W. D., & Vogler, A. P. (2006). Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology*, 55(4), 595–609.
- Ptacek, M. B. (2000). The role of mating preferences in shaping interspecific divergence in mating signals in vertebrates. *Behavioural Processes*, 51(1–3), 111–134.
- Puillandre, N., Brouillet, S., & Achaz, G. (2021). ASAP: assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources*, 21(2), 609–620.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., & Achaz, G. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21(8), 1864–1877. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>
- Pyron, R. A. (2023). Unsupervised machine learning for species delimitation, integrative taxonomy, and biodiversity conservation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 189, 107939.
- Pyron, R. A., O'Connell, K. A., Duncan, S. C., Burbrink, F. T., & Beamer, D. A. (2023). Speciation hypotheses from phylogeographic delimitation yield an integrative taxonomy for Seal Salamanders (*Desmognathus monticola*). *Systematic Biology*, 72(1), 179–197.
- Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. (2007). BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.Barcodinglife.Org>). *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355–364.
- Regan, P. A., Foulke, G. T., & Usedom, E. J. (2020). Arachnida: Spiders and scorpions. *Dermatological Manual of Outdoor Hazards*, 73–87.
- Rego, A., & Marec, F. (2003). Telomeric and interstitial telomeric sequences in holokinetic chromosomes of Lepidoptera: Telomeric DNA mediates association between postpachytene bivalents in achiasmatic meiosis of females. *Chromosome Research*, 11, 681–694.
- Renou, M., & Anton, S. (2020). Insect olfactory communication in a complex and changing world. *Current Opinion in Insect Science*, 42, 1–7.
- Reveillion, F., Wattier, R., Montuire, S., Carvalho, L. S., & Bollache, L. (2020). Cryptic diversity within three South American whip spider species (Arachnida, Amblypygi). *Zoological Research*, 41(5), 595.

- Reyes Lerma, A. C., Štáhlavský, F., Seiter, M., Carabajal Paladino, L. Z., Divišová, K., Forman, M., Sember, A., & Král, J. (2021). Insights into the karyotype evolution of Charinidae, the early-diverging clade of whip spiders (Arachnida: Amblypygi). *Animals*, 11(11), 3233.
- Rohner, P. T., & Moczek, A. P. (2020). Rapid differentiation of plasticity in life history and morphology during invasive range expansion and concurrent local adaptation in the horned beetle *Onthophagus taurus*. *Evolution*, 74(9), 2059–2072.
- Rovatsos, M., Mazzoleni, S., Augstenová, B., Altmanová, M., Velenský, P., Glaw, F., Sanchez, A., & Kratochvíl, L. (2024). Heteromorphic ZZ/ZW sex chromosomes sharing gene content with mammalian XX/XY are conserved in Madagascan chameleons of the genus *Furcifer*. *Scientific Reports*, 14(1), 4898.
- Rypstra, A. L., Schlosser, A. M., Sutton, P. L., & Persons, M. H. (2009). Multimodal signalling: The relative importance of chemical and visual cues from females to the behaviour of male wolf spiders (Lycosidae). *Animal Behaviour*, 77(4), 937–947.
- Saba, M., Awan, D., & Yousaf, S. (2020). Spider as a biological agent in pest control-A Review. *J Wildlife Manag*, 4, 27–34.
- Santibáñez-López, C. E., González-Santillán, E., Monod, L., & Sharma, P. P. (2019). Phylogenomics facilitates stable scorpion systematics: Reassessing the relationships of Vaejovidae and a new higher-level classification of Scorpiones (Arachnida). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 135, 22–30.
- Sassi, F. de M. C., Deon, G. A., Sember, A., Liehr, T., Oyakawa, O. T., Moreira Filho, O., Bertollo, L. A. C., Vicari, M. R., & Cioffi, M. de B. (2023). Turnover of multiple sex chromosomes in Harttia catfish (Siluriformes, Loricariidae): A glimpse from whole chromosome painting. *Frontiers in Genetics*, 14, 1226222.
- Sato, S., Derkarabetian, S., Valdez-Mondragón, A., Pérez-González, A., Benavides, L. R., Daniels, S. R., & Giribet, G. (2024). Under the hood: Phylogenomics of hooded tick spiders (Arachnida, Ricinulei) uncovers discordance between morphology and molecules. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 193, 108026.
- Schenk, J., Kleinbölting, N., & Traunspurger, W. (2020). Comparison of morphological, DNA barcoding, and metabarcoding characterizations of freshwater nematode communities. *Ecology and Evolution*, 10(6), 2885–2899.
- Schneider, M. C., Mattos, V. F., & Cella, D. M. (n.d.). *The Scorpion Cytogenetic Database. Version 12.0*. Retrieved 20 October 2024, from www.arthropodacytogenetics.bio.br/scorpiondatabase
- Schneider, M. C., Zacaro, A. A., Pinto-da-Rocha, R., Candido, D. M., & Cella, D. M. (2009). Complex meiotic configuration of the holocentric chromosomes: The intriguing case of the scorpion *Tityus bahiensis*. *Chromosome Research*, 17, 883–898.
- Schönhofer, A. L., & Martens, J. (2010). Hidden Mediterranean diversity: Assessing species taxa by molecular phylogeny within the opilionid family Trogulidae (Arachnida, Opiliones). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54(1), 59–75.
- Schuchmann, K.-L., Weller, A.-A., & Juergens, D. (2016). Biogeography and taxonomy of racket-tail hummingbirds (Aves: Trochilidae: Ocreatus): Evidence for species delimitation from morphology and display behavior. *Zootaxa*, 4200(1), 83–108.

