

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



Matyáš Hírman

**Karyotypová diferenciacie sekáčů podřádu
Cyphophthalmi (Arachnida: Opiliones) na Balkáně**
Karyotype differentiation of suborder Cyphophthalmi on
Balkan Peninsula (Arachnida: Opiliones)

Diplomová práce

Školitel: RNDr. František Štáhlavský, Ph.D.

Praha, 2017

Rád bych poděkoval svému školiteli RNDr. Františku Šťáhlavskému, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady a trpělivost při vedení diplomové práce. Za pomoc během práce vděčím také Mgr. Janě Plíškové a Mgr. Pavlu Justovi. Dále patří poděkování mé rodině, která mi studium umožňuje a podporuje mě.

Prohlášení:

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

V Praze,

Podpis

Abstrakt

Diplomová práce přináší cytogenetickou analýzu 13 druhů podřádu *Cyphophthalmi* patřící do rodu *Cyphophthalmus* vyskytující se na Balkánském poloostrově. Cytogenetické analýzy odhalily variabilitu v diploidním počtu pohybující se v rozmezí 24–30. V této práci byl poprvé identifikován pohlavní systém XY pro podřád *Cyphophthalmi*. Morfologické typy chromozómů, jejich velikostní rozrůznění a snižování diploidního počtu naznačuje, že hlavními chromozómovými přestavbami v rámci karyotypové evoluce rodu *Cyphophthalmus* jsou centrické či tandemové fúze. U 10 druhů byla provedena metoda FISH s nepřímo značenou sondou pro gen 18S rDNA. Ta odhalila variabilitu v počtu a distribuci NORů. Cytogenetická analýza byla doplněna o molekulárně fylogenetickou analýzu za použití třech genů (COI, 28S rRNA a histonu H3). Ta potvrdila distribuci druhů do čtyř skupin (Dinárská, Egejská, Gjorgjevici a Volos). Byla zjištěna obdobná mezidruhovú variabilita karyotypu v rámci jednotlivých skupin, která naznačuje, že k diferenciaci karyotypů v rámci jednotlivých skupin rodu *Cyphophthalmus* dochází nezávisle podobnými mechanizmy.

Klíčová slova: cytogenetika, molekulární fylogeneze, sekáči, *Cyphophthalmus*, FISH, Balkánský poloostrov, karyotypová evoluce

Abstract

Master thesis presents cytogenetics analysis of 13 species of suborder Cyphophthalmi belonging to the genus *Cyphophthalmus* originating at the Balkan Peninsula. Cytogenetics analysis discovered variability in diploid numbers 24–30. Thesis also presents first identification of sex chromosomes XY for suborder Cyphophthalmi. Morphological types of chromosomes, their variability in size and decreasing diploid numbers indicate that the main chromosome rearrangements during karyotype evolution of the genus *Cyphophthalmus* are centric or tandem fusions. FISH method with probe for gene 18S rDNA was applied in 10 species. That discovered variability in number and distribution of NORs. Cytogenetic analysis was supplemented by molecular phylogenetics analysis with use of 3 genes (COI, 28S rRNA and histon H3). That confirmed distribution of species into four groups (Dinarian, Aegean, Gjorgjevici and Volos). There was discovered similar interspecies variability of karyotype within individual groups, which suggests that the differentiation of karyotypes of genus *Cyphophthalmus* happens independently by similar mechanisms.

Keywords: cytogenetics, molecular phylogenetics, harvestmen, *Cyphophthalmus*, FISH, Balkan Peninsula, karyotype evolution

Slovník pojmů a seznam zkratek

BSA – hovězí sérový albumin (blokuje volná vazebná místa reaktantů)

COI – cytochrom oxidáza I

DAPI – 4',6–diamidino–2–phenylindol; fluorescenční barvivo vážící se na DNA

Denhardtův roztok – blokátor nespecifického nasednutí sondy (50x Denhardtův roztok: 2,5g Ficoll, 2,5g Polyvinilpyrolidon, 2,5g BSA, 250 ml H₂O)

FISH – Fluorescenční *in situ* hybridizace

Heteropyknóza – rozdílná barvitelnost chromozómů; pozitivní (tj. intenzivněji obarvené chromozómy) i negativní (tj. slaběji obarvené chromozómy).

NOR – nukleolární organizátor jadérka, část chromozomu, v němž se nachází geny pro rRNA

Outgroup – Nepatří do analyzované skupiny a slouží pro porovnání či stanovení výchozího stavu u analyzované skupiny

PBS – pufr; 8g NaCl, 0,2g KH₂PO₄, 2,3g Na₂HPO₄.12H₂O, 1000 ml H₂O, pH 7,3

PCR – polymerázová řetězová reakce

rDNA – úseky DNA kódující geny pro ribozomální RNA

Sørensenův pufr – 4,75g Na₂HPO₄.12H₂O, 4,54g KH₂PO₄, 1000 ml H₂O, pH 6,8

SSC – 20x SSC pufr: 175,32g 3M NaCl, 88,23g 0,3M C₆H₅O₇Na₃.2H₂O, 1000 ml H₂O, pH 7

Taq polymeráza – DNA polymeráza izolována z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* pro účely metody PCR

Obsah

1	Úvod.....	7
1.1	Podřád Cyphophthalmi.....	8
1.2	Cytogenetika sekáčů.....	12
1.3	Balkánský poloostrov.....	15
2	Cíle práce.....	17
3	Materiál a metodika.....	18
3.1	Sběr materiálu.....	18
3.2	Cytogenetické metody.....	18
3.2.1	Příprava chromozómových preparátů.....	18
3.2.2	Analýza karyotypu.....	18
3.2.3	Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) s nepřímo značenou sondou.....	19
3.3	Molekulárně fylogenetické metody.....	20
3.3.1	Izolace DNA.....	20
3.3.2	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	21
3.3.3	Úprava sekvencí a analýza dat.....	22
3.3.3.1	Maximum likelihood (ML).....	23
3.3.3.2	Bayesovská analýza (BA).....	23
4	Výsledky.....	24
4.1	Chromozómové charakteristiky studovaných druhů.....	24
4.2	Fylogenetické analýzy.....	38
5	Diskuze.....	41
5.1	Karyotypová variabilita rodu Cyphophthalmus.....	41
5.2	Výskyt nukleolárních organizátorů jádérka v genomu samců.....	45
5.3	Karyotypová evoluce rodu Cyphophthalmus na Balkáně.....	47
6	Závěr.....	52
7	Literatura.....	53
8	Přílohy.....	61

1 Úvod

Podřád Cyphophthalmi (paroztoči) představuje hlubokou linii sekáčů (Opiliones) (Hansen a Sørensen 1904), u kterých se předpokládá, že byli vůbec prvními terestrickými pavoukovci (Dunlop et al. 2004). Jedná se o sekáče, u nichž přetrvává velké množství plesiomorfních znaků (spermatofor, starobylá struktura ovipositoru apod.). Vzhledem ke svému stáří a nízké schopnosti šíření vykazují jednotlivé fylogenetické linie specifické rozšíření v různých biogeografických oblastech (Giribet et al. 2012).

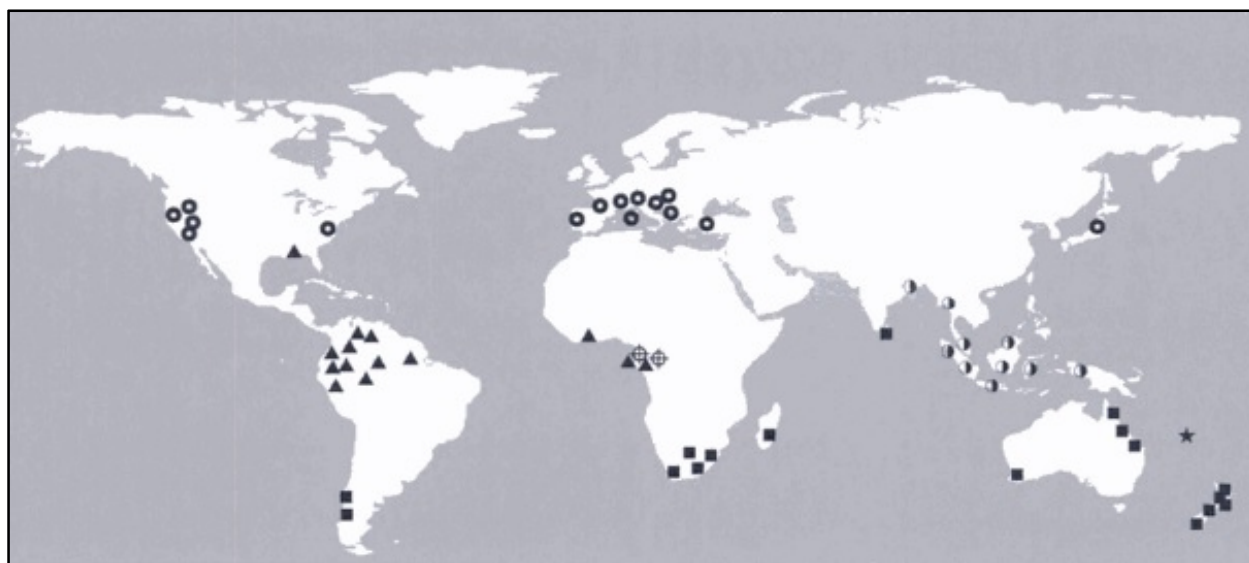
V současné chvíli je v rámci paroztočů popsáno 208 druhů řadících se do šesti čeledí (Kury 2017). Počet druhů byl nicméně dříve značně podhodnocen, jelikož paroztoči představují morfologicky velmi uniformní skupinu. Teprve molekulárně fylogenetické analýzy v posledních letech odhalují, že se ve skutečnosti jedná o mnohem diverzifikovanější skupinu, než se dříve předpokládalo (Boyer et al. 2005). Jsou to sekáči malých rozměrů (tělo 1-6 mm), kteří na první pohled připomínají roztoče vyskytující se hlavně v půdní hrabance, těsně pod povrchem země a v jeskyních (Boyer et al. 2005). V Evropě se vyskytuje pouze čeleď Sironidae, která obývá oblast bývalé Laurasie (Karaman 2009) a jedná se o skupinu, jež je v rámci paroztočů dlouhodobě poměrně intenzivně studovaná. Nepřekvapuje proto, že právě v rámci této čeledi byly provedeny první podrobnější molekulárně fylogenetické analýzy umožňující lépe porozumět diverzitě a speciálním procesům u těchto sekáčů (např. Boyer et al. 2005, Murriene et al. 2010 a Giribet et al. 2012).

U čeledi Sironidae byly také v rámci paroztočů popsány první karyotypy (Juberthie 1956, Tsurusaki 2007), které se zprvu v rámci celého podřádu Cyphophthalmi jevíly poměrně konzervativně (Šťáhlavský et al. 2012a). Teprve po doplnění dalších druhů v poslední době se ukázalo, že karyotypy paroztočů ve skutečnosti mohou vykazovat značnou variabilitu (Svojanovská et al. 2016). Množství cytogeneticky studovaných druhů je v rámci celého podřádu Cyphophthalmi nicméně zatím velmi malé (celkem 8). Navíc, až na rod *Siro*, jsou u rodů známé údaje pouze od jediného druhu (Tsurusaki et al. 2017). To u paroztočů komplikuje odhadnout míru a základní mechanismy karyotypové diferenciace. Z tohoto důvodu se předkládaná práce soustředí na podrobnější analýzu karyotypů v rámci rodu *Cyphophthalmus* Joseph, 1868 na Balkáně. Což by v konečném důsledku mohlo umožnit lépe porozumět vlivu karyotypové diferenciace na speciaci u živočichů s nízkou mobilitou. Popřípadě by karyotypové rozdíly mohly přispět k detekci kryptických druhů, a tudíž lepšímu pochopení druhové diverzity rodu *Cyphophthalmus*.

1.1 Podřád Cyphophthalmi

Podřád paroztoči (Cyphophthalmi) představuje jednoznačně monofyletickou hlubokou linii sekáčů (Opiliones) (Giribet et al. 2012, Giribet 2000 a Giribet a Boyer 2002), u které se navíc předpokládá, že se jedná pravděpodobně o nejstarší členovce obývající suchozemské biotopy (Dunlop et al. 2004). Paroztoči představují drobné sekáče (tělo 1-6 mm) s poměrně uniformní morfologií. A všechny dosavadní snahy o rekonstrukci fylogenetických vztahů založených čistě na morfologických znacích (Karaman 2009), popřípadě i první fragmentární molekulárně fylogenetické analýzy (Boyer et al. 2005), potvrzují existenci pěti čeledí. Jejich fylogenetické vztahy předpokládal již Shear (1980). Až nejnovější rozsáhlá molekulární studie Giribet et al. (2012) ukázala nový, aktuální pohled na diverzitu celého podřádu a rozdělila ho na tři infrařády: Scopulophthalmi, Sternophthalmi a Boreophthalmi zahrnující celkem 6 čeledí se specifickým biogeografickým rozšířením (Obr. 1).

Scopulophthalmi obsahující jedinou čeleď Pettalidae je považován za bazální linii celého podřádu (Giribet et al. 2012). Rozšíření čeledi Pettalidae je typicky Gondwanské. Její zástupce najdeme v Chile, Jižní Africe, Madagaskaru, Indickém subkontinentu, Austrálii a na Novém Zélandě (Obr. 1) (Boyer et al. 2007b). Zejména na Novém Zélandě bylo rozšíření čeledi Pettalidae přímo ovlivněno posledním zaledněním. Rozšíření a diverzita na těchto ostrovech proto vykazuje asi největší podobnost se situací jiných paroztočů vyskytujících se v Evropě. Dnešní rozšíření čeledi Pettalidae na Novém Zélandě kopíruje možný výskyt refugií. Zástupci v minulosti podléhali vlivu klimatických změn a izolovanosti díky členitému reliéfu prostředí (Giribet et al. 2016),



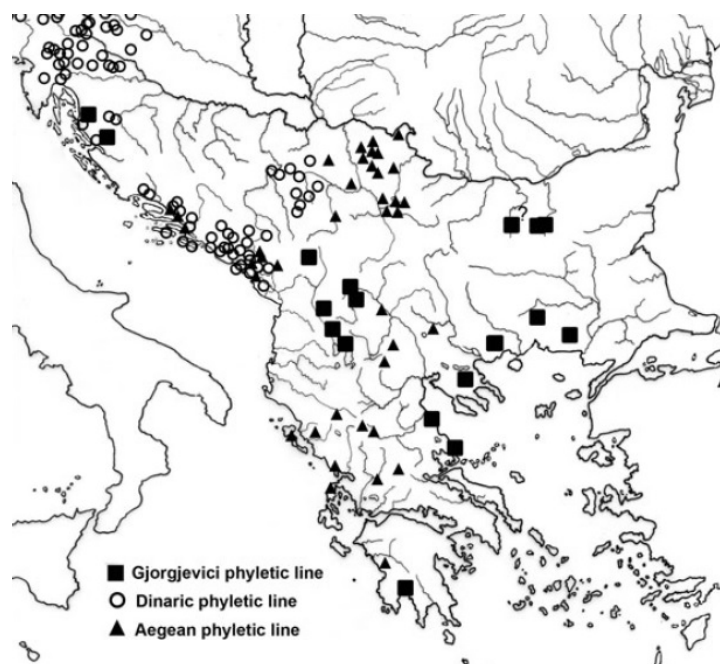
Obrázek 1: Rozšíření jednotlivých linií podřádu Cyphophthalmi: Scopulophthalmi = Pettalidae – čtverce; Sternophthalmi = Troglosironidae – hvězdy; Ogoveidae – kolečka s křížkem; Neogoveidae – trojúhelníky; Boreophthalmi = Sironidae – prázdná kolečka; Stylocellidae – poloprázdná kolečka (z Giribet et al. 2012).

čemuž odpovídá jejich současné fragmentární rozšíření (Boyer et al. 2007a). Momentálně zástupci této čeledi obývají malé izolované lokality a vykazují vysokou kryptickou diverzitu (Giribet et al. 2016). Na Novém Zélandě ale najdeme také druh s širokým rozšířením po celé oblasti. Jedná se o druh *Aoraki denticulata* (Foster, 1948), (Boyer et al. 2007a).

Infrařád Sternophthalmi představuje čistě tropickou skupinu rozdělující se na tři čeledi: čeleď Troglосironidae a nadčeď Ogoveoidea zahrnující čeledi Neogoveidae a Ogoveidae (Giribet et al. 2012). Čeleď Troglосironidae najdeme pouze v oblasti Nové Kaledonie. Oproti tomu se čeleď Neogoveidae vyskytuje v severní části Jižní Ameriky, na Floridě a v západní části Afriky. Zde se vyskytuje i poslední čeleď Ogoveidae (Obr. 1) (Giribet a Kury 2007).

Posledním infrařádem v rámci paroztočů je Boreophthalmi. Ten obsahuje dvě čeledi (Styllocellidae a Sironidae) s výrazně odděleným rozšířením (Giribet et al. 2012). Čeleď Styllocellidae má rozšíření v Jižní Asii, jmenovitě Severní Thajsko a státy Indonésie. Na Severní polokouli se vyskytuje převážně čeleď Sironidae s Laurasijským rozšířením (Obr. 1). Najdeme jí v Severní Americe, Japonsku, a také jako jedinou čeleď v Evropě. Dělí se hned na několik rodů: *Iberosiro* de Bivort, 2004, který zastupuje pouze jediný druh *Iberosiro distylos* de Bivort a Giribet, 2004 vyskytující se na jihozápadě Portugalska. Rod *Odontosiro* Juberthie, 1961 má také pouze jediného zástupce *Odontosiro lusitanicus* Juberthie, 1961, jehož rozšíření je pouze v rámci severozápadní části Pyrenejského poloostrova společně s rodem *Paramiopsalis* Juberthie, 1962. Ten obsahuje již dva druhy *Paramiopsalis ramulosus* Juberthie, 1962 a *Paramiopsalis eduardoi* Murienne a Giribet, 2009 (Murienne a Giribet 2009). Rod *Parasiro* Hansen a Sorensen, 1904 zahrnuje dva druhy *Parasiro coiffaiti* Juberthie, 1956 vyskytující se striktně na Pyrenejském poloostrově, přesněji na západě v Pyrenejském pohoří (Murienne a Giribet 2009) a *Parasiro minor* Juberthie, 1958 s výskytem na jihu Francie a severu Itálie (Delfosse 2014). Poté následuje rod *Siro* Latreille, 1796. Ten má nejširší rozšíření, jelikož se vyskytuje jak v Evropě, tak v Severní Americe (Giribet a Shear 2010) (Obr. 1). V Evropě najdeme 4 druhy rodu *Siro* (Giribet a Shear 2010): *Siro rubens* Latreille, 1804 z Francie (Delfosse 2014). Nám nejbližší *Siro carpathicus* Rafalski, 1956 se nachází na území Slovenska a Polska (Bezděčka 2008). Dalším druhem je *Siro crassus* Novak a Giribet, 2006, vyskytující se na území Rakouska a Slovinska (Novak a Giribet 2006). A posledním je italský druh *Siro valleorum* Chemini, 1990 (Chemini 1995).

Dříve byl do rodu *Siro* zařazován i rod *Cyphophthalmus*. Nicméně u něj molekulárně fylogenetická analýza potvrdila samostatnou pozici (Boyer et al. 2005). Na tuto molekulární analýzu navázala rozsáhlá morfologická studie popisující 12 nových druhů (Karaman 2009), čímž se celkový počet popsáných druhů tohoto rodu navýšil na 31. Důležitou součástí morfologické revize bylo vymezení tří hlavních evolučních skupin rodu *Cyphophthalmus* na Balkáně: Gjorgjevici skupina, Dinárská skupina a Egejská skupina (Obr. 2).



Obrázek 2: Distribuce jednotlivých skupin sekáčů rodu *Cyphophthalmus* podle Karaman (2009).

Existence těchto morfologických skupin byla následně potvrzena i pomocí molekulárně fylogenetických analýz (Murienne et al. 2010).

Pravděpodobně nejpůvodnější linií celého rodu s ostrůvkovitým rozšířením po téměř celém Balkánském poloostrově je skupina Gjorgjevici (Karaman 2009, Murienne et al. 2010). Jedná se o velmi heterogenní skupinu, u které se do budoucna předpokládá možný rozpad na více skupin v rámci Balkánu (Karaman 2009). Pojmenována je podle druhu reprezentující tuto skupinu *C. gjorgjevici* (Hadzi, 1933) z Makedonie. Dále sem patří druhy *C. paragamiani* Karaman, 2009 z Peloponésu, druhový komplex *C. thracicus* Karaman, 2009 z Bulharska a Řecka a *C. paradoxus* (Kratochvíl, 1958) z Bulharska. Do Gjorgjevici skupiny je zařazen i nejnověji popsáný druh *C. soletiensis* Dreszer, 2015 z Chorvatska (Dreszer et al. 2015).

Největší počet popsáných druhů rodu *Cyphophthalmus* obsahuje Dinárská skupina (Karaman 2009). Patří sem všechny druhy vyskytující se na území Dinárských Alp v rámci severozápadní části Balkánského poloostrova. Vlajkovým druhem této skupiny je *C. duricorius* Joseph, 1868, po němž je i popsán celý rod. Najdeme ho na mnoha stanovištích a biotopech. Právě pro jeho častý výskyt, schopnost šíření a drobné genetické divergence je často využíván pro podrobnější studie rodu (Karaman 2009). Dalšími druhy této skupiny jsou *C. ere* Karaman, 2007, *C. minutus* (Kratochvíl, 1938), *C. martensi* Karaman, 2009 a *C. rumijae* Karaman, 2009. Do této skupiny patří také izolovaná skupina mnoha troglobiontních druhů (např. *C. gordani* Karaman, 2009, *C. neretvanus* Karaman, 2009, *C. ongjenovici* Karaman, 2009 a *C. teyrovski* Kratochvíl,

1937) (Karaman 2009). Největší druhová diverzita této skupiny je ve střední části Balkánského poloostrova, odkud se pravděpodobně rozšířila směrem na sever (Karaman 2009) (Obr. 2).

Třetí výraznou skupinou rodu *Cyphophthalmus* je Egejská skupina, u níž molekulárně fylogenetické analýzy odhalily blízkou příbuznost s Dinárskou skupinou (Boyer et al. 2005, Murienne et al. 2010). Do Egejské skupiny patří druhy *C. bithynicus* (Gruber, 1969), *C. corfuanus* (Kratochvíl 1938), *C. eratoae* (Juberthie, 1968), *C. markoi* Karaman, 2008, *C. serbicus* Hadži, 1973), *C. yalovensis* (Gruber, 1969) a *C. zetae* Karaman, 2009. Tyto druhy nejčastěji obývají jižní a jihovýchodní část Balkánského poloostrova (Karaman 2009). Najdeme zde převážně endogenní druhy. Díky jejich přizpůsobivosti k aridním oblastem jsou považováni za jedinou současně expanzivní skupinu v rámci rodu *Cyphophthalmus*. Úspěšně se šíří do východní a severní části Balkánu. Momentálně nejsevernější výskyt této skupiny reprezentuje druh *C. hlavaci* Karaman, 2009, jehož areál se prolíná s výskytem některých druhů Dinárské skupiny (Karaman 2009).

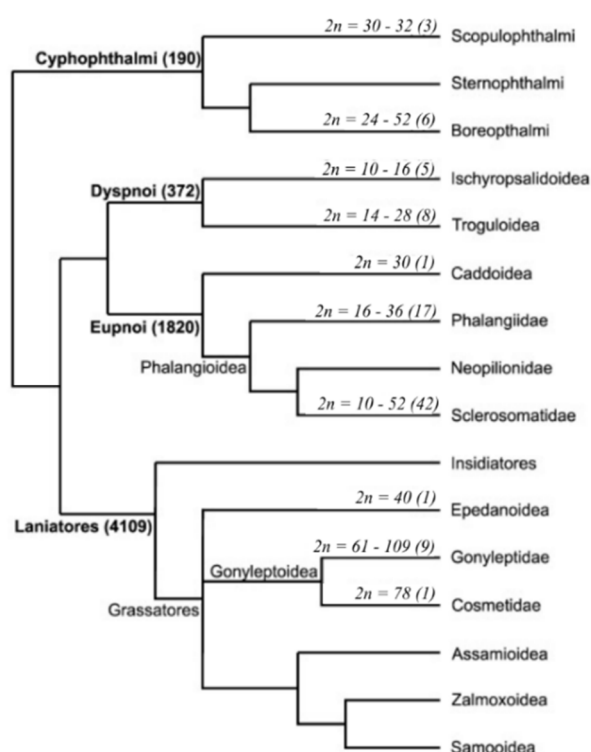
Recentní molekulární analýza, navazující na předchozí studie využívající morfologické (Karaman 2009) či molekulární znaky (Boyer et al. (2005), potvrdila rozdělení rodu *Cyphophthalmus* do tří skupin (Gjorgjevici, Dinárské a Egejské) (Murienne et al. 2010). Příbuzenské vztahy jednotlivých hlavních skupin nebyly v rámci této analýzy dostatečně podpořeny. Příbuznosti druhů v rámci určité skupiny rozřešeny nicméně byly a plynule navazovaly na předešlé studie (Murienne et al. 2010). Gjorgjevici skupina byla v této studii potvrzena jako monofyletická a sesterká ke všem zbylým skupinám. Také Egejská skupina se ukázala jako monofyletická a je sesterská k druhu *C. ere*, což naznačovala i předešlá studie Boyer et al. (2005). Tato příbuznost ani v jedné práci neměla příliš vysoké podpory (Murienne et al. 2010). Dinárská skupina se ukázala jako parafyletická. Dělí se na dvě linie. První linie s názvem „duricorius skupina“ je polyfyletická. Zahrnuje striktně endogenní druhy *C. duricorius*, *C. rumijae*, *C. ere* a *C. martensi*. Ten vytváří speciální linii separovanou od zbylých druhů. Druhá linie s názvem „minutus skupina“ je monofyletická a zahrnuje naopak striktně troglobiontní druhy (např. *C. teyrovskyi* a *C. gordani*) (Murienne et al. 2010). V této studii se také autoři pokusili o molekulární datování diverzifikace rodu *Cyphophthalmus*. Zjistili, že se celý rod začal diverzifikovat již před 94,3 milióny lety. Rozpad rodu na dnešní hlavní evoluční skupiny proběhl společně s rozpadem Adrijských a Meiosijských mikro-desek, což začalo formovat Balkánský poloostrov do dnešní podoby (Murienne et al. 2010).

V současné době se do rozdělení Balkánských druhů přidala nová skupina s názvem Volos. Jedná se o zástupce žijící hlavně v jižní části Balkánského poloostrova. Taxonomie druhů této skupiny se zdá být poměrně komplikovaná. Řadí se sem mnoho nových a dosud nepopsaných kryptických druhů (Karaman ústní sdělení).

Distribuce rodu *Cyphophthalmus*, rozdělení do jednotlivých evolučních skupin společně se specifickým postavením v rámci celé čeledi Sironidae a velice dávnou diverzifikací, naznačuje, že tento rod má dlouhou a specifickou historii. Ta je dále asociovaná s velice dynamickými změnami a vývojem Balkánského poloostrova. Vysoký podíl mikroendemismu, komplexní rozšíření a vysoká skrytá diverzita (např. výskyt druhu pouze v jedné izolované jeskyni) dělá tuto skupinu ideálním modelem pro studii původu diverzity na Balkánském poloostrově (Boyer et al. 2005, Karaman 2009 a Muriene et al. 2010).

1.2 Cytogenetika sekáčů

Přestože sekáči představují čtvrtý nejpočetnější řád pavoukoců máme informace o jeho cytogenetických charakteristikách k dispozici stále jen velmi omezené množství. Do současné doby byly u celkově 6653 popsáných druhů sekáčů, řazených do 47 čeledí (Kury 2017), publikovány informace o chromozómech pouze u 85 z nich (Tsurusaki et al. 2017). Informace o cytogenetice v rámci sekáčů jsou navíc poměrně nerovnoměrné a údaje pocházejí pouze od zástupců z 15 čeledí. Více než dvě třetiny analyzovaných druhů navíc pocházejí pouze ze dvou čeledí Phalangiidae a Sclerosomatidae patřící do podřádu Eupnoi (Tsurusaki et al. 2017). I přes tyto poměrně fragmentární údaje je jasné, že sekáči představují řád pavoukoců s velice výraznou variabilitou v počtu chromozómů. Ta se nyní pohybuje mezi $2n=10$ a $2n=109$ (Tsurusaki 2007) (Obr. 3).



Obrázek 3: Fylogeneze sekáčů s diploidními počty. Fylogeneze z Giribet et al. (2012) podřád Cyphophthalmi, Giribet et al. (2010) podřád Dyspnoi, Hedin et al. (2012) podřád Eupnoi a Sharma and Giribet (2011) podřád Laniatores. Diploidní počty a počty karyotypovaných druhů z Tsurusaki et al. (2017).

Přes toto velké rozpětí počtu chromozómů má většina sekáčů v karyotypu převahu dvouramenných chromozómů a rozpětí diploidních počtů ve skutečnosti v rámci jednotlivých podřádů není tak velké. Zejména pro podřád Laniatores jsou typické vyšší diploidní počty (40–109) (Tsurusaki et al. 2017). U podřádů Eupnoi ($2n=10-36$) a Dyspnoi ($2n=10-28$) jsou charakteristické spíše nižší diploidní počty (Tsurusaki et al. 2017). Podřád Cyphophthalmi

vykazuje o něvo větší rozpětí diploidních počtů chromozómů (24-52) (Svojanovská et al. 2016) nicméně většina druhů má počet chromozómů kolem 30, což je počet, jenž je považován za původní pro všechny sekáče (Tsurusaki 2007).

V rámci všech podřádů nacházíme výraznou mezidruhovou variabilitu na úrovni diploidních počtů. Například právě u podřádu Cyphophthalmi se jedná se o rod *Siro*, u kterého má jeden druh (*Siro rubens*) diploidní počet 30 a druhý výrazně vyšší $2n=52$ (*Siro carpaticus*). Mezidruhová variabilita se vyskytuje i v rámci celého řádu sekáči (Opiliones). U nejvíce cytogeneticky prozkoumané (42 analyzovaných druhů) čeledi Sclerosomatidae z podřádu Eupnoi byla také zjištěna výrazná variabilita v diploidních počtech (10–48). Stejně tak se vyskytuje variabilita diploidních počtů u druhů z čeledi Phalangiidae (13 analyzovaných druhů), které se pohybují mezi 16–36 (Tsurusaki 2007). U podřádu Dyspnoi se povedlo zjistit mezidruhovou variabilitu diploidního počtu u rodu *Sabacon* (Simon, 1879) ($2n=10-16$) a *Trogulus* Latreille, 1802 (16–26) (Tsurusaki et al. 2017).

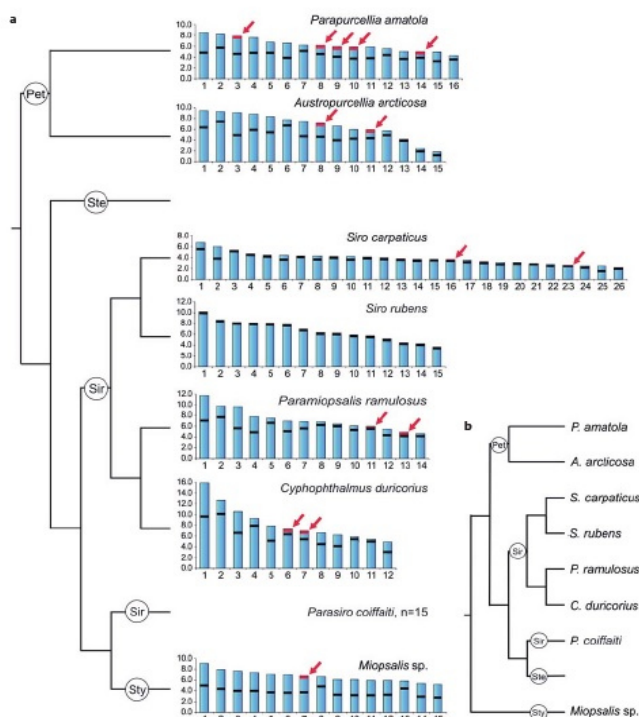
U některých skupin sekáčů byla dokumentována vnitrodruhová variabilita v rámci diploidních počtů, která má jasný geografický vzor s poměrně úzkými hybridními zónami (Tsurusaki 1989). Jedná se například o rod *Sabacon* (Sabaconidae), kde byla zjištěna variabilita v počtu chromozómů v rámci jednoho druhu *S. makinoi* (Suzuki, 1949) ($2n=10; 12; 14$). Diploidní počty odpovídali geografickému rozšíření a izolaci díky vyskytujícím se bariérám (Tsurusaki 1989). Vnitrodruhovou variabilitu v počtu chromozómů způsobuje také výskyt tzv. B chromozómů, které byly u sekáčů prokázány zejména u druhu *Psathyropus tenuipes* L. Koch, 1878 (Sclerosomatidae). Počet B chromozómů u něj ale může být až 19 (Tsurusaki 2007). Variabilita v diploidním počtu u druhu *Phalangium opilio* Linnaeus, 1761 je také způsobena fluktuací počtu B chromozómů v karyotypu (Tsurusaki 2007). V rámci sekáčů nacházíme také dva druhy rodu *Leiobunum* (*L. manubriatum* Karsch, 1881 a *L. globosum* Suzuki, 1953) z podřádu Eupnoi, u kterých nacházíme oproti ostatním druhům čeledi vyšší diploidní počty chromozómů (např. 47 a 49). To bylo pravděpodobně způsobeno polyploidizací u těchto partenogeneticky se rozmnožujících druhů (Tsurusaki 1986).

U pavoukoců je původním znakem absence morfologicky diferencovaných chromozómů, nicméně u některých řádů se pohlavní chromozómy vyskytují (Král et al. 2011). U sekáčů pravděpodobně pohlavní chromozómy vznikají nezávisle na sobě a byly identifikovány v několika případech. V rámci podřádu Eupnoi se jedná o dvě čeledi (Phalangiidae a Sclerosomatidae). U čeledi Phalangiidae byla potvrzena přítomnost pohlavního systému ZW a to u druhu *Mitopus morio* (Fabricius, 1799) (Tsurusaki a Cokendolpher 1990). Tento pohlavní systém dosud není znám u jiného zástupce pavoukoců (Tsurusaki 2007, Tsurusaki et al. 2017). U zbylých sekáčů

byl popsán pohlavní systém XY. Jedná se o 13 druhů čeledi Sclerosomatidae (Eupnoi) a jeden druh (*Sabacon makinoi* Suzuki, 1949) z čeledi Sabaconidae (Dyspnoi). U těchto zástupců byla také zjištěna variabilita pohlavní chromozómů. Pohlavní chromozóm X bývá nejčastěji submetacentrický, stejně tak pohlavní chromozóm Y (Tsurusaki 1989 a 2007).

Jak již bylo zmíněno, jak u sekáčů, tak u podřádu Cyphophthalmi jsou cytogenetické údaje spíše fragmentárního rázu. V současné době je analyzováno pouze 8 druhů. Analýzy prvních 3 druhů *Austropurcellia arctica* (Cantrell, 1980) (Pettalidae) (Šťáhlavský et al. 2012a), *Parasiro coiffaiti* (Sironidae) (Tsurusaki 2007) a *Siro rubens* (Sironidae) Juberthie 1956 zjistily vždy diploidní počet 30. Ten byl proto považován za uniformní v rámci celého podřádu. Nicméně poslední studie odhalila vyšší variabilitu diploidních počtů chromozómů, dále i v počtu a pozici NORů (jaderných organizátorů jadérka) napříč celým podřádem, a to hned na základě několika druhů: *Miopsalis sp.* (Stylocellidae) $2n=30$, *Parapurcellia amatola* de Bivort & Giribet, 2010 (oba Pettalidae) $2n=32$, *Paramiopsalis aff. ramulosus* $2n=28$, *Cyphophthalmus duricorius* Joseph, 1868 $2n=24$ a *Siro carpaticus* Rafalski, 1956 $2n=52$ (všichni Sironidae) (Svojanovská et al 2016) (Obr. 4).

V rámci některých paroztočů byl zjištěn poměrně vysoký podíl jednoramenných chromozómů. Zejména se to týká obou doposud cytogeneticky studovaných druhů rodu *Siro* (Juberthie 1956, Svojanovská et al. 2016). Proces centrického rozpadu dvojramenných chromozómů má za následek znásobení počtu chromozómů (*Siro carpaticus* $2n=52$) a vznik akrocentrických chromozómů. U dalších druhů podřádu Cyphophthalmi se v karyotypech vyskytuje nižší podíl jednoramenných chromozómů (Svojanovská et al. 2016).



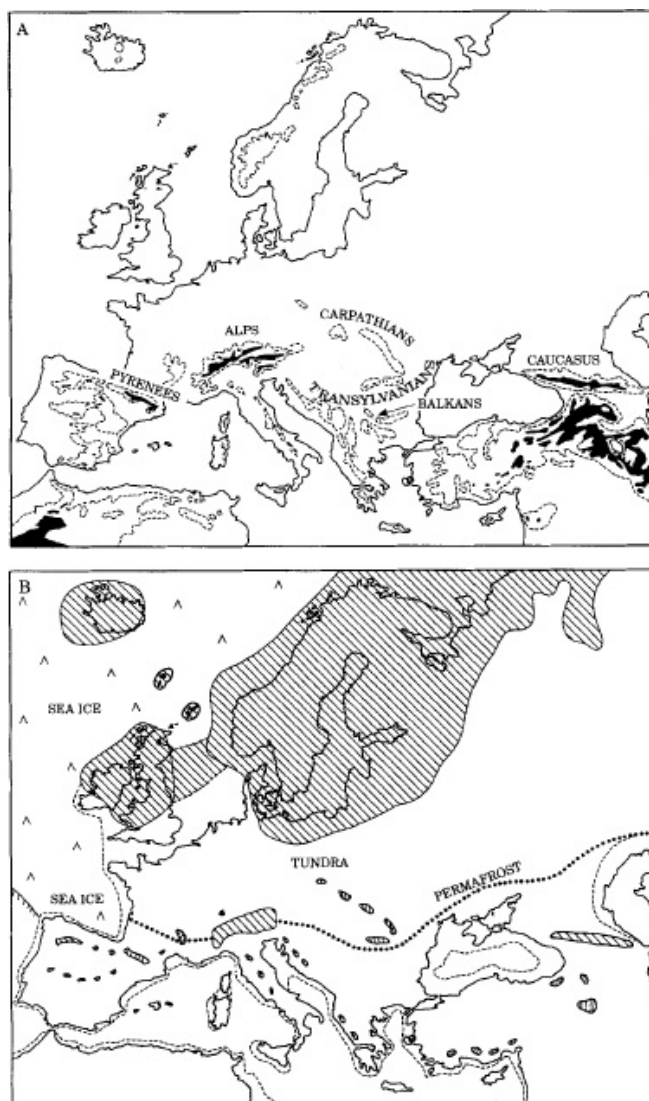
Obrázek 4: a – Ideogramy cytogeneticky analyzovaných druhů podřádu Cyphophthalmi se zvýrazněnou pozicí 18S rDNA (červené šipky) zasazené do kontextu příbuznosti linií. b – jednotlivé druhy zasazené do fylogenetického stromu. Fylogenetické údaje převzaty z Giribet et al. (2012) a Dreszer et al. (2015). Pet = Pettalidae; Sir = Sironidae; Ste = Sternophthalmi; Sty = Stylocellidae. Převzato z Svojanovská et al. (2016).

Variabilita karyotypů u sekáčů je velice výrazná. Takové mezidruhové rozdíly v karyotypech by se daly využít v taxonomii u sekáčů tak, jak to bylo využito třeba u jiných skupin pavoukoců (pavouci Řezáč et al. 2014, štírci Zaragoza a Šťáhlavský 2008). Nicméně toto využití komplikuje zejména fakt, že máme stále nedostatečné informace o mezidruhové variabilitě u většiny skupin sekáčů (viz Tsurusaki et al. 2017).

1.3 Balkánský poloostrov

Balkánský poloostrov je velkou částí biogeografické oblasti Východního Středomozí. Zohary (1973) a Quézel (1985) definovali toto území ze severu pohořím Alp, Dinárských Alp, Balkánských hor a Černým mořem. Z východu je ohraničeno Pontskými horami, pohořím Taurus a Libanon.

Balkánský poloostrov je stále tektonicky aktivní a jeho podloží odpovídá Alpským pohoří (Ager 1980). Tektonické podloží a výskyt moře Thethys (pouze do rozpadu Pangei) formoval Balkánský poloostrov do dnešní podoby již od pozdního Paleozoiku. Dále v pozdním Mesozoiku se zformovala část pevniny do tzv. Laurasie, která se postupně rozcházela do dnešní podoby. Tomu odpovídá i příbuznost recentních druhů vyskytujících se v oblastech tohoto dočasného kontinentu (Robertson a Dixon 1984; Karaman 2009). Vysoká stabilita prostředí, klimatická a topografická variabilita (Obr. 5A) a také přítomnost migračních cest směřujících na poloostrov, způsobuje výskyt unikátní biodiverzity (Griffiths et al. 2004). Dále pak i variabilita geologického podloží zapříčiňuje formování izolovaných biotopů, jako jsou například jezera a jeskyně, kde se vyskytuje izolovaná a unikátní diverzita



Obrázek 5: A – reliéf Evropy, černé oblasti nad 2000 m.n.m.; B – Evropa během posledního zalednění (před 18-20000 lety). Přerušovaná čára vyznačuje možný rozsah kontinentálních ledovců. (Hewitt et al.1999).

(Griffiths et al. 2004). Balkán je zastoupen ze 70 % pohořími (Obr. 5A), které se jsou buď ve Středozeří, nebo vystupují přímo z moře. Území s nejnižší nadmořskou výškou a nízkým reliéfem nacházíme na severu poloostrova, kde se nachází i výrazná říční síť, která na některých místech rozděluje poloostrov od pevniny. Směrem na jih se zvyšuje poměr vyšších nadmořských výšek, což může způsobovat nejvyšší koncentraci endemických druhů na území Řecka (Griffiths et al. 2004).