- Sember, A., Pappová, M., Forman, M., Nguyen, P., Marec, F., Dalíková, M., Divišová, K., Doležalková-Kaštánková, M., Zrzavá, M., Sadílek, D., & others. (2020). Patterns of sex chromosome differentiation in spiders: Insights from comparative genomic hybridisation. *Genes*, 11(8), 849.
- Sembiring, A., Pertiwi, N. P. D., Mahardini, A., Wulandari, R., Kurniasih, E. M., Kuncoro, A. W., Cahyani, N. D., Anggoro, A. W., Ulfa, M., Madduppa, H., & others. (2015). DNA barcoding reveals targeted fisheries for endangered sharks in Indonesia. *Fisheries Research*, 164, 130–134.
- Senapati, D., Bhattacharya, M., Kar, A., Chini, D. S., Das, B. K., & Patra, B. C. (2019). Environmental DNA (eDNA): A promising biological survey tool for aquatic species detection. *Proceedings of the Zoological Society*, 72, 211–228.
- Shakoori, A. R., Aftab, S., & Al-Ghanim, K. (2017). Structural changes in chromosomes. *Chromosome Structure and Aberrations*, 245–274.
- Shanahan, C. M. (1989). Cytogenetics of Australian scorpions. I. Interchange polymorphism in the family Buthidae. *Genome*, 32(5), 882–889.
- Sharma, P. P., Ballesteros, J. A., & Santibáñez-López, C. E. (2021). What is an “arachnid”? Consensus, consilience, and confirmation bias in the phylogenetics of Chelicerata. *Diversity*, 13(11), 568.
- Sharma, P. P., Fernández, R., Esposito, L. A., González-Santillán, E., & Monod, L. (2015). Phylogenomic resolution of scorpions reveals multilevel discordance with morphological phylogenetic signal. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1804), 20142953.
- Sharma, P. P., Kaluziak, S. T., Pérez-Porro, A. R., González, V. L., Hormiga, G., Wheeler, W. C., & Giribet, G. (2014). Phylogenomic interrogation of Arachnida reveals systemic conflicts in phylogenetic signal. *Molecular Biology and Evolution*, 31(11), 2963–2984.
- Shultz, J. W. (1990). Evolutionary morphology and phylogeny of Arachnida. *Cladistics*, 6(1), 1–38.
- Simon, C., Cooley, J. R., Karban, R., & Sota, T. (2022). Advances in the Evolution and Ecology of 13- and 17-Year Periodical Cicadas. In *Annual Review of Entomology* (Vol. 67, Issue Volume 67, 2022, pp. 457–482). Annual Reviews. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-072121-061108>
- Slice, D. E. (2007). Geometric morphometrics. *Annu. Rev. Anthropol.*, 36(1), 261–281.
- Smith, M. A., Wood, D. M., Janzen, D. H., Hallwachs, W., & Hebert, P. D. (2007). DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(12), 4967–4972.
- Sokolow, I. (1929). Untersuchungen über die Spermatogenese bei den Arachniden: IV. Über die Spermatogenese der Phalangiiden (Opiliones). *Zeitschrift Für Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, 10(1), 164–194.
- Squillace, S. P. (2020). Allergens of arthropods and birds. In *Bioaerosols* (pp. 133–148). CRC Press.
- Šťáhlavský, F., Kovařík, F., Stockmann, M., & Opatova, V. (2021). Karyotype evolution and preliminary molecular assessment of genera in the family Scorpiopidae (Arachnida: Scorpiones). *Zoology*, 144, 125882.