Významným faktorem, jenž výrazně ovlivňoval rozšíření a případnou speciaci různých skupin organismů a rostlin, je výskyt refugií na Balkánském poloostrově (Obr. 5B). Během posledního zalednění se zde vyskytovali silně izolované populace živočichů a někteří z nich, vzhledem k jejich nízké schopnosti šíření, zůstaly izolované i dodnes. Z toho důvodu může jejich diverzita odrážet vývoj celého poloostrova (Karaman 2009). Výskyt refugií během zalednění v Pleistocénu potvrzuje také vysoká genetická izolace u velkých savců (Taberlet a Bouvet 1994) a ryb (Durand et al. 1999). Na Balkáně lze najít místa s komunitou stromů a asociovanou faunou, která zde přežívá minimálně 1.8 milión let a pochází z kvartérního období (Eastwood 2004). U endemických pavouků žijících na Balkáně byla nedávno potvrzena evoluce tzv. *in situ* v rámci Balkánského poloostrova (Delsthev 2004). Dále poloostrov obývá unikátní biota s vysokým podílem endemismu u rostlin (Quézel 1985), sladkovodních ryb (Crivelli a Maitland 1995) a dalších živočichů. Také někteří balkánští plazi se ukázali být monofyletickou skupinou, a tudíž endemickou pro tento region (Oliverio et al. 2000). Nicméně v současné době není Balkánský poloostrov tolik izolován od zbylé Evropské fauny, jak je tomu u dalších dvou poloostrovů (Apeninský a Pyrenejský). Vyskytuje se zde mimo endemických druhů také vysoký poměr živočichů, kteří žijí plošně po celé kontinentální Evropě. Z toho lze předpokládat, že jsou zde migrační cesty hned z několika směrů (Delsthev 2004).

Balkánský poloostrov je stále ještě neprobádanou částí Evropy a zdá se být velice zajímavý z hlediska dlouhodobé izolace populací jednotlivých skupin živočichů a rostlin. Taková izolace přispívá k vyšší variabilitě karyotypů a diferenciaci za pomoci různých změn v rámci chromozómových přestaveb. Podřád Cyphophthalmi, který má nízkou schopnost šíření a jeho výskyt je velice izolovaný a ostrůvkovitý, (Karaman 2009) se jeví jako ideální modelový organismus pro studování biogeografie Balkánského poloostrova.

2 Cíle práce

- popsat a porovnat karyotypy různých evolučních linií rodu *Cyphophthalmus* za využití standardních cytogenetických metod
- pomocí metody FISH zjistit a porovnat počet a lokalizaci organizátorů jadérka (NOR) v genomu analyzovaných druhů
- zmapovat průběh meiotického cyklu a zaznamenat případné odlišnosti od standardního schématu
- rekonstruovat příbuzenské vztahy analyzovaných druhů za pomoci molekulárně fylogenetických metod s využitím genů pro 28S rRNA, histon H3 a cytochrom oxidázu I.
- porovnat cytogenetické údaje s výsledky morfologických a molekulárně fylogenetických analýz a odhadnout konkrétní změny vedoucí k diferenciaci karyotypů rodu *Cyphophthalmus* na Balkáně

3 Materiál a metodika

3.1 Sběr materiálu

Dospělí jedinci byli získáni individuálním sběrem v letech 2007–2017 z předem vytipovaných lokalit (Tab. 7, Obr. 23) na území Balkánského poloostrova a východní části Alp, konkrétně ze států: Albánie, Bosna a Hercegovina, Bulharsko, Černá Hora, Chorvatsko, Itálie, Rakousko, Řecko, Srbsko, Slovinsko. Na lesních lokalitách byli sekáči z půdní hrabanky extrahováni pomocí prosévadla o velikosti ok 5x5 mm. Chromozómové preparáty byly z živých nasbíraných exemplářů připraveny bezprostředně po návratu z terénu (viz níže).

3.2 Cytogenetické metody

3.2.1 Příprava chromozómových preparátů

Pro přípravu chromozómových preparátů byla použita technika „plate spreading“ (Traut 1976), která je úspěšně a rutinně využívána u různých skupin pavoukovců, včetně sekáčů (např. Štáhlavský et al. 2012a). Metoda minimalizuje ztráty materiálu, čímž je vhodná pro přípravu chromozómových preparátů z živočichů menších rozměrů. Analyzovaným jedincům byla hned po jejich usmrcení vypreparována z tělní dutiny gonáda a hypotonizována v 0.075M KCl po dobu 20 minut. Dále byla gonáda přesunuta do směsi metanolu a kyseliny octové (3:1) po dobu minimálně 20 minut, kde probíhala fixace. Následně byla rozpuštěna pomocí 60% kyseliny octové přímo na podložním sklíčku. V případě větší velikosti gonády byla tkáň roztrhána na menší části pomocí wolframových drátků, díky čemuž bylo rozpuštění urychleno. Posledním krokem bylo přesunutí preparátu na předem vyhřátou histologickou ploténku (40°C) a pomalé rozprostírání suspenze po povrchu sklíčka pomocí naklánění až do jejího vypaření. Jedinci byli po přípravě chromozómových preparátů uloženi do 96 % etanolu a uchováni při -20°C pro plánované molekulárně fylogenetické analýzy. Chromozómové preparáty byly barveny po dobu 30 minut roztokem 5% Giemsy v Sørensenově pufru (4.75 g Na₂HPO₄ 12 H₂O a 4.54 g KH₂PO₄ v 1000 ml H₂O, pH = 6.8).

3.2.2 Analýza karyotypu

Chromozómové preparáty byly pozorovány a foceny pomocí kamer Olympus Provis AX 70 na mikroskopu Olympus DP 72 a ORCA-AG (Hamamatsu) na mikroskopu Olympus IX81. Poté byly vybrány sady chromozomů vhodné pro karyotypovou analýzu. Na zjištění a měření chromozómových charakteristik byly použity metafáze II případně mitotické metafáze. Charakteristiky karyotypu (diploidní počet, velikost a morfologie chromozómů) se identifikovaly pomocí programu ImageJ 1.47 (<http://imagej.nih.gov/ij/>) se specializovaným doplňkem pro

analýzu karyotypu Levan (Sakamoto a Zacaro 2009). Morfologie chromozómů byla klasifikována dle Levan et al. (1964) a relativní chromozómová délka byla vypočtena pro haploidní sadu chromozómů (např. Tsurusaki a Cokendolpher 1990).

3.2.3 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) s nepřímo značenou sondou

Metoda fluorescenční *in situ* hybridizace nám umožňuje lokalizovat výskyt specifických sekvencí DNA, které jsou umístěny na chromozómech. Námi využívaná metoda FISH s nepřímo značenou sondou probíhá skrze navázání specifické nukleotidové sekvence (biotilynovaná sonda pro 18S rDNA) na komplementární úsek DNA. Následně probíhá detekce sondy při použití protilátky (streptavidin) s navázaným fluorochromem (Cy3). Účelem této metody bylo detekovat počet a distribuci NORů (jaderných organizátorů jádérka) v genomu analyzovaných druhů.

Sonda pro 18S rDNA byla připravena z druhu *Euscorpis sicanus* (Koch, 1837). Celogenomová DNA byla izolována pomocí DNA Minikitu – Tissue (Geneaid). Při izolaci byly zachovány předem předepsané postupy. Fragment genu 18S rDNA byl získán pomocí PCR podle protokolu níže (Tab. 1) ve směsi skládající se z primerů (5'-CGAGCGCTTTTATTAGACCA-3' a 5'-GGTTCACCTACGGAAACCTT-3'), ExTaq polymerázy, dNTP's, templátu (50 ng), pufru a vody.

Tabulka 1: Protokol PCR použitý při výrobě sondy pro 18S rDNA.

Krok	Teplota	Čas	Počet
1. Počáteční denaturace	95°C	3 min	1x
2. Denaturace	94°C	0,5 min	30x
3. Nasedání primerů	55°C	0,5 min	30x
4. Prodlužování	72°C	2 min	30x
5. Konečné prodlužování	72°C	3 min	1x
6. Chlazení	12°C	∞	

Produkt z PCR byl extrahován z 1% agarózy a přečištěn pomocí GenElute PCR Clean-Up Kit (Sigma-Aldrich). Sonda byla dále značena za použití nick translací s biotin-14-dUTP (Roche) Nick Translation Kit (Abbott Molecular) a postupováním dle protokolu, který je dodáván v kitu.

Vlastní FISH probíhala s drobnými úpravami dle protokolu Sahara et al. (1999). Po vyjmutí preparátů z mrazicího boxu (-20°C) proběhlo odvodnění ve vzestupné etanolové řadě (70%, 80% a 96%). Po aplikaci RNázy A v 2xSSC pufru byly preparáty inkubovány 60 minut v hybridizačních komůrkách (37°C). Během inkubace byla připravena hybridizační směs (1μl sondy/2,5μl Salmon sperm/sklo) s přidáním dalších složek (0,35μl Na-acetát/9,75μl 96% EtOH/sklo). Tím se následně ve směsi vysrážela DNA. Poté byla hybridizační směs přesunuta do mrazicího boxu (-20°C)

a ponechána při této teplotě 80 minut. Po působení RNázy A byly preparáty promyty v 2xSSC 2x5 minut a 30 minut inkubovány v 5xDenhardtově roztoku. Po inkubaci byla skla při 68°C denaturována v 70% deionizovaném formamidu v 2xSSC. Denaturace probíhala 3 minuty a 30 sekund. Bezprostředně poté následovalo jejich prudké zchlazení a odvodnění v etanolové řadě (70% (-20°C), 80% a 96%). Hybridizační směs byla po 80 minutách vyjmuta z mrazicího boxu a centrifugována v předem vychlazené centrifuze na 7°C. Po důkladném odstranění supernantu byla směs vysušena v termomixu (37°C). DNA byla rozpouštěna při 37°C ve 100% deionizovaném formamidu po dobu 30 minut. Po přidání dextran sulfátu byla směs 5 minut vystavena vysoké teplotě (90°C) ve vodní lázni a poté prudce zchlazena na ledu. Aplikace hybridizační směsi probíhala na suchá skla, přiložené krycí sklo bylo olemováno rubber cementem (FixoGum) a poté byly chromozómové preparáty uloženy do hybridizačních komůrek a ponechány při teplotě 37°C do druhého dne.

Druhý den byly následující kroky prováděny za šera. Předchází se tak možnému vysvícení fluorescenčně značených úseků chromozómů. V prvním kroku byl na 30 minut aplikován Cy-3 konjugovaný streptavidin (Jackson ImmunoResearch), následně byl nepřímo detekovaný signál zesílen působením biotinylovaného antistreptavidinu (Vector Labs. Inc.; 20 minut, 37°C), a Cy-3 konjugovaného streptavidinu (20 minut, 37°C). Před každou takovou fází proběhlo zablokování reakce 2,5% BSA (20 minut) a po působení avidinu byly vždy preparáty promyty v 4xSSC/0,1% Tween 3x3 minuty. Posledním krokem bylo barvení preparátů pomocí předem namíchané směsi DAPI. Skla se nechala mírně oschnout a okraje byly přetřeny lakem na nehty. Po zaschnutí bylo možné preparáty prohlížet pomocí mikroskopu Olympus IX81 vybaveného ORCA-AG monochromatickou CCD kamerou (Hamamatsu) a dokumentovat pomocí programu Cell^R (Olympus Soft Imaging Solutions).

3.3 Molekulárně fylogenetické metody

3.3.1 Izolace DNA

Po pitvě byl usmrcený jedinec fixován v 96% etanolu a skladován při -20°C. Izolace DNA probíhala pokud možno u jedinců s pozitivními karyologickými výsledky. Izolace DNA probíhala dle protokolu komerčně dodávané izolační sady DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen). Pro efektivnější lyzi částí těla bylo působení proteinázy K prodlouženo na 4 hodiny. Získaná DNA byla uchovávána při teplotě -20°C.

3.3.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Fragmenty mitochondriálního genu pro cytochrom oxidázu I (COI) a dvou jaderných genů pro 28S rRNA (28S) a histon H3 byly amplifikovány polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). Pro amplifikaci COI genu (~708 bp) byly použity univerzální primery LCO (5'-GGTCCACAAATCATAAAGATATTGG-3') a HCO (5'-TAAACTTCAGGATGACCAAAAATCA-3') (Folmer et al. 1994). Pro amplifikaci genu pro 28S (~1000 bp) byly využity primery 28SpsF1 (5'-ATTACCCGCCGAATTTAAGC-3') a 28SpsR1 (5'-TCGGAGGGAACCAGCTAC-3') (Giribet et al. 1999 a Hedin a Maddison 2001) a pro histon H3 (~150 bp) primery H3aF (5'-ATGGCTCGTACCAAGSAGACVGC-3') a H3aR (5'-ATATCCTTRGGCATRGTGAC-3') (Colgan et al. 1998). Protokoly pro PCR jsou popsány v Tabulce 2–4 pro každý gen zvlášť. Všechny amplifikace byly prováděny v objemu 25μl reakční směsi s následujícími dílčími hodnotami.

PCR H ₂ O	7μl
PPP Master Mix (Top-Bio s.r.o.).....	12,5μl
Forward primer	1μl
Reverse primer	1μl
DNA	3,5μl

Tabulka 2: Protokol PCR pro gen COI.

Krok	Teplota	Čas	Počet
1. Počáteční denaturace	95°C	3 min	1x
2. Denaturace	95°C	0,5 min	40x
3. Nasedání primerů	45°C	1 min	40x
4. Prodlužování	72°C	1,5 min	40x
5. Konečné prodlužování	72°C	10 min	1x
6. Chlazení	12°C	∞	

Tabulka 3: Protokol PCR pro gen 28S.

Krok	Teplota	Čas	Počet
1. Počáteční denaturace	95°C	5 min	1x
2. Denaturace	95°C	0,5 min	34x
3. Nasedání primerů	54°C	0,5 min	34x
4. Prodlužování	72°C	1 min	34x
5. Konečné prodlužování	72°C	10 min	1x
6. Chlazení	12°C	∞	

Tabulka 4: Protokol PCR pro gen H3.

Krok	Teplota	Čas	Počet
1. Počáteční denaturace	95°C	5 min	1x
2. Denaturace	95°C	0,5 min	35x
3. Nasedání primerů	50°C	0,5 min	35x
4. Prodlužování	72°C	1 min	35x
5. Konečné prodlužování	72°C	10 min	1x
6. Chlazení	12°C	∞	

Kontrola PCR produktu byla provedena pomocí horizontální elektroforézy. PCR produkt (3 µl) byl nanesen na 1% agarózový gel s přidáním ethidium bromidem. Na gel byl také nanesen i délkový standard DNA (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, Fermentas). Ten umožňuje zjistit délku získaného fragmentu. Výsledek elektroforetické separace byl vyhodnocen pod UV osvětlením.

Vzorky, u kterých došlo k amplifikaci fragmentu o předpokládané délce, byly následně zaslány na sekvenaci (Macrogen Inc.; Jižní Korea).

3.3.3 Úprava sekvencí a analýza dat

K vytvoření širšího datového souboru byly doplněny vlastní vzorky o sekvence genů pro COI, 28S rRNA a histonu H3 z dříve publikovaných prací dostupné z GenBank (Příloha Tab. 7). Ty byly v utvořeném alignmentu u fragmentu genů zkráceny na jednotnou délku. Chromatogramy získané sekvence byly prohlédnuty, poté bylo provedeno komplementární spojení forward a reverse směrů, následně byla sekvence zkontrolována a upravena. Tyto sekvence byly doplněny daty z GenBank a společně s nimi byl vytvořen alignment (pomocí MUSCLE alignment) pro každý gen zvlášť. Všechny kroky byly provedeny v programu Geneious 6.0.6 (Biomatter, <http://www.geneious.com>). U každého protein kódujícího genu (COI a H3) bylo přepisem na aminokyseliny ověřena nepřítomnost stop kodónů.

Pomocí programu Partition Finder 1.1.1 (Lanfear *et al.* 2012) byly vypočítány evoluční modely (Tab. 5) pro konkatenát tří genů za použití Bayesovského informačního kritéria (BIC), přičemž u genů COI a H3 byly vyhledány evoluční modely na každou pozici v kodónu zvlášť. V případě genu pro 28S rRNA bez dělení na pozice. Následně byly vypočítány fylogenetické stromy metodami Maximum Likelihood (ML) a Bayesovskou Analýzou (BA). Outgroup byl zvolen druh *Paramiopsalis ramulosus* Juberthie, 1962.

Získané výsledné stromy byly prohlíženy v programu FigTree 1.4.0 (Rambaut 2012) a následně upravovány graficky v CorelDraw Graphic Suite X5. U výsledných fylogenetických

stromů byly nody s bootstrapem $\geq 70\%$ (ML) a hodnotou posteriorní pravděpodobnosti ≥ 0.95 (BA) považovány za vysoce podpořené (Huelsenberck & Rannala 2004).

3.3.3.1 Maximum likelihood (ML)

Analýza maximální věrohodnosti (ML) proběhla v programu raxmlGUI 1.3 (Silvestro & Michalak 2012). Pro konkatenát sekvencí tří genů byl zvolen jeden evoluční model GTR+G, přičemž byl aplikován na každou pozici v kodónu zvlášť v případě protein kódujících genů (COI a H3). Podpora jednotlivých nodů byla ověřena bootstrapem s 10000 pseudoreplikacemi.

3.3.3.2 Bayesovská analýza (BA)

Pro bayesovskou analýzu, která je založená na výpočtu posteriorních pravděpodobností, byl využit program MrBayes 3.2.2 (Ronquist a Huelsenbeck 2003), který pracuje metodou Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Evoluční modely pro konkatenát sekvencí tří genů (COI, 28S rDNA, histon H3) jsou uvedeny v tabulce 5. Analýza byla nastavena na 50 000 000 generací, při ukládání každého 10 000. stromu. Pro eliminaci počátečních stromů, které jsou neustálené, bylo prvních 25% odstraněno. Z výsledných stromů byl vypočítán konsenzuální strom obsahující u jednotlivých větví hodnoty posteriorních pravděpodobností. Ty značí frekvenci výskytu jednotlivých nodů u ukládaných stromů.

Tabulka 5: Evoluční modely vypočítané prostřednictvím Partition Finder 1.1.1 (Lanfear *et al.* 2012) pro Bayesovskou analýzu.

Cyphophthalmus_concat	model
COI_pos1	GTR+I+G
COI_pos2	HKY+G
COI_pos3	GTR+I+G
28S	GTR+I+G
H3_pos1	K80+G
H3_pos2	GTR+I+G
H3_pos3	JC+I

4 Výsledky

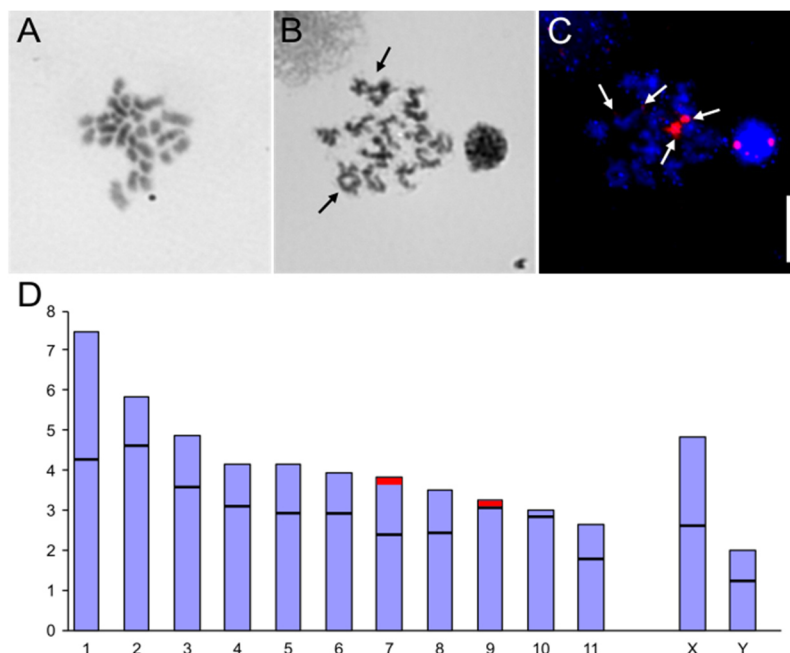
Celkem se podařilo získat cytogenetické údaje v rámci 13 druhů náležející do tří hlavních druhových skupin rozeznávaných v rámci rodu *Cyphophthalmus* (Tab. 7).

4.1 Chromozómové charakteristiky studovaných druhů

Dinárská skupina:

Cyphophthalmus duricorius Joseph, 1868

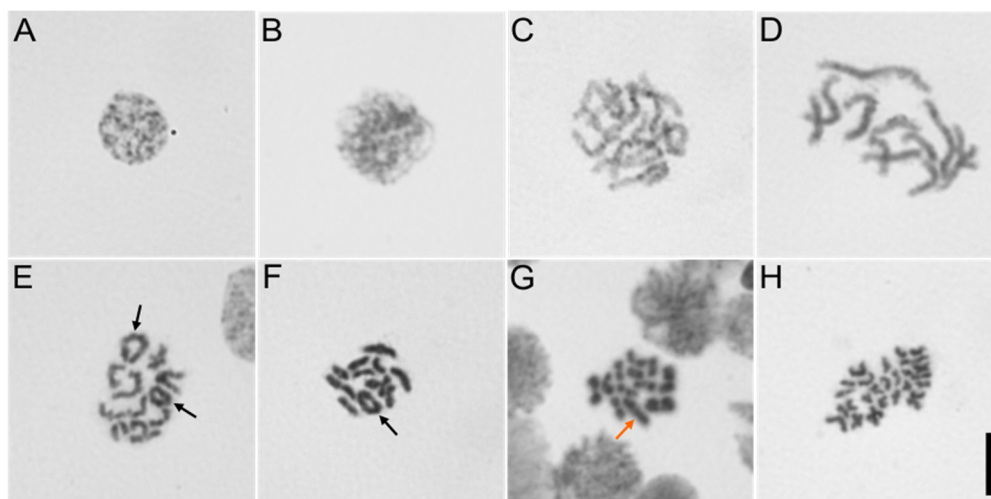
Všech 27 samců ze 17 lokalit a samice z jedné lokality, u kterých se podařilo získat údaje o karyotypech, vykazují stejný počet chromozómů $2n=24$ (Obr. 6A). Z morfologického hlediska lze v karyotypu druhu *C. duricorius* nalézt 2 páry metacentrických (pár č. 1 a 7), 4 páry submetacentrických (pár č. 3, 5, 8 a 11), 3 páry subtelocentrických (pár č. 2, 4 a 6) a 2 páry akrocentrických (pár č. 9 a 10) autozómů. Z ideogramu je patrná velikostní diference autozómů (Obr. 6D). První pár autozómů je nápadně delší (7,46 %) oproti následujícímu páru o 1,64 %. Také autozomy 2. (5,82 %) a 3. (4,87 %) páru jsou zřetelně delší než následující páry. Ostatní autozomy snižují svoji velikost pravidelně o cca 0,7 % od 4,16 % po 2,65 % haploidní sady. Analýza meiózy umožnila detekovat morfologicky diferencované pohlavní chromozomy typu XY. Pohlavní chromozóm X má velikost 4,81 % a je metacentrický, pohlavní chromozóm Y je také metacentrický s velikostí pouze 2,00 %. Během fáze diplotene můžeme pozorovat dva bivalenty s dvěma chiasmaty (Obr. 6B, 7E). Po aplikaci metody FISH s nepřímou značenou sondou pro gen 18S rDNA se podařilo lokalizovat 2 páry signálů (Obr. 6C). Přičemž jeden pár signálů je výrazně silnější než druhý. NORy u druhu *C. duricorius* jsou umístěné na terminální části krátkých ramének sedmého a devátého páru autozómů (Obr. 6D).



Obrázek 6: *Cyphophthalmus duricorius* ($2n=24$).

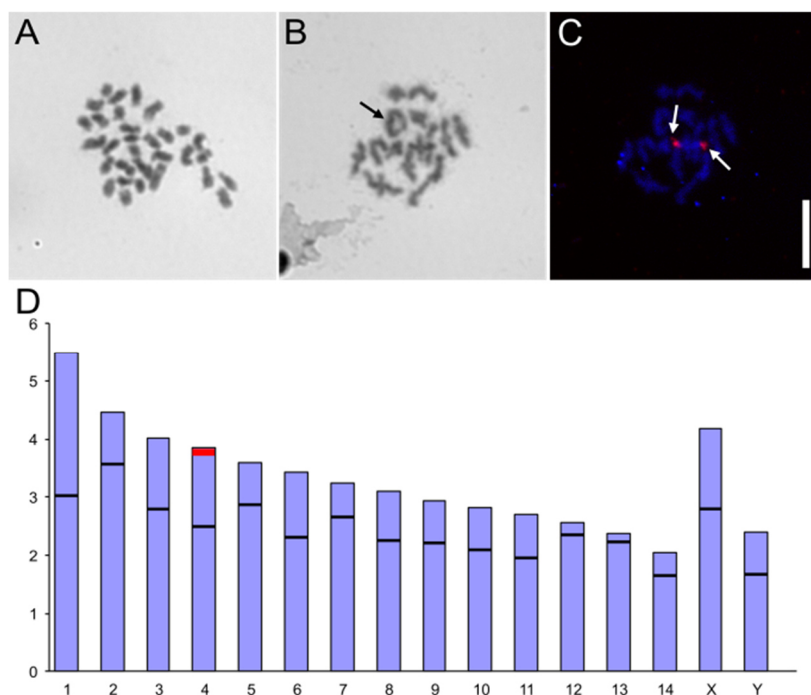
A – mitotická metafáze samice; B – diplotene, černé šipky označují bivalent s dvěma chiasmaty; C – diplotene po aplikaci FISH, bílé šipky označují pozici NORů; D – ideogram samice, červeně je označena pozice NORů. Osa y = % délka z celkové haploidní sady. Měřítko = 10 μ m.

U tohoto druhu se podařilo získat nejkompletnější sled jednotlivých fází meiotického cyklu. Počátečním stádiem meiózy je profáze (Obr. 7A). První fází, kdy začínají být rozeznatelné jednotlivé chromozómy, je leptotene (Obr. 7B). Probíhá zde proces spiralizace a kondenzace. Chromozómy se přeměňují do podoby tenkých a dlouhých vláken. Následuje fáze zygotene, kde dochází k párování homologických chromozómů (Obr. 7C). Zde můžeme prvotně pozorovat výrazné pozitivně heteropyknotické bloky, které mohou naznačovat pozici centromery. V další fázi pachytene dochází k úplnému spojení bivalentů po celé jejich délce (Obr. 7D). Pozitivně heteropyknotické bloky jsou i v této fázi nejvýraznější. V profázi I meiotického dělení byla prokázána přítomnost diplotene a diakineze (Obr. 7E a 7F). Během diplotene se začínají postupně oddělovat homologní chromozómy za vzniku chiazmat (Obr. 7E). Jelikož zde dochází k intenzivnější spiralizaci ramen chromozómů, tak zde a v následujících fázích meiózy již nejsou patrné pozitivně heteropyknotické bloky. Naopak jsou všechny chromozómy po celé své délce izopyknotické (Obr. 7E – 7H). Následuje chiazmatická fáze diakineze, během které pokračuje kondenzace chromatid, a dále pak terminalizace chiasmata (Obr. 7F). Metafáze I, která následuje, se prolíná s diakinezí a dochází při ní k napojení vláken dělicího vřeténka na centromery chromozómů (Obr. 7G). Zde také můžeme pozorovat heteromorfní bivalent dokládající přítomnost pohlavních chromozómů. Během ekvačního dělení se nejčastěji vyskytovaly metafáze II. V jejich průběhu sesterské chromatidy disociují od sebe, ale jsou stále spojeny centromerou (Obr. 7H).



Obrázek 7: Vybrané buněčné fáze druhu *Cyphophthalmus duricorius*: A – interfáze; B – leptotene; C – pozdní zygotene; D – pachytene; E – diplotene, černá šipka označuje bivalent s dvěma chiasmaty; F – diakineze, černé šipky označují bivalenty s dvěma chiasmaty; G – metafáze I, oranžová šipka označuje heteromorfní bivalent; H – metafáze II. Měřítka = 10 μ m.

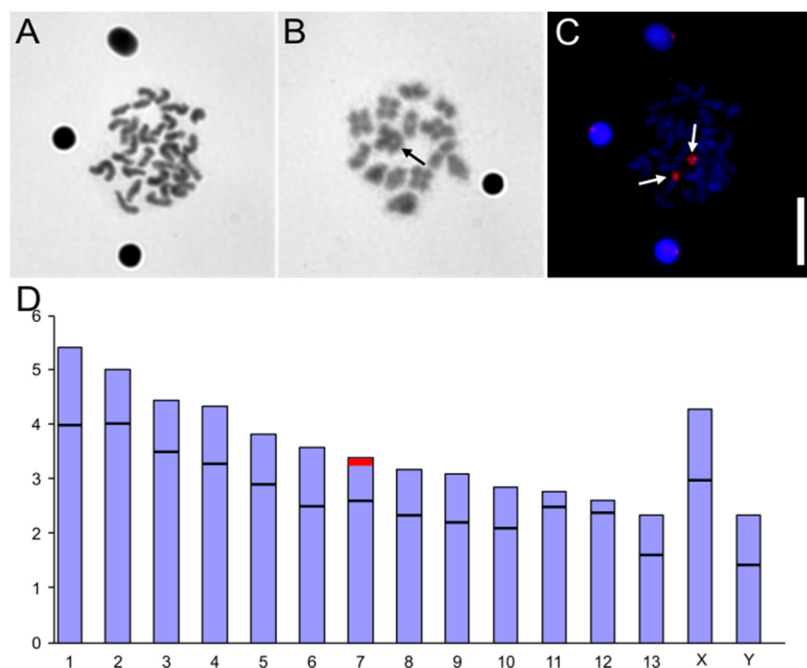
Kvalitní cytogenetické údaje se podařilo získat u tohoto druhu z jediného jedince z lokality Peskopi v Albánii. Počet chromozómů má tento druh $2n=30$ (Obr. 8A). Karyotyp obsahuje 1 pár metacentrických (pár č. 1), 6 párů submetacentrických, (pár č. 3, 4, 6, 8, 10 a 11) 5 párů subtelocentrických (pár č. 2, 5, 7, 9 a 14) a 2 páry akrocentrických autozómů (pár č. 12 a 13) (Obr. 8D). Na ideogramu je vidět, že se velikost autozómů postupně snižuje od 5,49 % po 2,04 % haploidní sady. Zjištěné pohlavní chromozómy X a Y jsou submetacentrické. Pro pohlavní chromozómy byla zjištěna relativní délka 4,18 % (X) a 2,4 % (Y). V rámci diakineze se zde vyskytuje jeden bivalent se dvěma chiasmaty (Obr. 8B). Metodou FISH byl detekován jeden pár signálu klastru genu 18S rDNA. Tento signál je lokalizován na terminální části krátkého raménka čtvrtého největšího chromozómu pro haploidní sadu (Obr. 8C a 8D).



Obrázek 8: *Cyphophthalmus cf. ere* ($2n=30$):

A – mitotická metafáze;
 B – diakineze, černá šipka označuje bivalent s dvěma chiasmaty;
 C – diakineze po aplikaci FISH, bílé šipky označují pozici NORů;
 D – ideogram samce, červeně je označena pozice NORů. Osa y = % délka z celkové haploidní sady. Měřítko = 10 μ m.

Druh *Cyphophthalmus martensi* má diploidní počet chromozómů 28 (Obr. 9A). Karyotyp obsahuje 6 párů submetacentrických (pár č. 1, 6, 8, 9, 10 a 13), 5 párů subtelocentrických (pár č. 2, 3, 4, 5 a 7) a 2 páry (pár č. 11 a 12) akrocentrických autozómů (Obr. 9D). Délka autozómů se postupně snižuje od 5,41 % po 2,33 % haploidní sady. Pohlavní chromozóm X má velikost 4,27 % a je submetacentrický. Nejmenším chromozómem karyotypu je pohlavní chromozóm Y (2,32 %), který je metacentrický. Během meiózy ve fázi diakineze můžeme pozorovat jeden bivalent s dvěma chiasmaty (Obr. 9B). Po aplikaci metody FISH lokalizujeme jeden pár signálu klastru genu 18S rDNA (Obr. 9C), který se vyskytuje na terminálních částech autozómů 7. páru (Obr. 9D).

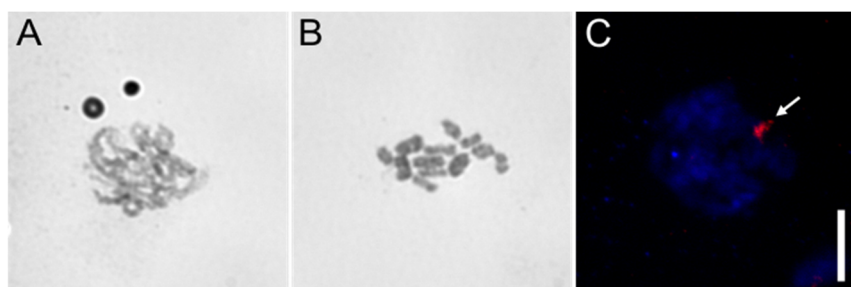


Obrázek 9: *Cyphophthalmus martensi* ($2n=28$):

A – mitotická metafáze; B – pozdní diakineze, černá šipka označuje bivalent s dvěma chiasmaty; C – mitotická metafáze po aplikaci FISH, bílé šipky označují pozice NORů; D – ideogram samce, červeně je označena pozice NORů. Osa y = % délka z celkové haploidní sady. Měřítko = 10 μ m.

Cyphophthalmus rumijae Karaman, 2009

Po analýze jednoho samce druhu *Cyphophthalmus rumijae* můžeme říci, že jejich diploidní počet je 24 (Obr. 10B). U tohoto druhu se bohužel nepodařilo získat kvalitní jádra vhodná pro detailnější stanovení morfologie a velikosti chromozómů. Během meiózy můžeme pozorovat fázi pachytene s výraznými pozitivně heteropyknotickými bloky (Obr. 10A). Po aplikaci metody FISH jsme lokalizovali jeden pár signálu klastru genu 18S rDNA na terminálních částech chromozómů (Obr. 10C).



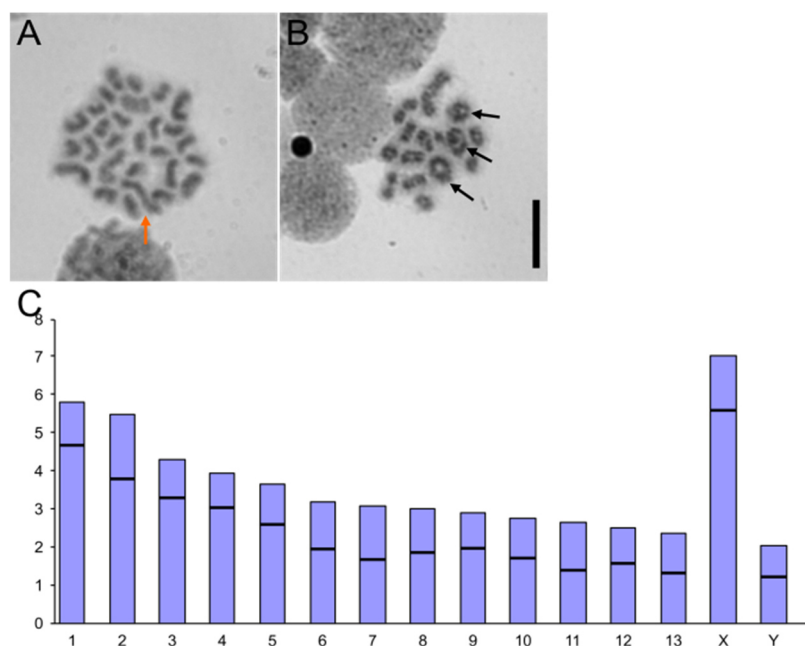
Obrázek 10: *Cyphophthalmus rumijae* ($2n=24$):

A – pachytene; B – diplotene; C – zygotene po aplikaci FISH, bílá šipka označuje pozici NORů. Měřítko = $10\mu\text{m}$.

Egejská skupina:

Cyphophthalmus corfuanus (Kratochvíl, 1938), cytotyp 1

V rámci druhu *Cyphophthalmus corfuanus* byla provedena analýza sedmi samců ze čtyř různých lokalit. V rámci tohoto materiálu byly identifikovány dva odlišné cytotypy lišící se diploidním počtem chromozómů. U samce identifikovaného jako *C. corfuanus* z lokality Liapades na ostrově Korfu byl zjištěn diploidní počet 28 (Obr. 11A). Jedinec s cytotypem 1 má 7 párů metacentrických (pár č. 6, 7, 8, 10, 11 a 13), 3 páry submetacentrických (pár č. 2, 5 a 9) a 3 páry subtelocentrických (pár č. 1, 3 a 4) autozómů, tudíž se zde nevyskytují jednoramenné chromozómy. Z ideogramu je také patrné, že dochází k postupnému snižování velikosti autozómů (Obr. 11C). V tomto případě je rozmezí autozómů 5,78 % a 2,35 % haploidní sady. U tohoto druhu se podařilo identifikovat pohlavní chromozómy XY. Pohlavní chromozóm X je subtelocentrický s délkou 7 % a Y (2,02 %) je metacentrický. Během fáze diakineze zde můžeme pozorovat 3 bivalenty s dvěma chiasmaty (Obr. 11B). Metoda FISH byla prováděna i v tomto případě, nicméně výsledky nelze vyhodnotit.

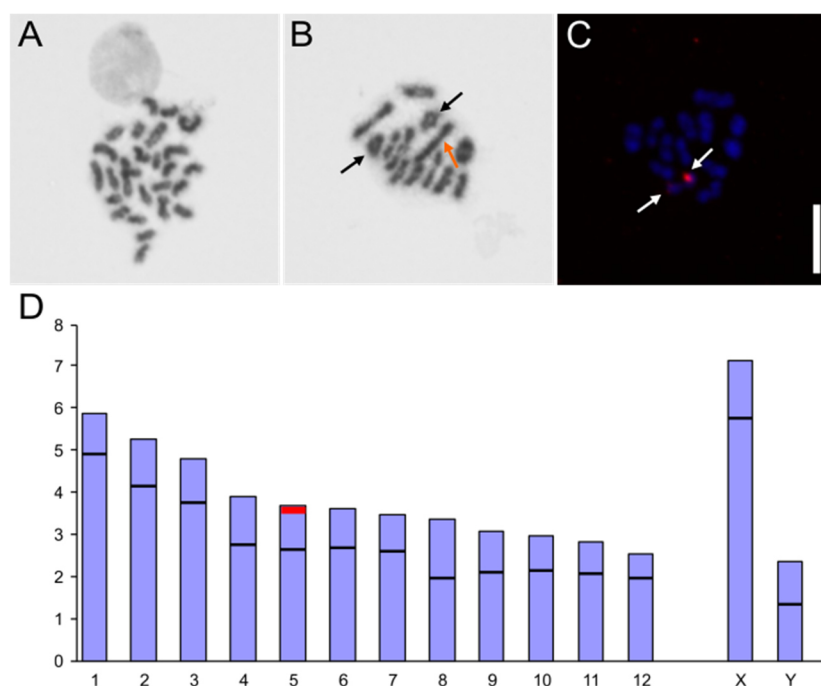


Obrázek 11: *Cyphophthalmus corfuanus*, cytotyp 1 ($2n=28$):

A – mitotická meta fáze, oranžová šipka označuje pohlavní chromozóm X; B – diakineze, černé šipky označují bivalenty se dvěma chiasmaty; C – ideogram samce. Osa y = % délka z celkové haploidní sady. Měřítko = 10 μ m.

Cyphophthalmus corfuanus (Kratochvíl, 1938), cytotyp 2

Cytotyp 2 ze tří lokalit na pevnině naproti ostrovu Korfu a jedné z lokality Liapades na ostrově má diploidní počet chromozómů 26 (Obr. 12A). Karyotyp zahrnuje pouze dvojramenné chromozómy z nichž 1 pár autozómů je metacentrický (pár č. 8), 6 párů autozómů je submetacentrických (pár č. 4, 5, 6, 9, 10 a 11) a posledních 5 párů autozómů je subtelocentrických (pár č. 1, 2, 3, 7 a 12) (Obr. 12D). Velikost autozómů se plynule zmenšuje od 5,88 % po 2,54 % haploidní sady. Dále se zde vyskytují pohlavní chromozómy XY (Obr. 12B). Pohlavní chromozóm X je subtelocentrický a se svojí velikostí (7,12 %) představuje nejdelší chromozóm v karyotypu. Pohlavní chromozóm Y je metacentrický a představuje naopak nejmenší chromozóm v karyotypu (2,34 %). V rámci diplotene a diakineze se podařilo identifikovat 2 bivalenty se dvěma chiasmaty (Obr. 12B). Pomocí metody FISH jsme zjistili přítomnost 1 páru klastru genu pro 18S rRNA na terminální části 5. páru autozómů (Obr. 12C a 12D).