- Štáhlavský, F., & Král, J. (2004). Karyotype analysis and achiasmatic meiosis in pseudoscorpions of the family Chthoniidae (Arachnida: Pseudoscorpiones). *Hereditas*, 140(1), 49–60.
- Štáhlavský, F., Král, J., Harvey, M., & Haddad, C. (2012). The first cytogenetic characterization of atemnids: Pseudoscorpions with the highest chromosome numbers (Arachnida: Pseudoscorpiones). *Cytogenetic and Genome Research*, 137(1), 22–30.
- Štáhlavský, F., Štundlová, J., Lowe, G., Stockmann, M., & Kovařík, F. (2018). Application of cytogenetic markers in the taxonomy of flat rock scorpions (Scorpiones: Hormuridae), with the description of *Hadogenes weygoldti* sp. n. *Zoologischer Anzeiger*, 273, 173–182.
- Starrett, J., & Hedin, M. (2007). Multilocus genealogies reveal multiple cryptic species and biogeographical complexity in the California turret spider *Antrodiaetus riversi* (Mygalomorphae, Antrodiaetidae). *Molecular Ecology*, 16(3), 583–604.
- Starrett, J., McGinley, R. H., Hebets, E. A., & Bond, J. E. (2022). Phylogeny and secondary sexual trait evolution in *Schizocosa* wolf spiders (Araneae, Lycosidae) shows evidence for multiple gains and losses of ornamentation and species delimitation uncertainty. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 169, 107397.
- Stratton, G. E. (1997). A new species of *Schizocosa* from the southeastern USA (Araneae, Lycosidae). *Journal of Arachnology*, 84–92.
- Stratton, G. E., Hebets, E. A., Miller, P. R., & Miller, G. L. (1996). Pattern and duration of copulation in wolf spiders (Araneae, Lycosidae). *Journal of Arachnology*, 186–200.
- Stritih-Peljhan, N., Strauß, J., Wessel, A., & Hoch, H. (2022). Speleotremology: Ecology and Evolution of Vibrational Communication in Cavernicolous Insects. In *Biotremology: Physiology, Ecology, and Evolution* (pp. 307–340). Springer.
- Struck, T. H., Feder, J. L., Bendiksby, M., Birkeland, S., Cerca, J., Gusarov, V. I., Kistenich, S., Larsson, K.-H., Liow, L. H., Nowak, M. D., & others. (2018). Finding evolutionary processes hidden in cryptic species. *Trends in Ecology & Evolution*, 33(3), 153–163.
- Stuart, B. L., Inger, R. F., & Voris, H. K. (2006). High level of cryptic species diversity revealed by sympatric lineages of Southeast Asian forest frogs. *Biology Letters*, 2(3), 470–474.
- Štundlová, J. (2019). *Mechanismy karyotypové evoluce u štírů (Arachnida: Scorpiones)*.
- Štundlová, J., Hospodářská, M., Lukšíková, K., Voleníková, A., Pavlica, T., Altmanová, M., Richter, A., Reichard, M., Dalíková, M., Pelikánová, Š., & others. (2022). Sex chromosome differentiation via changes in the Y chromosome repeat landscape in African annual killifishes *Nothobranchius furzeri* and *N. kadleci*. *Chromosome Research*, 30(4), 309–333.
- Štundlová, J., Šmíd, J., Nguyen, P., & Štáhlavský, F. (2019). Cryptic diversity and dynamic chromosome evolution in Alpine scorpions (Euscorpiidae: Euscorpius). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 134, 152–163.
- Sullivan, G. T., & Ozman-Sullivan, S. K. (2021). Alarming evidence of widespread mite extinctions in the shadows of plant, insect and vertebrate extinctions. *Austral Ecology*, 46(1), 163–176.
- Szinetár, C., Eichardt, J., & Horváth, R. (2005). Data on the biology of *Alopecosa psammophila* Buchar 2001 (Araneae, Lycosidae). *Journal of Arachnology*, 384–389.