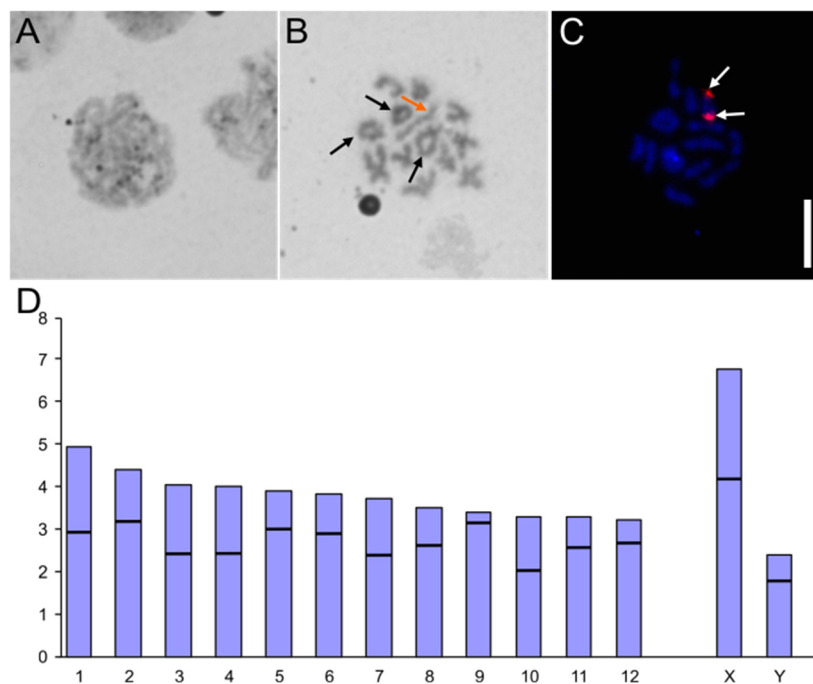


Obrázek 12: *Cyphophthalmus corfuanus*, cytotyp 2 ($2n=26$):

A – mitotická metafáze; B – diakineze, černé šipky označují bivalenty se dvěma chiasmaty, oranžová šipka označuje heteromorfní bivalent; C – diplotene po aplikaci FISH, bílé šipky označují pozici NORů; D – ideogram samce, červená část označuje pozici NORů. Osa y = % délka z celkové haploidní sady. Měřítko = 10 μ m.

Cyphophthalmus cf. eratoae Juberthie, 1968

Údaje o karyologii druhu *Cyphophthalmus cf. eratoae* se podařilo získat ze dvou jedinců z jedné lokality. Počet chromozómů pro diploidní sadu je u všech samců 26 (Obr. 13B). V haploidní sadě tohoto druhu byly zjištěny 4 páry metacentrických (pár č. 1, 3, 4 a 10), 2 páry submetacentrických (pár č. 2 a 7), 4 páry subtelocentrických (pár č. 5, 6, 8 a 11) a 2 páry akrocentrických (pár č. 9 a 12) autozómů. Z ideogramu je také patrné, že dochází k postupnému snižování autozómů (Obr. 13D). Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 4,95 % a 3,22 %. Pohlavní chromozóm X (6,75 %) je metacentrický a Y (2,40 %) submetacentrický. Během diakineze tvoří pohlavní chromozómy nápadný heteromorfní bivalent (Obr. 13B). Během meiózy byly na chromozómech ve fázi pachytene pozorovány pozitivně heteropyknotické bloky (Obr. 13A), které pravděpodobně odpovídají centromerám. Vzhledem k intenzivnější spiralizaci ramen chromozómů v pozdějších fázích meiózy již nejsou tyto bloky patrné a všechny chromozómy jsou po celé své délce izopyknotické (např. Obr. 13B). Během diakineze se podařilo pozorovat 3 bivalenty se dvěma chiasmaty (Obr. 13B). Po aplikaci metody FISH jsme lokalizovali jeden pár signálů klastru genu 18S rDNA na terminálních částech chromozómů. Nebylo však možné identifikovat o který chromozómový pár se přesně jedná (Obr. 13C).

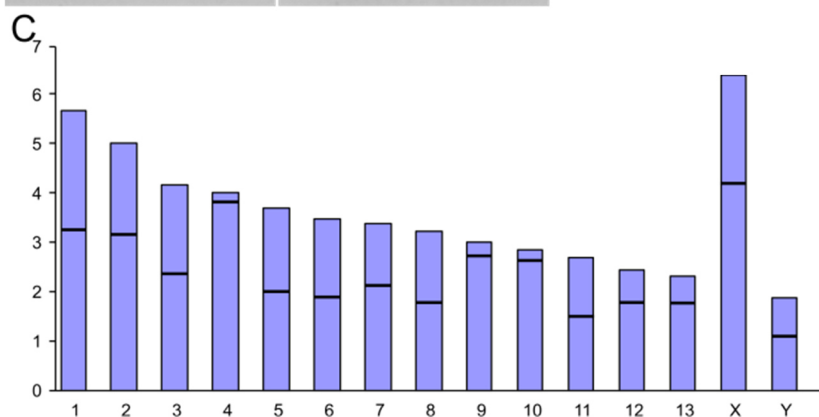
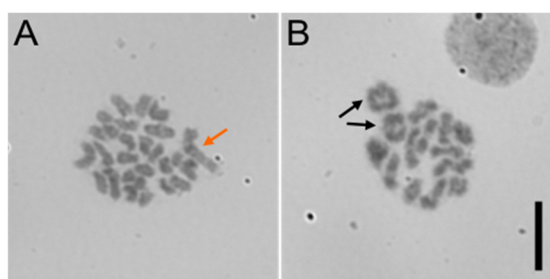


Obrázek 13: *Cyphophthalmus cf. eratoae* ($2n=26$):

A – pachytene; B – diakineze, černé šipky označují bivalenty se dvěma chiasmaty, oranžová šipka označuje heteromorfní bivalent; C – diplotene po aplikaci FISH, bílé šipky označují pozici NORů; D – ideogram samce. Osa y = % délka z celkové haploidní sady. Měřítko = 10 μ m.

Cyphophthalmus cf. serbicus Hadži, 1973

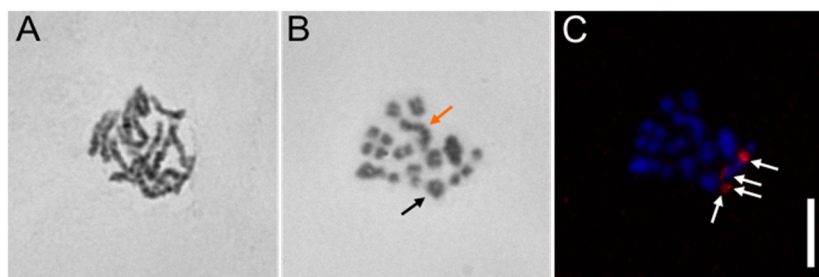
Diploidní počet druhu *Cyphophthalmus serbicus* je 28 (Obr. 14A). U tohoto druhu bylo zjištěno 6 párů metacentrických (pár č. 1, 3, 5, 6, 8 a 11), 2 páry submetacentrických (pár č. 2 a 7), 2 páry subtelocentrických (pár č. 12 a 13) a 3 páry akrocentrických (pár č. 4, 9 a 10) autozómů. Autozomy snižují svoji velikost postupně od 5,68 % po 2,32 % haploidní sady (Obr. 14C). Nejdelším chromozómem karyotypu je submetacentrický pohlavní chromozóm X (6,40 %) (Obr. 14A) a nejmenším je metacentrický pohlavní chromozóm Y (1,85 %). Během fáze diakineze se zde vyskytují dva bivalenty s dvěma chiasmaty (Obr. 14B). Metoda FISH byla prováděna i v tomto případě, nicméně výsledky nelze vyhodnotit.



Obrázek 14: *Cyphophthalmus cf. serbicus* (2n=28):

A – mitotická metafáze, oranžová šipka označuje pohlavní chromozóm X; B – diakineze, černé šipky označují bivalenty s dvěma chiasmaty; C – ideogram samce. Osa y = % délka z celkové haploidní sady. Měřítko = 10 μ m.

U druhu *C. zetae* se podařil získat záznam z jednoho jedince. Ten potvrdil diploidní počet chromozomů u tohoto druhu na 26 (Obr. 15B). Ve fázi pachytene pozorujeme pozitivně heteropyknotické bloky (Obr. 15A), které se následně v meióze díky větší spiralizaci chromozómů ztrácí a chromozómy jsou izopyknotické (Obr. 15B). Během fáze diakineze můžeme lokalizovat heteromorfní bivalent dokazující přítomnost pohlavních chromozómů XY. Dále v této fázi najdeme bivalent s dvěma chiasmaty (Obr. 15B). Pomocí metody FISH jsme u tohoto druhu lokalizovali dva páry signálů klastru genu pro 18S rRNA na terminálních částech chromozómů (Obr. 15C). Získaná data nemohla posloužit k detailní analýze karyotypu, tudíž nebylo možné sestavit ideogram, určit morfologické typy a přesnou pozici NORů.



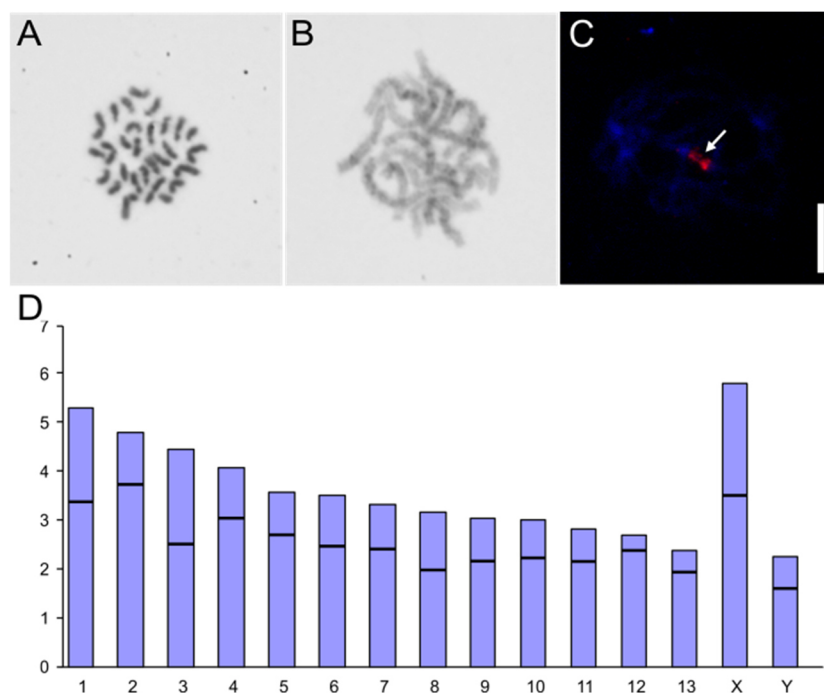
Obrázek 15: *Cyphophthalmus zetae* ($2n=26$):

A – pachytene; B – diakineze, oranžová šipka označuje heteromorfní bivalent, černá šipka označuje bivalent s dvěma chiasmaty; C – diakineze po aplikaci metody FISH, bílé šipky označují signály NORů. Měřítko = $10\mu\text{m}$.

Volos skupina:

Cyphophthalmus sp. 1

Informace o karyotypu tohoto druhu se podařilo získat u tří samců ze dvou lokalit. Diploidní počet byl u všech exemplářů roven 28 (Obr. 16A). Karyotyp obsahuje 1 pár metacentrických (pár č. 3), 6 párů submetacentrických (pár č. 1, 6, 7, 8, 9 a 10), 4 páry subtelocentrických (pár č. 2, 4, 5, 11) a 2 páry akrocentrických (pár č. 12 a 13) autozómů. Délka autozómů se kontinuálně snižuje od 5,29 % po 2,37 % (Obr. 16D). U tohoto druhu se podařilo identifikovat pohlavní chromozómy X a Y. Pohlavní chromozóm X je metacentrický a je největší z celého karyotypu (5,80 %). Submetacentrický pohlavní chromozóm Y naopak představuje nejmenší chromozóm karyotypu (2,25 %). V průběhu meiózy se během pachytene podařilo pozorovat nápadné pozitivně heteropyknotické bloky, které mohou naznačovat pozice centromery (Obr. 16B). Po aplikaci FISH jsme lokalizovali jeden pár signálu klastru genu 18S rDNA. Nebylo však možné identifikovat o který chromozómový pár se přesně jedná (Obr. 16C).

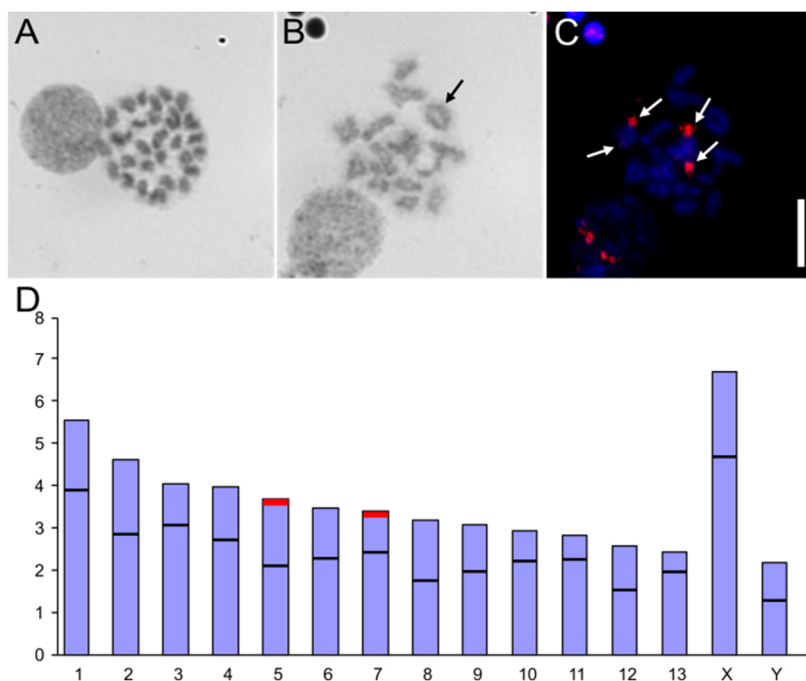


Obrázek 16: *Cyphophthalmus* sp. 1 ($2n=28$):

A – mitotická metafáze; B – pachytene; C – pachytene po aplikaci FISH, bílá šipka označuje pozici NORů; D – ideogram samce. Osa y = % délka z celkové haploidní sady. Měřítko = 10 μ m.

Cyphophthalmus sp. 2

Diploidní počet pro druh *Cyphophthalmus* sp. 2 je 28 (Obr. 17A), což bylo ověřeno u čtyř jedinců ze dvou lokalit. V karyotypu tohoto druhu se vyskytují 4 páry metacentrických (pár č. 2, 5, 8 a 12), 5 párů submetacentrických (pár č. 1, 4, 6, 7 a 9), 2 páry subtelocentrických (pár č. 3 a 10) a 2 páry akrocentrických (pár č. 11 a 13) autozómů. Dochází k postupnému snižování autozómů (Obr. 17D). První pár autozómů (5,55 %) je nápadně větší oproti druhému o 0,94 %. Dále pak velikosti autozómů začínají na 4,61 % a končí na 2,43 % s výrazně menšími rozdíly. Největším chromozómem je submetacentrický pohlavní chromozóm X (6,70 %) a nejmenším metacentrický pohlavní chromozóm Y (2,17 %). Během diakineze se zde vyskytuje jeden bivalent se dvěma chiasmaty (Obr. 17B). Metodou FISH jsme lokalizovali 4 signály klastru genu 18S rDNA v diploidní sadě, které se vyskytují terminálně na krátkých raménkách 5. a 7. páru autozómů (Obr. 17C).

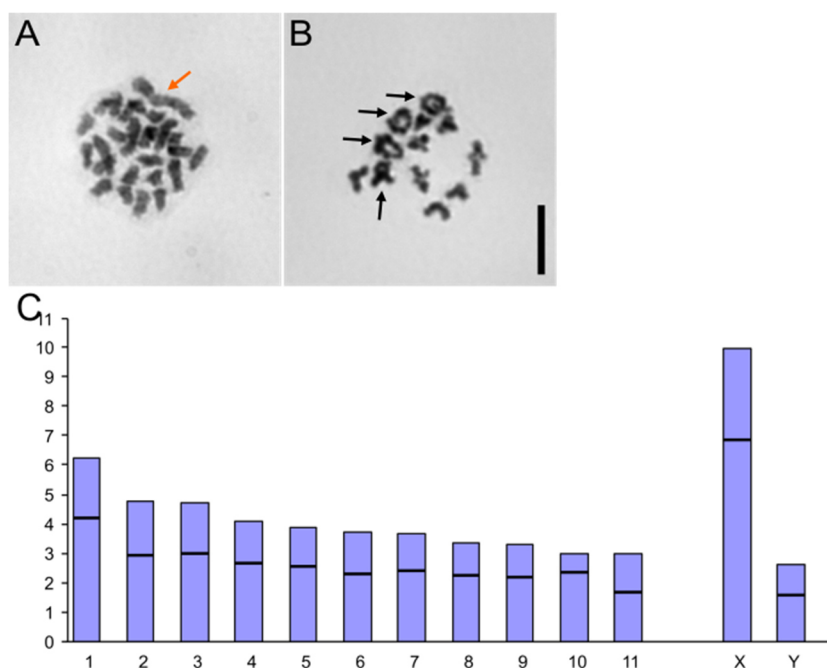


Obrázek 17: *Cyphophthalmus* sp. 2 ($2n=28$):

A – mitotická metafáze; B – diakineze, černá šipka označuje bivalent s dvěma chiasmaty; C – diakineze po aplikaci FISH, bílé šipky označují pozici NORů; D – ideogram samce, červeně je označena pozice NORů. Osa y = % délka z celkové haploidní sady. Měřítko = 10 μ m.

Cyphophthalmus sp. 3

V rámci druhu *Cyphophthalmus* sp. 3 se pozitivní cytogenetické výsledky podařilo získat u 3 jedinců ze 2 lokalit v centrální a jižní části Peloponéskeho poloostrova. Tento druh má diploidní počet 24 (Obr. 18A). V karyotypu se nevyskytují jednoramenné chromozómy. Jsou zde přítomny 3 páry metacentrických (pár č. 2, 6 a 11) 7 párů submetacentrických (pár č. 1, 3, 4, 5, 7, 8 a 9) a 1 pár submetelocentrických (pár č. 10) autozómů. Velikost autozómů se plynule snižuje od 6,23 % po 2,98 % haploidní sady (Obr. 18C). U tohoto druhu se podařilo identifikovat pohlavní chromozómy X (Obr. 18A) a Y. Pohlavní chromozóm X je submetacentrický a představuje nejdelší chromozóm v karyotypu (9,97 %) (Obr. 18A). Pohlavní chromozóm Y je metacentrický a dosahuje velikosti 2,60 %. Během diakineze můžeme pozorovat čtyři bivalenty se dvěma chiasmaty (Obr. 18B). Metoda FISH byla prováděna i v tomto případě, nicméně výsledky nelze vyhodnotit.

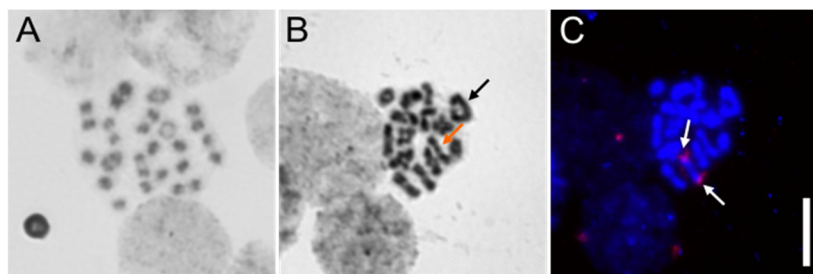


Obrázek 18: *Cyphophthalmus* sp. 3 ($2n=24$):

A – mitotická metafáze, oranžová šipka lokalizuje pohlavní chromozóm X; B – diakineze, černé šipky označují bivalenty s dvěma chiasmaty; C – ideogram samce. Osa y = % délka z celkové haploidní sady. Měřítko = 10 μ m.

Cyphophthalmus sp. 4

Z tohoto druhu se podařilo získat kvalitní chromozómové preparáty vhodné pro analýzu karyotypu pouze z jediného samce. Jeho diploidní počet je 30 (Obr. 19A). U tohoto druhu se bohužel nepodařilo získat kvalitní jádra vhodná pro detailnější stanovení morfologie a velikosti chromozómů. Během diakineze můžeme pozorovat jeden bivalent se dvěma chiasmaty a jeden heteromorfní bivalent, který představuje pohlavní chromozómy X a Y (Obr. 19B). Metodou FISH jsme lokalizovali jeden pár signálu klastru genu 18S rDNA, který se vyskytuje na terminálních částech středně velkého páru autozómů (Obr. 19C).



Obrázek 19: *Cyphophthalmus* sp. 4 ($2n=30$):

A – konec metafáze I, černé šipky označují bivalenty s dvěma chiasmaty; B – diakineze, oranžová šipka označuje bivalent pohlavních chromozómů XY, černé šipky označují bivalenty s dvěma chiasmaty; C – diakineze po aplikaci metody FISH, bílé šipky označují pozici NORů. Osa y = % délka z celkové haploidní sady. Měřítko = 10 μ m.

4.2 Fylogenetické analýzy

Na molekulárně fylogenetické analýzy byla použita sekvenční data z celkem 45 jedinců (28 vlastních, 17 z GenBank). Pro finální datový soubor bylo vybráno celkem 40 sekvencí genu pro COI, 30 sekvencí genu pro 28S rRNA a 28 sekvencí genu pro histon H3 (Tab. 7 Přílohy). Sekvence tří genů byly spojeny do konkatenované matrice o celkové délce 1865bp: COI (593bp), 28S (956bp) a H3 (316bp). Pro výpočet fylogenetických stromů byly použity dvě metody, bayesovská analýza (BA) (Obr. 20) a metoda maximální věrohodnosti (ML) (Obr. 21).