- Szudarek-Trepto, N., Kazmierski, A., & Dabert, J. (2021). Long-term stasis in acariform mites provides evidence for morphologically stable evolution: Molecular vs. Morphological differentiation in Linopodes (Acariformes; Prostigmata). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 163, 107237.
- Taketa, S., Ando, H., Takeda, K., & Von Bothmer, R. (2001). Physical locations of 5S and 18S-25S rDNA in Asian and American diploid *Hordeum* species with the I genome. *Heredity*, 86(5), 522–530.
- Topfer-Hofmann, G., Cordes, D., & Helversen, O. von. (2000). Cryptic species and behavioural isolation in the *Pardosa lugubris* group (Araneae, Lycosidae), with description of two new species. *BULLETIN-BRITISH ARACHNOLOGICAL SOCIETY*, 11(7), 257–274.
- Tsurusaki, N., & Cokendolpher, J. C. (1990). Chromosomes of sixteen species of harvestmen (Arachnida, Opiliones, Caddidae and Phalangiidae). *Journal of Arachnology*, 151–166.
- Tsurusaki, N., Jindrova, H., Schönhof, A. L., & Šťáhlavský, F. (2024). *The harvestmen cytogenetic database. Version 9.1*. www.arthropodacytogenetics.bio.br/harvestmendatabase
- Ubinski, C. V., Carvalho, L. S., & Schneider, M. C. (2018). Mechanisms of karyotype evolution in the Brazilian scorpions of the subfamily Centruroidinae (Buthidae). *Genetica*, 146, 475–486.
- Uetz, G., Clark, D., & Roberts, J. (2016). Multimodal communication in wolf spiders (Lycosidae)—An emerging model for study. In *Advances in the Study of Behavior* (Vol. 48, pp. 117–159). Elsevier.
- Uetz, G. W., & Norton, S. (2007). Preference for male traits in female wolf spiders varies with the choice of available males, female age and reproductive state. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61, 631–641.
- Unger, S. D., Williams, L. A., Diaz, L., & Jachowski, C. B. (2020). DNA barcoding to assess diet of larval eastern hellbenders in North Carolina. *Food Webs*, 22, e00134.
- Van Valen, L. (1976). Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon*, 233–239.
- Vázquez, M. M., Herrera, I. M. Á., Just, P., Lerma, A. C. R., Chatzaki, M., Heller, T. L., & Král, J. (2021). A new opilioacarid species (Parasitiformes: Opilioacarida) from Crete (Greece) with notes on its karyotype. *Acarologia*, 61(3), 548–563.
- Vermeesch, J. R., & Price, C. M. (1994). Telomeric DNA sequence and structure following de novo telomere synthesis in *Euplotes crassus*. *Molecular and Cellular Biology*.
- WAC, *World Arachnida Catalog*. (n.d.). Retrieved 10 October 2024, from <https://wac.nmbe.ch>
- Walter, A., & Bilde, T. (2015). Social recognition in the Arachnida. *Social Recognition in Invertebrates: The Knowns and the Unknowns*, 101–124.
- Wandeler, P., Hoeck, P. E., & Keller, L. F. (2007). Back to the future: Museum specimens in population genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(12), 634–642.
- Weyman, G. S. (1993). A review of the possible causative factors and significance of ballooning in spiders. *Ethology Ecology & Evolution*, 5(3), 279–291.
- Wheeler, W. C., Coddington, J. A., Crowley, L. M., Dimitrov, D., Goloboff, P. A., Griswold, C. E., Hormiga, G., Prendini, L., Ramírez, M. J., Sierwald, P., & others. (2017). The spider tree of life:

Phylogeny of Araneae based on target-gene analyses from an extensive taxon sampling. *Cladistics*, 33(6), 574–616.

Wilson, J. D., Bond, J. E., Harvey, M. S., Ramírez, M. J., & Rix, M. G. (2023). Correlation with a limited set of behavioral niches explains the convergence of somatic morphology in mygalomorph spiders. *Ecology and Evolution*, 13(1), e9706.

World Spider Catalog. Version 25.5. Natural History Museum Bern. (n.d.). Retrieved 10 October 2024, from <https://wsc.nmbe.ch>

Wrensch, D. L., Kethley, J. B., & Norton, R. A. (1994). Cytogenetics of holokinetic chromosomes and inverted meiosis: Keys to the evolutionary success of mites, with generalizations on eukaryotes. In *Mites: Ecological and evolutionary analyses of life-history patterns* (pp. 282–343). Springer.

Xu, X., Kuntner, M., Bond, J. E., Ono, H., Ho, S. Y., Liu, F., Yu, L., & Li, D. (2020). Molecular species delimitation in the primitively segmented spider genus *Heptathela* endemic to Japanese islands. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 151, 106900.

Yu, J., Wu, X., Liu, C., Newmaster, S., Ragupathy, S., & Kress, W. J. (2021). Progress in the use of DNA barcodes in the identification and classification of medicinal plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111691.

Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., & Stamatakis, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29(22), 2869–2876.

Zyuzin, A. A., & Logunov, D. V. (2000). New and little-known species of the Lycosidae from Azerbaijan, the Caucasus (Araneae, Lycosidae). *BULLETIN-BRITISH ARACHNOLOGICAL SOCIETY*, 11(8), 305–319.

7. Příloha: publikace zařazené do disertační práce