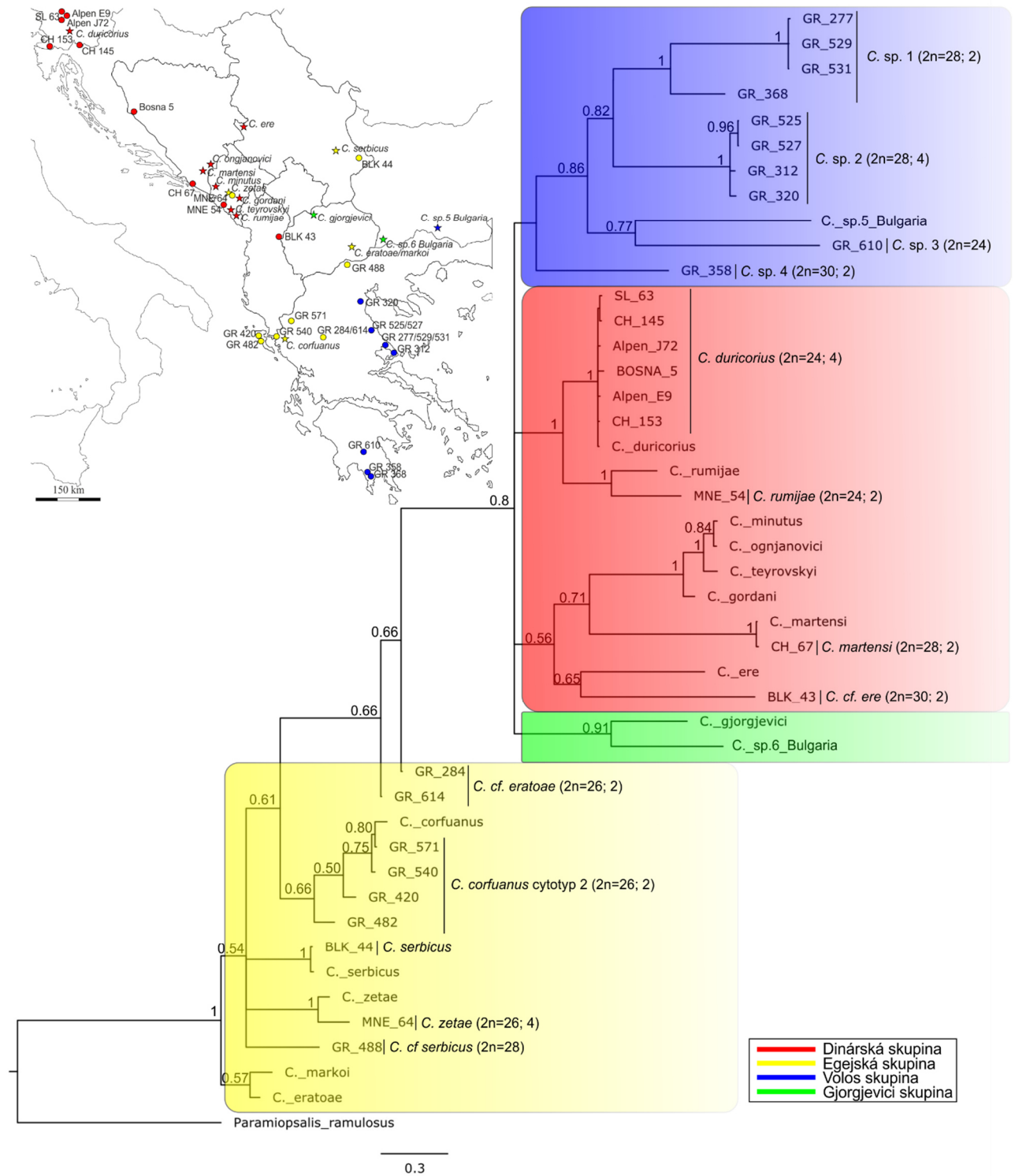
Fylogenetický strom je strukturovaný a klastruje do 4 hlavních skupin, shodných s recentním dělením rodu *Cyphophthalmus* na skupiny: Gjorgjevici, Dinárská, Egejská a Volos. Vlastní sekvenční data karyotypovaných jedinců korespondují se sekvenčními daty druhů rodu *Cyphophthalmus* z GenBank.

Egejská skupina, tvořící bázi fylogenetického stromu, je parafyletická. Bazální linie, sesterská ke zbývajícím zástupcům Egejské skupiny, je zastoupena druhy *Cyphophthalmus eratoae* a *C. markoi*. Vysoce podpořené monofyletické linie tvoří druhy *C. serbicus* a *C. zetae*. *C. cf. serbicus* pak utváří samostatnou linii bez zřejmé příslušnosti k *C. serbicus*. Vlastní skupinu bez vyšších podpor poté tvoří zástupci druhu *C. corfuanus*. Dále se zde vyskytuje skupina jedinců *C. cf. eratoae*, která nicméně společně netvoří klad.

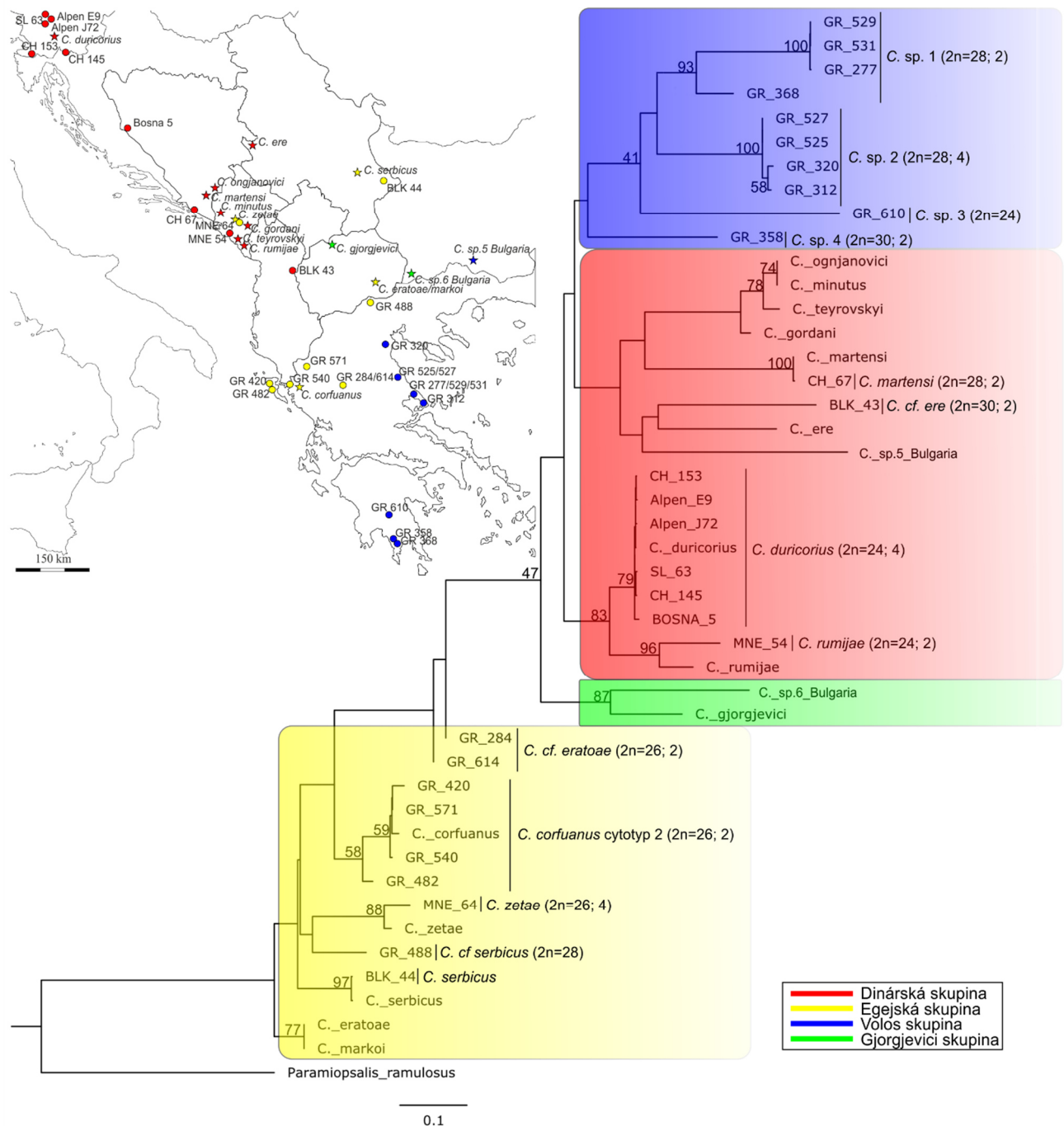
Gjorgjevici skupina tvoří klad zahrnující druhy *C. gjorgjevici* a *C. sp. 6 Bulgaria*. Tato skupina je sesterská ke zbylým dvěma skupinám, Dinárské a Volos.

Dinárská skupina je parafyletická a dělí se na dvě hlavní linie. První linii zastupuje druh *C. duricorius* tvořící monofyletickou skupinu. Stejně tak druh *C. rumijae* náležící do této linie vytváří monofyletickou skupinu. Dohromady tvoří celá linie klad vysocě podpořený oběma analýzami (BA a ML). Metoda ML naznačila, že by první linie mohla být sesterskou k druhé. Nicméně to BA analýza nepotvrdila. Druhá linie je zastoupena druhem *C. ere*, kladem troglobiontních druhů a druhem *C. martensi*.

Skupina Volos se jeví jako monofyletická, nicméně nacházíme pro ni nízké podpory. Tato skupina zahrnuje dosud nerozlišený druhový komplex. Jsou zde patrné 4 linie, vysocě podpořené *C. sp. 1* a *C. sp. 2*, dále *C. sp. 3* a *C. sp. 4*. Vnitřní topologie této skupiny vysocě podpořená není a zůstává blíže nerozřešenou.



Obrázek 20: Výsledná Bayesovská analýza (BA) vlastních sekvencí a sekvencí získaných z Genbank. Byly použity geny pro COI, 28S a histon H3. U vlastního materiálu je doplněný počet chromozómů (2n) a počet NORů. Vlevo nahoře je mapka lokalit analyzovaného materiálu, kolečka: vlastní materiál, hvězdičky: sekvence z GenBank



Obrázek 21: Výsledná analýza maximální věrohodnosti (ML) vlastních sekvencí a sekvencí získaných z Genbank. Byly použity geny pro COI, 28S a histon H3. U vlastního materiálu je doplněn počet chromozómů (2n) a počet NORů. Vlevo nahoře je mapka lokalit analyzovaného materiálu, kolečka: vlastní materiál, hvězdičky: sekvence z GenBank

5 Diskuze

5.1 Karyotypová variabilita rodu *Cyphophthalmus*

V rámci diplomové práce bylo popsáno celkem 13 karyotypů druhů rodu *Cyphophthalmus*: *C. duricorius*, *C. cf. ere*, *C. martensi*, *C. rumijae*, *C. corfuanus* cytotyp 1, *C. corfuanus* cytotyp 2, *C. cf. eratoae*, *C. cf. serbicus*, *C. zetae*, *C. sp 1*, *C. sp 2*, *C. sp 3* a *C. sp. 4*.

Analýza průběhu meiotického a mitotického dělení a porovnání karyotypů studovaných druhů potvrdily základní cytogenetické charakteristiky řádu sekáči (Opiliones). Analyzovaní zástupci rodu *Cyphophthalmus* stejně jako všichni ostatní sekáči mají monocentrické chromozómy, obvykle s dobře rozeznatelnou polohou centromery v podobě primární konstrikce během mitotické metafáze. Popřípadě je oblast centromery výrazně pozitivně heteropyknotická. Což bylo pozorováno u jedinců *C. duricorius*, *C. rumijae*, *C. zetae*, *C. cf. eratoae* a *C. sp. 1*. Obecně jsou v karyotypech sekáčů nejvíce zastoupeny metacentrické a submetacentrické chromozómy (Tsurusaki 2007). Nicméně v rámci některých paroztočů byl zjištěn poměrně vysoký podíl jednoramenných chromozómů. Zejména se to týká obou doposud cytogeneticky studovaných druhů rodu *Siro* (Juberthie 1956, Svojanovská et al. 2016). U dalších druhů podřádu *Cyphophthalmi* se v karyotypech vyskytuje již nižší podíl jednoramenných chromozómů (Svojanovská et al. 2016). Také u druhů rodu *Cyphophthalmus* analyzovaných v této diplomové práci byl zjištěn nižší podíl jednoramenných chromozómů. Tři druhy (*C. corfuanus* cytotyp 1, *C. corfuanus* cytotyp 2 a *C. sp. 3*) nemají dokonce žádné akrocentrické chromozómy ve svém karyotypu. Naproti tomu u druhu *C. cf. serbicus* bylo identifikováno nejvíce párů (3) akrocentrických chromozómů. Nízká kvalita a malá velikost analyzovaných chromozómů v některých případech neumožnila zcela přesnou identifikaci polohy centromery, a tudíž může být podíl jednoramenných chromozómů u některých druhů o něco vyšší.

Typickým znakem sekáčů potvrzeným i v předkládané práci je přítomnost chiasmatické meiózy s nižšími počty chiazmat. Tento znak je častý i u dalších studovaných pavoukovců (např. Dolejš et al. 2011). Zvýšený počet chiazmat (vždy maximálně dvě v rámci jednoho bivalentu) najdeme pouze u druhů, u kterých se v karyotypu vyskytují velké chromozómy, které pravděpodobně vznikly fúzí dvou či více chromozómů. U předkládané studie bylo identifikováno hned několik druhů s přítomnými bivalenty s dvěma chiasmaty ve fázi diakineze (Tab. 6). V rámci Dinárské skupiny se jednalo o tři druhy (*C. duricorius*, *C. cf. ere* a *C. martensi*). U nich byl lokalizován vždy jeden bivalent s dvěma chiasmaty. Stejně tomu bylo i v předešlých studiích, kde byl lokalizován jeden bivalent s dvěma chiasmaty během fází diakineze a diplotene u druhu *Austropurcellia arctica* (Šťáhlavský et al. 2012a), *Paramiopsalis cf. ramulosus*, *Siro carpaticus*

a *Cyphophthalmus duricorius* (Svojanovská et al. 2016). Také při analýze druhů *C. zetae* z Egejské, *C. sp. 2* a *C. sp. 1* z Volos skupiny jsme lokalizovali jeden bivalent s dvěma chiasmaty. Dále byla zjištěna variabilita v počtu bivalentů s dvěma chiasmaty u druhu *C. corfuanus* s dvěma cytotypy sympatricky se vyskytujícími v rámci ostrova Korfu. Cytotyp 1 má přítomny tři bivalenty s dvěma chiasmaty a naopak cytotyp 2 má přítomny tyto bivalenty pouze dva. Také u druhu *C. cf. serbicus* byly přítomny dva bivalenty s dvěma chiasmaty. Největší zajímavostí je druh *C. sp. 3*, u kterého byly zjištěny hned čtyři bivalenty s dvěma chiasmaty. Tento druh má diploidní počet 24, tudíž lze předpokládat, že ke snížení diploidního počtu došlo pomocí fúzí dvou či více chromozómů a nyní jsou výrazně větší oproti zbylým autozómům.

Zajímavým zjištěním diplomové práce je přítomnost zřetelně diferenciovaných pohlavních chromozómy typu XY u všech analyzovaných druhů. Dosavadní práce studující cytogenetiku sekáčů podřádu Cyphophthalmi nicméně doposud diferenciované pohlavní chromozómy nezjistily (Juberthie 1956, Šťáhlavský et al. 2012a, Svojanovská et al. 2016). Absence morfologicky diferenciovaných pohlavních chromozómů se u celého řádu sekáčů předpokládá za původní znak (Tsurusaki 2007), stejně jako u celé třídy pavoukoců (Král et al. 2008). V rámci řádu sekáči se pohlavní chromozómy diferencovaly pravděpodobně nezávisle na sobě (Tsurusaki 2007) a stejný pohlavní systém jako u analyzovaných paroztočů (XY) byl identifikovaný v rámci různých evolučních skupin sekáčů. U čeledi Sclerosomatidae z podřádu Eupnoi byl tento systém identifikován již u 13 druhů (Tsurusaki et al. 2017). U analyzovaných druhů podřádu Dyspnoi byla potvrzena přítomnost pohlavního systému XY pouze u druhu *Sabacon makinoi* Suzuki, 1949. V této diplomové práci byl u všech studovaných druhů detekován heteromorfní bivalent během meiotického dělení, dokládající přítomnost pohlavního systému XY. V rámci dvou studovaných skupin (Egejská a Volos) byl navíc pohlavní chromozóm X vždy výrazně největším chromozómem karyotypu. Naopak pohlavní chromozóm Y byl vždy nejmenší z celé sady. Takto výrazně velikostně diferencované pohlavní chromozómy nejsou u ostatních sekáčů známé. Rozdíly mezi nimi a autozómy většinou nejsou tak zřetelné (Tsurusaki 1985, Tsurusaki a Cokendolpher 1990, Tsurusaki 2007). Podobně jako tomu je i u druhů Dinárské skupiny. Přestože velikost pohlavních chromozómů může být mezi jednotlivými skupinami různá, jejich morfologie byla u studovaných druhů většinou uniformní (submetacentrický až metacentrický pohlavní chromozóm X a Y). Což odpovídá morfotypům pohlavních chromozómů XY u jiných skupin sekáčů (Tsurusaki et al. 2017). Jedinou zřetelnou výjimku představují oba cytotypy druhu *C. corfuanus*, které mají pohlavní chromozómu X subtelocentrický (Tab. 6). Subtelocentrický pohlavní chromozóm X se vyskytuje také u dvou druhů sekáčů *Leiobunum kohyai* Suzuki, 1953 (Tsurusaki 1985) a *Melanopa grandis* Roewer, 1910 (Tsurusaki a Cokendolpher 1990) oba

z čeledi Sclerosomatidae (podřád Eupnoi). Vzhledem ke zřetelné a podobné morfologické diferenciaci pohlavních chromozómů u všech zástupců rodu *Cyphophthalmus* se dá předpokládat, že tyto pohlavní chromozómy jsou společným znakem pro tento rod a že absence pohlavních chromozómů u druhu *C. duricorius* v publikované práci Svojanovská et al. (2016) je pravděpodobně důsledek chybné interpretace analyzovaného materiálu způsobené absencí dostatečného množství kvalitních jader.

Sekáči představují skupinu pavoukoců, která se vyznačuje velkým rozpětím počtu chromozómů od $2n=10$ (Dyspnoi: Ischyropsalidae a Eupnoi: Sclerosomatidae) do 109 (Laniatores: Gonileptidae) (Tsurusaki et al. 2017). Tato celková variabilita odpovídá situaci u obdobně diverzifikovaných a cytogeneticky prozkoumaných řádů jako jsou pavouci ($2n=7-114$) (Suzuki 1954; Král et al. 2011), štíři ($2n=5-175$) (Shanahan 1989, Schneider et al. 2009) a štírci ($2n=7-143$) (Šťáhlavský et al. 2006 a Šťáhlavský et al. 2012b). U sekáčů jsou nicméně diploidní počty jednotlivých vnitřních skupiny méně variabilní, což dokládají i získané výsledky u rodu *Cyphophthalmus* na Balkáně ($2n=24-30$). Nejvyšší rozsah diploidních počtů chromozómů vykazuje u sekáčů podřád Laniatores, kde je $2n = 40-09$ po analýze 11 druhů. Nižší diploidní počty jsou typické pro podřady Eupnoi ($2n=10-36$) a Dyspnoi ($2n=10-28$) (Tsurusaki et al. 2017). Původním diploidním počtem u sekáčů je pravděpodobně 30 chromozómů (Tsurusaki 2007).

Podřád Cyphophthalmi je hlubokou linií sekáčů, a tudíž se u něj dlouho předpokládal výskyt zmíněného původního diploidního počtu 30 (Tsurusaki 2007). Nejnovější cytogenetické studie, které se věnovaly podřadu Cyphophthalmi, nastínily, že diploidní počty a morfologie chromozómů není tak uniformní, jak se v rámci této starobylé skupiny předpokládalo. (Svojanovská et al. 2016, Šťáhlavský et al. 2012). Tato diplomová práce potvrdila mezidruhovou variabilitu karyotypů u rodu *Cyphophthalmus* na Balkáně, a to jak v diploidních počtech, tak v morfologii chromozómů. Tato variabilita se vyskytuje i v rámci jednotlivých skupin, do kterých je rod rozdělen: Dinárská ($2n=24-30$), Egejská ($2n=26-28$), Gjorgjevici a Volos ($2n=24-30$). Mezidruhovou variabilitu v karyotypech nacházíme i u jiného rodu podřadu Cyphophthalmi. Jedná se o rod *Siro*, u kterého má jeden druh (*Siro rubens*) diploidní počet 30 a druhý výrazně vyšší $2n=52$ (*Siro carpaticus*). Mezidruhová variabilita se vyskytuje i v rámci celého řádu sekáči (Opiliones). Například u nejvíce cytogeneticky prozkoumané (42 analyzovaných druhů) čeledi Sclerosomatidae z podřadu Eupnoi byla také zjištěna výrazná variabilita v diploidních počtech (10–48). Stejně tak se vyskytuje variabilita diploidních počtů u druhů z čeledi Phalangiidae (13 analyzovaných druhů), které se pohybují mezi 16–36 (Tsurusaki 2007). Rozdíly v počtech a morfologii chromozómů u jednotlivých skupin sekáčů jsou natolik výrazné, že se dají použít k odlišování jednotlivých druhů.

Předkládaná diplomová práce odhalila i možnou vnitrodruhovou variabilitu u sekáčů podřádu Cyphophthalmi. U studovaného druhu *C. corfuanus* byly zjištěny dva odlišné cytotypy. První má diploidní počet 28 (1 analyzovaný jedinec) a vyskytuje se na ostrově Korfu sympatricky s druhým cytotypem, který má diploidní počet 26 (6 analyzovaných jedinců). Druhý cytotyp se zdá být dominantním, vzhledem k jeho rozšíření i mimo ostrov Korfu na pevninu Balkánského poloostrova. Cytotypy druhu *C. corfuanus* se od sebe liší také morfologií autozómů. U prvního dominují metacentrické páry autozómů, naopak u druhé nacházíme spíše submetacentrické až subtelocentrické páry autozómů. U obou cytotypů se nevyskytují jednoramenné chromozómy. Ukazuje se tedy, že variabilita v rámci rodu *Cyphophthalmus* nemusí být striktně geograficky vymezená, jako tomu naopak je u jiných skupin sekáčů. Například u čeledi Sabaconidae z podřádu Dyspnoi a do ní patřícího rodu *Sabacon* (Sabaconidae), kde byla zjištěna variabilita v počtu chromozómů v rámci jednoho druhu *S. makinoi* ($2n=10; 12; 14$) v závislosti na geografické poloze (Tsurusaki 1989). Za zmínku stojí také vysoce variabilní druh *Leiobunum montanum* Suzuki, 1953 z podřádu Eupnoi ($2n=16-24$). U tohoto druhu se jedná se o variabilitu, která má také jasný geografický vzor s poměrně úzkými hybridními zónami. Zde jednotlivé populace selekčním tlakem vytvořily hned několik cytotypů (Tsurusaki 1985). Další možné vysvětlení existence odlišného počtu chromozómů u jedince *C. corfuanus* můžeme nalézt v rámci cytogeneticky analyzovaných druhů sekáčů z podřádu Laniatores (zvláště čeleď Gonyleptidae), u kterých byla také zjištěna vnitrodruhová variabilita. Zde byla dokonce zjištěna i variabilita v rámci jednotlivých jedinců. Autoři tyto rozdíly vysvětlují jako možné nepřesnosti z důvodu nízké kvality chromozómových preparátů a jako artefakty vznikající během přípravy chromozómových preparátů (Oliveira et al. 2006). Zjištěné počty chromozómů v rámci všech analyzovaných jedinců rodu *Cyphophthalmus* v diplomové práci jsou nicméně vždy konzistentní, a tak se nedá předpokládat, že odlišný počet *C. corfuanus* vznikl jako artefakt během přípravy chromozómových preparátů. Dalším možným vysvětlením odlišného diploidního počtu by mohl být výskyt tzv. B chromozómů. Jako tomu bylo u druhu *Phalangium opilio* Linnaeus, 1761 (podřád Eupnoi), kde byl zjištěn diploidní počet 32 (Tsurusaki a Cokendolpher 1990 a Sokolow 1930) a 24 (Juberthie 1956) s osmi páry akrocentrických chromozómů. Variabilita v diploidním počtu u tohoto druhu je způsobena fluktuací počtu B chromozómů v karyotypu (Tsurusaki 2007). U žádného analyzovaného druhu z podřádu Cyphophthalmi nicméně zatím nebyl potvrzen výskyt B chromozómů a párování a segregace chromozómů u *C. corfuanus* výskyt tohoto typu chromozómů také nenasvědčují. Navíc oba cytotypy druhu *C. corfuanus* se liší nejen diploidním počtem ale také morfologií chromozómů. Nejpravděpodobněji proto různé cytotypy zjištěné u druhu *C. corfuanus* ve skutečnosti odrážejí existenci kryptických druhů se sympatrickým výskytem, na jejichž častou existenci upozorňuje i Karaman (2009). Bohužel v případě jediného

jedince *C. corfuanus* s cytotypem 1 se nepodařilo získat kvalitní sekvence pro analýzu DNA, která by tuto otázku pomohla řešit. Výše zmíněné druhy sekáčů se zjištěnou vnitrodruhovou variabilitou (zejména *S. makinoi* a *L. montanum*) vykazují široké rozšíření v rámci oblasti, kde se vyskytují. K rozrůznění jejich karyotypů pravděpodobně došlo jakožto důsledek izolace populací vlivem geografických bariér (Tsurusaki 1985, 1989). V rámci analyzovaných druhů rodu *Cyphophthalmus* má největší rozšíření v rámci Balkánského poloostrova druh *C. duricorius*. Ten se navíc vyskytuje v hornatých oblastech s častým výskytem různých geografických bariér, a tak by se u tohoto druhu dala také očekávat určitá vnitrodruhová variabilita. Bylo analyzováno celkem 28 jedinců tohoto druhu z 19 lokalit a žádná variabilita v karyotypu nebyla zjištěna, a to i přes to, že hlavní diverzifikace rodu *Cyphophthalmus* začala asi před 94 miliony lety a *C. duricorius* se odštěpil od sesterského druhu *C. rumijae* před asi 30 miliony let (Murienne et al. 2010). Uniformní karyotypy a také poměrně nízká genetická divergence analyzovaného materiálu tudíž naznačují, že do současného areálu se tento druh rozšířil až v mnohem recentnější době.

5.2 Výskyt nukleolárních organizátorů jadérka v genomu samců

Pro objasnění různých procesů, které vedou ke změnám v karyotypech studovaných druhů, se využívá detekce pozice klastrů rDNA. Podle nich se dají předpokládat možné přestavby, fúze, rozpady či další změny v rámci chromozómů během speciace (Svojanovská et al. 2016). Nejčastěji používanou metodou je tzv. metoda stříbření, která umí lokalizovat pouze transkripčně aktivní rDNA klastry (Oliveira et al. 2006). U sekáčů byl touto metodou ve dvou studiích vizualizován pouze jeden rDNA klastř u dvou druhů *Psathyropus tenuipes* L. Koch, 1878 (Sclerosomatidae) (Gorlov a Tsurusaki 2000) a *Dyscocyrtus pectinifemur* Mello-Leitao, 1937 (Gonyleptidae) (Schneider et al. 2008). Dále se povedlo identifikovat jeden pár rDNA klastru u druhu *Goniosoma spelaum* Mello-Leitao, 1932 (Oliveira et al. 2006). Také u jiných řádů pavoukoců jsou data o pozici a počtu rDNA klastrů metodou stříbření pouze fragmentárního rázu. Konkrétně se jedná o zhruba 30 druhů pavouků (Král et al. 2006, 2011, 2013, Dolejš et al. 2011), cca 15 druhů štírů (Schneider et al. 2009, a Mattos et al. 2013) a 1 druh u řádu Palpigradi (Král et al. 2008). Nicméně se ukazuje, že metoda stříbření není dostatečná pro detekci skutečného množství rDNA klastrů. Například u pavouka druhu *Wadicosa fidelis* (O. Pickard-Cambridge, 1872) metoda stříbření detekovala 6 chromozómů obsahujících rDNA klastř. Po aplikaci metody FISH se ukázalo, že takových pozic je ve skutečnosti až 19 (Forman et al. 2013). Také z toho důvodu se v současných pracích využívá zejména metoda fluorescenční *in situ* hybridizace se specifickou sondou pro rDNA klastř (např. Schneider a Cella 2010, Forman et al. 2013, Paula-Neto et al. 2013, Adilardi et al. 2014, 2015, Mattos et al. 2014, Sadílek et al. 2015, Svojanovská et al. 2016 a Almeida et al. 2017).

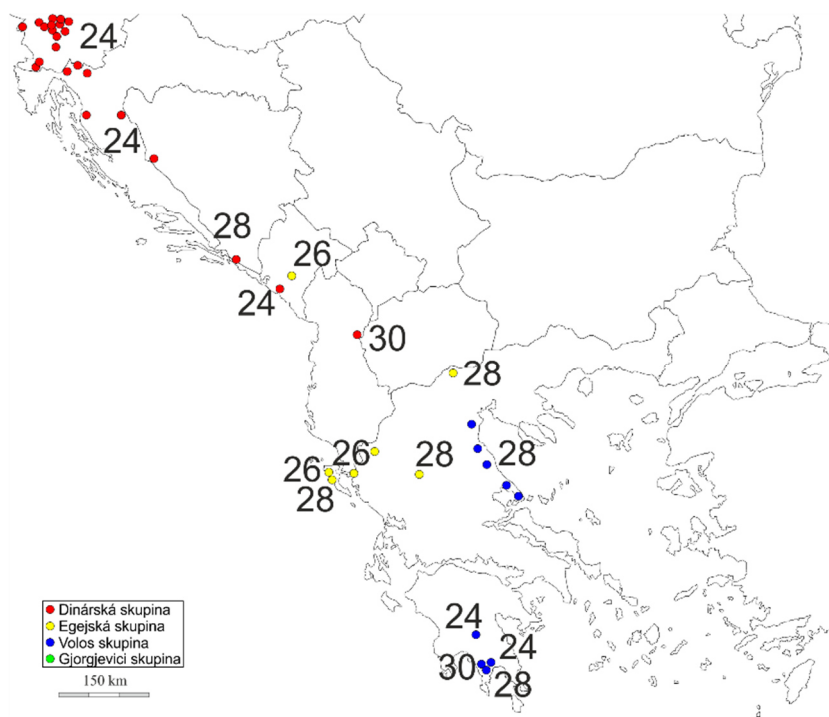
Předpokládá se, že původním počtem rDNA klastrů pro pavoukovce je jeden pár vyskytující se na terminální pozici chromozómu (Forman et al. 2013). První rozsáhlejší studii, která použila metodu FISH pro detekci rDNA klastrů u sekáčů, byla až studie Svojanovská et al. (2016). V této studii byla aplikována celkem na 6 druhů. Druh *Miopsalis sp.* (Styllocelidae) měl jeden pár NORů na terminální pozici kratšího raménka sedmého páru chromozómů. Přičemž jeho diploidní počet odpovídá pro sekáče původnímu (30) a v karyotypu se nevyskytuje žádný akrocentrický pár chromozómů. Tudíž se lze domnívat, že by tento model karyotypu mohl být skutečně původním. Druhy *C. duricorius*, *Siro carpaticus*, *Paramiopsalis ramulosus* a *Austropurcellia arctica* mají po dvou párech NORů také na terminálních částech chromozómů. V jejich karyotypech se již vyskytují páry akrocentrických chromozómů (Svojanovská et al. 2016). Tyto údaje naznačují, že během karyotypové evoluce podřádu Cyphophthalmi došlo v rámci karyotypů jednotlivých druhů k určitým přestavbám a fúzím. Pro podrobnější předpoklady je zapotřebí získat více údajů o pozicích a počtech NORů (Svojanovská et al. 2016). Takové údaje by mohla rozšířit tato diplomová práce, ve které byla použita metoda FISH s nepřímo značenou sondou pro 18S rDNA s pozitivními výsledky celkem u 10 druhů (Tab. 6). Pozice NORů v rámci chromozómu byla u všech studovaných druhů stejná, a to na terminálních částech kratšího raménka chromozómů, jako tomu bylo u předešlých analýz sekáčů a různých skupin pavoukovců. Bohužel se nepodařilo u všech druhů, u kterých byla aplikována metoda FISH, lokalizovat přesný chromozómový pár, na kterém se NORy vyskytují. Nicméně se ukazuje, že zde je určitá variabilita v jejich pozici. Nacházíme je totiž na chromozómových párech různých velikostí a různé morfologie (Tab. 6). Variabilitu nacházíme také v počtech signálů pro 18S rDNA klastr (Tab. 6). V rámci každé studované skupiny rodu *Cyphophthalmus* se vyskytují druhy, jež mají jeden pár NORů stejně tak i druhy nesoucí páry dva a ke zmnožení počtu NORů pravděpodobně došlo u rodu *Cyphophthalmus* několikrát nezávisle na sobě. Zdá se tudíž, že změny počtu NORů u pavoukovců mohou být mnohem běžnější což dokládají aktuální údaje v rámci různých řádů pavoukovců (Forman et al. 2013, Svojanovská et al. 2016 a Almeida et al. 2017).

5.3 Karyotypová evoluce rodu *Cyphophthalmus* na Balkáně

Aby bylo možné lépe pochopit karyotypovou evoluci rodu *Cyphophthalmus* na Balkáně, je potřeba znát vzájemné fylogenetické vztahy studovaných druhů. Následnou syntézou karyologických dat a fylogenetických analýz je možné nastínit vývoj karyotypů jednotlivých skupin a odhadnout procesy vedoucí k druhové diferenciaci. Také lze pomocí této syntézy sledovat dynamiku chromozómových párů nesoucích NOR. Fylogenetické vztahy rekonstruované pomocí tří genů v rámci diplomové práce bohužel nejsou u analyzovaného materiálu v mnoha případech dostatečně podpořeny, a tudíž nám v mnoha případech umožňují pouze nastínit základní hypotézy. Podařilo se zejména potvrdit existenci některých druhových skupin, které odpovídají již původně navrženému modelu od Karamana (2009), a následně navazující molekulárně fylogenetické studie Murienne et al. (2010), který rozdělil rod do čtyř skupin (Dinárská, Egejská, Gjorgjevici a Volos). Dále nám také ukazují, že je v rámci každé skupiny výrazná mezidruhová variabilita v diploidních počtech.

Rod *Cyphophthalmus* na Balkánském poloostrově je velice starobyrou skupinu. Na základě datování pomocí molekulárních hodin bylo stanovené stáří rodu na 94,2 milióny let (Murienne et al. 2010). Dále se předpokládá, že hlavní diferenciaci jednotlivých skupin do podoby, jak ji známe teď (Dinárská, Egejská, Gjorgjevici a Volos) proběhla již před cca. 80 milióny lety. Lze tedy předpokládat, že jednotlivé skupiny jsou v rámci Balkánského poloostrova dlouhodobě izolovány. Podle dnešního ostrůvkovitého rozšíření můžeme také předpokládat, že jednotlivé skupiny obývaly během zalednění různá refugia. Na základě těchto faktů se dá předpokládat, že změny karyotypů rodu *Cyphophthalmus* se musely dít minimálně v rámci rozeznávaných skupin nezávisle. Předěšlé studie odhadují ancestrální typ karyotypu u celého řádu sekáčů složený z $2n=30$ většinou dvojramenných chromozómů (Tsurusaki 2007). Tomu odpovídá i naše představa o původním karyotypu rodu *Cyphophthalmus*, který se v rámci jednotlivých skupin dále diferencoval podobným způsobem. Vycházíme z předpokladu předcházejících studií, které předpokládaly, že ohnisko diverzity Balkánských druhů rodu *Cyphophthalmus* se vyskytuje zhruba ve středu poloostrova. Dále se druhy postupně rozšiřovaly na sever až do Rakouska, a naopak do jižní části Řecka. Během evoluce se separovaly do dnes vymezených skupin a vytvářely izolované populace (Karaman 2009). Takové populace se následně různými selekčními tlaky vytvářely vlastní specifický karyotyp v podobě, jaké ho vidíme dnes.

Dinárská skupina je parafyletická a v rámci endogenních druhů patřících do této skupiny nacházíme jasný model postupného rozšíření této skupiny v rámci Balkánského poloostrova. Jedná se o skupinu kopírující reliéf Dinárských Alp (Obr. 22). Druh *C. cf. ere* ($2n=30$) s nejpůvodnějším karyotypem v rámci této skupiny, který se vyskytuje stále ve střední části Balkánského poloostrova, nemá žádný pár autozómů výrazně větší. V jeho



Obrázek 22: Distribuce diploidních počtů v rámci rodu *Cyphophthalmus* na Balkáně. Data použita z Tabulky 7.

karyotypu dominují submetacentrické a subtelocentrické páry autozómů. Dále na sever se diploidní počty snižují. Druh *C. martensi* ($2n=28$) má první pár autozómů větší než ostatní, jinak morfologie autozómů zhruba odpovídá druhu *C. cf. ere*. Tito dva druhy patří do linie společně s troglobiontní skupinou kolem druhu *C. minutus* (Obr. 20 a 21). Do druhé linie patří dva analyzované druhy, které se již vyskytují v severní části Balkánu. Oba druhy mají nejnižší dosud zjištěný počet chromozómů u paroztočů $2n=24$. *C. rumijae* s výskytem v Černé Hoře a druh *C. duricorius* s největším rozšířením na Balkáně. V jeho karyotypu se vyskytují tři výrazně zvětšené páry autozómů a nacházíme zde méně subtelocentrických párů autozómů, a naopak více metacentrických. U tohoto druhu také došlo ke zmnožení počtu NORů na 2 páry (Tab. 6).

Egejská skupina se zdá být nejspíše původní a dochází v ní k mezidruhové a vnitrodruhové variabilitě karyotypu. Diploidní počty v rámci této skupiny se pohybují mezi 26 a 28 (Tab 6). Jejich rozšíření je stále blízko střední části Balkánského poloostrova (Obr. 22). Někteří jedinci se rozšířili až na západní ostrov Korfu, kde diverzifikovali na více skupin. To dokládá přítomnost dvou sympatrických cytotypů druhu *C. corfuanus* (cytotyp 1 $2n=28$, cytotyp 2 $2n=26$). Tyto dva cytotypy se liší morfologií chromozómů v počtu metacentrických párů autozómů, které převládají u cytotypu 1. U druhého dominují naopak submetacentrické chromozómy. Oba tyto druhy jsou bez přítomnosti jednoramenných chromozómů. Bohužel se u prvního cytotypu nepodařilo získat sekvence použitelné pro rekonstrukci fylogenetických vztahů. Dále, ve stejné oblasti jako cytotyp

2, se na Balkánském poloostrově vyskytuje druh *C. cf eratoae* ($2n=26$) mající již ve svém karyotypu jednoramenné chromozómy. Ty má i další druh této skupiny *C. cf serbicus* ($2n=28$), který vytváří v rámci fylogenetických vztahů vlastní skupinu bez bližší příbuznosti k druhu *C. serbicus*. Vyskytuje se ve střední části Balkánského poloostrova a ve svém karyotypu má dominanci metacentrických chromozómů. Posledním karyotypově studovaným druhem této skupiny je *C. zetae*, u kterého byla zjištěna přítomnost největšího počtu (2 páry) NORů v rámci celé Egejské skupiny.

Analyzované druhy patřící do skupiny Volos jsou v rámci karyotypu také velice diverzifikovaní. Diploidní počty se pohybují v rozmezí 24 a 30 (Tab. 6, Obr. 22). Vnitřní topologii této skupiny se bohužel nepodařilo blíže rozřešit. Nicméně je zde patrná mezidruhová variabilita. Druhy *C. sp. 1* a *C. sp. 2* (oba $2n=28$) mají velice podobný karyotyp, který se liší pouze v počtu NORů. Kdy první druh má původní jeden pár a druhý dva páry. Tyto druhy se vyskytují blízko střední části Balkánského poloostrova. Tato skupina se rozšířila až na Peloponés, kde následně výrazně diverzifikovala. Předpokládá se u ní výrazná kryptická diverzita (Karaman ústní sdělení), což naznačují i molekulární a cytogenetické analýzy v této práci. Druh vyskytující se právě na Peloponésu *C. sp. 3* má nejnižší počet chromozómů $2n=24$ z celé skupiny. Nemá ve svém karyotypu žádný jednoramenný chromozóm a první pár autozómů má oproti zbylým výrazně větší. Extrémní zvětšení pozorujeme u toho druhu také u pohlavního chromozómu X. Ve stejné oblasti máme záznamy o dvou druzích s odlišnými karyotypy v rámci jedné lokality (Tab. 7). Jedná se o již zmiňovaný druh *C. sp. 3* a poslední analyzovaný druh *C. sp. 4*, jehož diploidní počet je 30.

V rámci Gjorgjevici skupiny se nepodařilo získat žádná karyologická data. Z předešlých prací se předpokládá, že se jedná o bazální skupinu rodu *Cyphophthalmus*. Jejich výskyt je nejspíše původní, a to ve střední části Balkánského poloostrova (Obr. 23).

Druh	2n	Morf. gon.		Morf. autoz.				Chi.	NOR			Stát
		X	Y	M	SM	ST	A		Poč	Ch.p	Morf	
Dinárská skupina												
<i>C. duricorius</i>	24	M	M	2	4	3	2	1	4	7., 9.	SM, A	AUT, HR, SVN
<i>C. cf. ere</i>	30	SM	SM	1	6	5	2	1	2	4.	SM	AL
<i>C. martensi</i>	28	SM	M	0	6	5	2	1	2	7.	ST	HR
<i>C. rumijae</i>	24	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	MNE
Egejská skupina												
<i>C. corfuanus</i> c. 1	28	ST	M	7	3	3	0	3	-	-	-	GR
<i>C. corfuanus</i> c. 2	26	ST	M	1	6	5	0	2	2	5.	SM	GR
<i>C. cf. eratoae</i>	26	M	SM	4	2	4	2	3	2	-	-	GR
<i>C. cf. serbicus</i>	28	SM	M	6	2	2	3	2	-	-	-	SRB
<i>C. zetae</i>	26	-	-	-	-	-	-	1	4	-	-	MNE
Volos kupina												
<i>C. sp. 1</i>	28	M	SM	1	6	4	2	-	2	-	-	GR
<i>C. sp. 2</i>	28	SM	M	4	5	2	2	1	4	5., 7.	M, SM	GR
<i>C. sp. 3</i>	24	SM	M	3	7	1	0	4	-	-	-	GR
<i>C. sp. 4</i>	30	-	-	-	-	-	-	1	2	-	-	GR

Tabulka 6: Přehled cytogenetických výsledků analyzovaných druhů rodu *Cyphophthalmus*: Morf. gon. – morfologie gonozómů; Morf. autoz. – morfologie autozómů; M – metacentrický chromozóm; SM – submetacentrický chromozóm; ST – subtelocentrický chromozóm; A – akrocentrický chromozóm; X – pohlavní chromozóm X; Y – pohlavní chromozóm Y; Chi – počet bivalentů s dvěma chiasmaty během diakineze; NOR – nukleolární organizátor jáderka; Poč – počet NORů; Ch.p. – chromozómový pár nesoucí NOR; Morf – morfologie chromozómového páru nesoucí NOR

Z výše uvedených informací lze vyčíst hned několik faktů ohledně karyotypové evoluce sekáčů rodu *Cyphophthalmus* na Balkáně. Pokud došlo v rámci nějakého druhu ke snížení diploidního počtu, šlo nejspíše vždy o stejné procesy. To dokazuje přítomnost výrazně větších autozomálních párů v karyotypech druhů s nižším diploidním počtem. Dále lze předpokládat, že i přes velice brzké oddělení jednotlivých skupin nacházíme výrazné podobnosti v rámci morfologie chromozómů u všech analyzovaných druhů. I přestože změny v karyotypech evidentně vznikaly v jednotlivých skupinách nezávisle. Tudiž nejspíše podléhaly stejným selekčním tlakům. Bez ohledu na konkrétní mechanismy vzniku jednotlivých karyotypů rodu *Cyphophthalmus* v minulosti jednoznačně docházelo k redukci počtu chromozómů. Tento jev byl u podřádu *Cyphophthalmi* dosud pozorován právě pouze v rámci čeledi Sironidae, konkrétně u druhu *Paramiopsalis ramulosus* a již zmiňovanému *C. duricorius* (Svojanovská et al. 2016). Naopak u jiného druhu čeledi Sironidae docházelo k výraznému zvyšování počtu chromozómů pomocí štěpení, a to u druhu *Siro carpaticus* (2n=52). Většinou se u modelů snižování počtu chromozómů předpokládá, že k němu dochází pomocí centrických fúzí a/nebo pericentrických inverzí, jako tomu bylo například u štírků rodu *Chthonius* L. Koch, 1843 (Šťáhlavský a Král 2004). Také

Svojanovská et al. (2016) ve své studii u druhu *C. duricornis* předpokládá, že ke snížení počtu chromozómů došlo pomocí chromozomálních fúzí. U většiny studovaných druhů se v karyotypu vyskytují jednoramenné chromozómy. Tudíž se lze domnívat, že při redukci počtu chromozómů mohla figurovat také tandemová fúze. Jelikož obvykle po tandemové fúzi následuje tzv. centromerický posun (Tsurusaki 2007). Tandemová fúze během snižování počtu chromozómů se předpokládá i u jiných sekáčů vykazující variabilitu v diploidním počtu. Například u japonského sekáče druhu *Gagrellopsis nodulifera* Gorlov a Tsurusaki, 2000 ($2n=18-22$) (Tsurusaki 2007). Evoluce karyotypu, kde dochází ke snižování diploidního počtu chromozómů, a naopak zvyšováním počtu metacentrických chromozómů byla navržena u více skupin pavoukoců. Jsou jimi např. štírci rodu *Roncus* L. Koch, 1873 a *Chthonius* (Zaragoza a Šťáhlavský 2008, Šťáhlavský a Král 2004), řád Amblypygi (Sember 2010). Snižování počtu chromozómů je také předpokládáno v evoluci karyotypu některých skupin pavouků (Král et al. 2013).

Pohlavní chromozómy XY jsou přítomny u všech analyzovaných druhů a mají velice podobnou morfologii. Je proto velice pravděpodobné, že se u rodu *Cyphophthalmus* pohlavní chromozómy vyskytovaly již původně před začátkem jeho diverzifikace na Balkánském poloostrově.

6 Závěr

Sekáči rodu *Cyphophthalmus* na Balkánském poloostrově vykazují variabilní karyotypové charakteristiky oproti původnímu předpokladu o konzervativním diploidním počtu v rámci celého podřádu. Diploidní počty se pohybují v rozmezí od 24 do 30. I přes izolovanost jednotlivých skupin a jejich časnou diverzifikaci docházelo nejspíše u všech studovaných druhů při snižování počtu chromozómů vždy ke stejným procesům. To dokládá mimo jiné častá přítomnost výrazně většího páru autozómů v karyotypech paroztočů s nižšími počty chromozómů v rámci všech rozlišovaných skupin tohoto rodu. Jednalo se nejspíše o tandemové fúze či centrickou fúzí a/nebo pericentrické inverze. Pomocí metody FISH s nepřímo značenou sondou pro 18S rDNA byla odhalena variabilita v počtu a pozici NORů. Poprvé v rámci podřádu Cyphophthalmi byla zjištěna přítomnost morfologicky diferenciovaných pohlavní chromozómů XY. Druhy, řazené do jednotlivých skupin: Dinárské, Egejské, Gjorgjevici a Volos, vykazovaly odlišné karyotypy často i s odlišným diploidním počtem. Tyto skupiny mají své specifické rozšíření. Nicméně jednotlivé karyotypové rasy se ne vždy od sebe geograficky liší, ale i přes to se většinou vyskytují v oblastech pro určitou rasu typických. Centrem diverzity celého rodu je střed Balkánského poloostrova. Odtud se postupně začaly druhy diverzifikovat do jednotlivých skupin, jejich karyotypy podléhaly selekčním tlakům a utvořily se do dnešní podoby. Propojení karyologických a fylogenetických analýz pomohlo nastínit karyotypovou evoluci rodu *Cyphophthalmus* na Balkáně. Ukazuje se, že kryptická diverzita a výskyt izolovaných populací je mnohem vyšší, než se původně předpokládalo. Pro lepší pochopení této diverzity a ucelenější pohled do problematiky je potřeba podrobnější revize a získání většího počtu materiálu. To by také mohlo přispět fylogenetické analýze, u které je potřeba doplnit více dat a tím zvýšit podpory jednotlivých linií.

7 Literatura

- Adilardi RS, Ojanguren Affilastro AA, Martí DA, Mola LM 2014: Cytogenetic analysis on geographically distant parthenogenetic populations of *Tityus trivittatus* Kraepelin, 1898 (Scorpiones, Buthidae): karyotype, constitutive heterochromatin and rDNA localization. *Comparative Cytogenetics*. 8: 81–92.
- Adilardi RS, Ojanguren Affilastro AA, Mattoni CI, Mola LM 2015: Male and female meiosis in the mountain scorpion *Zabius fuscus* (Scorpiones, Buthidae): heterochromatin, rDNA and TTAGG telomeric repeats. *Genetica*. 143: 393–401.
- Ager DV 1980: The Geology of Europe. London, New York: McGraw-Hill, 535.
- Almeida BRR, Milhomem-Paixao SSR, Noronha RCR, Nagamachi CY, da Costa MJR, Pardal PPP, Coelho JS, Pieczarka C 2017: Karyotype diversity and chromosomal organization of repetitive DNA in *Tityus Obscurus* (Scorpiones, Buthidae). *BMC Genetics*. 18 (1): 35.
- Bezděčka P 2008: Seznam sekáčů (Opiliones) České republiky. *Klapalekiana*. 44: 109–120.
- Boyer S, Karaman I, Giribet G 2005: The genus *Cyphophthalmus* (Arachnida, Opiliones, Cyphophthalmi) in Europe: A phylogenetic approach to Balkan Peninsula biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 36: 554–567.
- Boye S, Baker JM, Giribet G 2007a: Deep genetic divergences in *Aoraki denticulata* (Arachnida, Opiliones, Cyphophthalmi): A widespread “mite harvestman” defies DNA taxonomy. *Molecular Ecology*. 16(23): 4999–5016.
- Boyer S, Clouse R, Benavides LR, Sharma P, Schwendinger PJ, Karunarathna I, Giribet G 2007b: Biogeography of the world: a case study from cyphophthalmid Opiliones, a globally distributed group of arachnids. *Journal of Biogeography of Biogeography*. 34(12): 2070–2085.
- Colgan DJ, McLauchlan A, Wilson GDF, Livingston SP, Edgecombe GD 1998: Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Australian Journal of Zoology*. 46: 419–437.
- Crivelli AJ, Maitland PS 1995: Special issue: Endemic freshwater fishes in the northern Mediterranean region? *Biological Conservation*. 72: 311–319.
- Delfosse E 2014: Addenda et corrigenda du catalogue préliminaire des Opilions de France métropolitaine de 2004 (Arachnida, Opiliones). *Le Bulletin d'Arthropoda*. 47: 5–26.

- Deltshev CH 2004: A Zoogeographical Review of the Spiders (Araneae) of the Balkan Peninsula. In: Griffiths HI, Kryštufek B, Reed JM (eds) *Balkan Biodiversity*. Springer, Dordrecht.
- Dolejš P, Kořínková T, Musilová J, Opatová V, Kubcová L 2011: Karyotypes of central European spiders of the genera *Arctosa*, *Tricca*, and *Xerolycosa* (Araneae: Lycosidae). *European Journal of Entomology*. 108: 1–16.
- Dreszer TB, Rada T, Giribet G 2015: *Cyphophthalmus soletiensis* sp. nov. (Cyphophthalmi, Sironidae), a new endogean mite harvestman species from Croatia, with an application of confocal laser microscopy to illustrate genitalia in Opiliones. *Museum of comparative zoology. Cambridge*. 543: 1–15.
- Dunlop JA, Anderson LI, Kerp H, Hass H 2004: A harvestman (Arachnida, Opiliones) from the Early Devonian Rhynie cherts, Aberdeenshire, Scotland. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh: Earth Sciences*. 94: 341–354.
- Durand R, Rascle C, Fevre M 1999: Expression of a catalytic domain of a *Neocallimastix frontalis* endoxylanase gene (*xyn3*) in *Kluyveromyces lactis* and *Penicillium roqueforti*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 52(2): 208–14.
- Eastwood WJ 2004: East Mediterranean Vegetation and Climate Change. In: Griffiths HI, Kryštufek B, Reed JM (eds) *Balkan Biodiversity*. Springer, Dordrecht.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R 1994: DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. 3: 294–299.
- Forman M, Nguyen P, Hula V, Král J 2013: Sex chromosome pairing and extensive NOR polymorphism in *Wadicosa fidelis* (Araneae: Lycosidae). *Cytogenetics and Genome Research*. 141: 43–49.
- Giribet G, Rambla M, Carranza S, Banguna J, Riutort M 1999: Phylogeny of the arachnid order Opiliones (Arthropoda) inferred from a combined approach of complete 18S and partial 28S ribosomal DNA sequences and morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 11: 296–307.
- Giribet G 2000: Catalogue of the Cyphophthalmi of the World (Arachnida, Opiliones). *Revista Ibérica de Aracnologia*. 2: 49–76.
- Giribet G., Boyer S 2002: A cladistic analysis of the Cyphophthalmid genera (Opiliones, Cyphophthalmi). *Journal of Arachnology*. 30: 110–128.

Giribet G., Kury AB 2007: Phylogeny and Biogeography. In: *Pinto-da-Rocha, R., Machado, G., Giribet, G. (Eds.), Harvestmen: The Biology of Opiliones. Harvard University Press, Cambridge, MA.* pp. 62–87.

Giribet G, Shear WA 2010: The genus *Siro* Latreille, 1796 (Opiliones, Cyphophthalmi, Sironidae), in North America with a phylogenetic analysis based on molecular data and the description of four new species. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology.* 160(1): 1–33.

Giribet G, Vogt L, Pe A, Kury AB, González AP, Sharma P 2010: A multilocus approach to harvestman (Arachnida: Opiliones) phylogeny with emphasis on biogeography and the systematics of Laniatores. *Cladistics.* 26: 408–437.

Giribet G, Sharma PP, Benavides LR, Boyer SL, Clouse RM, Bivort BLDE, Dimitrov D, Kawauchi GY, Murienne J, Schwendinger PJ 2012: Evolutionary and biogeographical history of an ancient and global group of arachnids (Arachnida: Opiliones: Cyphophthalmi) with a new taxonomic arrangement. *Biological Journal of the Linnean Society.* 105: 92–130.

Giribet G, Boyer, SL, Baker CM, Fernández R, Sharma PP, de Bivort BL, Griswold C E 2016: A molecular phylogeny of the temperate Gondwanan family Pettalidae (Arachnida, Opiliones, Cyphophthalmi) and the limits of taxonomic sampling. *Zoological Journal of the Linnean Society.* 178(3): 523–545.

Gorlov IP, Tsurusaki N 2000: Morphology and Meiotic/Mitotic Behavior of B Chromosomes in a Japanese Harvestman, *Metagagrella tenuipes* (Arachnida: Opiliones): No Evidence for B Accumulation Mechanisms. *Zoological Science.* 17(3): 349–355.

Griffiths HI, Krystufek B, Reed JM 2004: Balkan biodiversity. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.*

Hansen HJ, Sørensen W 1904: On two orders of Arachnida Opiliones, especially the suborder Cyphophthalmi, and Ricinulei, namely the family Cryptostemmatoidae. *Cambridge Univ. Press, Cambridge.* 1–174.

Hedin MC, Maddison WP 2001: A combined molecular approach to phylogeny of the jumping spider family Dendryphantinae (Araneae: Salticidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution.* 18: 386–403.

Hedin M, Starrett J, Akhter S, Schönhofer AL, Shultz JW 2012: Phylogenomic resolution of paleozoic divergences in harvestmen (Arachnida, Opiliones) via analysis of next-generation transcriptome data. *PloS one.* 7: e42888.

- Hewitt GD 1999: Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*. 68: 87-112.
- Chemini C 1995: 21, Arachnida. Scorpiones, Palpigradi, Solifugae, Opiliones. In: Minelli, A. Ruffo, S. & La Posta, S. (Eds.) Checklist delle specie della fauna italiana. Calderini, Bologna: 1–42.
- Juberthie C 1956: Nombres chromosomiques chez les Sironidae. Troglulidae. Ischyropsalidae. Phalangiiidae (Opiliones). *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*. 242: 2860-2862.
- Karaman IM 2009: The taxonomical status and diversity of balkan sironids (Opiliones, Cyphophthalmi) with descriptions of twelve new species. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 156: 260–318.
- Král J, Musilová J, Šťáhlavský F, Řezáč M, Zübeyde A 2006: Evolution of the karyotype and sex chromosome systems in basal clades of araneomorphspiders (Araneae: Araneomorphae). *Chromosome Research*. 14: 859–880.
- Král J, Kováč L, Šťáhlavský F, Lonský P, Luptáček P 2008: The first karyotype study in palpigrades, a primitive order of arachnids (Arachnida: Palpigradi). *Genetica*. 134: 79–87.
- Král J, Kořínková T, Forman M, Krkavcová L 2011: Insights into the meiotic behavior and evolution of multiple sex chromosome systems in spiders. *Cytogenetics and Genome Research*. 133: 43–66.
- Král J, Kořínková T, Krkavcová L, Musilová J, Forman M 2013: Evolution of karyotype, sex chromosomes, and meiosis in mygalomorph spiders (Araneae: Mygalomorphae). *Biological Journal of the Linnean Society*. 109: 377–408.
- Kury AB 2017: Classification of Opiliones. [Accessed 1 Jul 2017] Available from: <http://www.museunacional.ufrj.br/mndi/Aracnologia/opiliones.html>.
- Lanfear R, Calcott B, Ho SYW, Guindon S 2012: PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*. 29: 1695–1701.
- Mattos VF, Cella DM, Carvalho LS, Candido DM, Schneider MC 2013: High chromosome variability and the presence of multivalent associations in buthid scorpions. *Chromosome Research*. 21: 121–136.

- Mattos VF, Carvalho LS, Cella DM, Schneider MC 2014: Location of 45S ribosomal genes in mitotic and meiotic chromosomes of buthid scorpions. *Zoological Science*. 31: 603–607.
- Murienne J, Giribet G. 2009: The Iberian Peninsula: ancient history of a hot spot of mite harvestmen (Arachnida: Opiliones: Cyphophthalmi: Sironidae) diversity. *Zoological Journal of the Linnean Society*. 156(4): 785–800.
- 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: 90–102.
- Novak T, Giribet G 2006: A new species of Cyphophthalmi (Arachnida, Opiliones, Sironidae) from Eastern Slovenia. *Zootaxa*. 1330: 27-42.
- Oliveira RM, Zacaro AA, Gnaspini P, Cella DM 2006: Cytogenetics of three Brazilian *Goniosoma* species: A new record for diploid number in Laniatores (Opiliones, Gonyleptidae, Goniosomatinae). *Journal of Arachnology*. 34: 435-443.
- Oliverio M, Bologna AM, Mariottini P 2000: Molecular biogeography of the Mediterranean lizards *Podarcis* Wagler, 1830 and *Teira* Gray, 1838 (Reptilia, Lacertidae). *Journal of Biogeography*. 27: 1403–1420.
- Paula-Neto E, Araujo D, Carvalho LS, Cella DM, Schneider MC 2013: Chromosomal characteristics of a Brazilian whip spider (Amblypygi) and evolutionary relationships with other arachnid orders. *Genetics and Molecular Research*. 12: 3726–3734.
- Quézel P 1985: Definition of the Mediterranean region and the origin of its flora. In C. Gomez-Campo, ed. *Plant conservation in the Mediterranean area*. *Geobotany*. 7, p. 9-24.
- Rambaut A 2012: FigTree v 1.4.0. Available in: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Robertson AHF, Dixon JE 1984: Introduction: aspects of geological evolution of the Eastern Mediterranean. In: Dixon, J.E. and Robertson, A.H.F. (eds), *The Geological Evolution of the Eastern Mediterranean*. *Geological Society, London, Special Publications*. 17: 1-74.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP 2003: MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 19: 1572–1574.
- Řezáč M, Gasparo F, Král J, Heneberg P 2014: Integrative taxonomy and evolutionary history of a newly revealed spider *Dysdera ninnii* complex (Araneae: Dysderidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*. 172 (2): 451-474.

- Sadílek D, Nguyen P, Koç H, Kovařík F, Yağmur EA 2015: Molecular cytogenetics of *Androctonus* scorpions: an oasis of calm in the turbulent karyotype evolution of the diverse family Buthidae. *Biological Journal of the Linnean Society*. 115: 69–76.
- Sahara K, Marec F, Traut W 1999: TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Research*. 7: 449–460.
- Sakamoto Y, Zacaro AA 2009: LEVAN, an ImageJ plugin for morphological cytogenetic analysis of mitotic and meiotic chromosomes. Initial version. Available in <http://rsbweb.nih.gov/ij/>
- Sember A. 2010: Analýza karyotypu u vybraných bičovců řádů Amblypygi a Uropygi. Diplomová práce, katedra genetiky a mikrobiologie PřF UK, pp. 126.
- Sharma PP, Giribet G 2011: The evolutionary and biogeographic history of the armoured harvestmen – Laniatores phylogeny based on ten molecular markers, with the description of two new families of Opiliones (Arachnida). *CSIRO Publishing*. 25: 106–142.
- Shear WA 1980: A Review of the Cyphophthalmi of the United States and Mexico, with a Proposed Reclassification of the Suborder (Arachnida, Opiliones). *American Museum Novitates*. 2705: 1–34.
- Shanahan CM 1989: Cytogenetics of Australian scorpions 2: chromosome polymorphism in species of *Urodacus* (family Scorpionidae). *Genome*. 32: 890–900.
- Schneider MC, Zacaro AA, Oliveira RM, Gnaspini P, Cella DM 2008: Conventional and ultrastructural analyses of the chromosomes of *Discocyrtus pectinifemur* (Opiliones, Laniatores, Gonyleptidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*. 47: 203–207.
- Schneider MC, Zacaro AA, Pinto-da-Rocha R, Candido DM, Cella DM 2009: A comparative cytogenetic analysis of 2 Bothriuridae species and overview of the chromosome data of scorpiones. *The Journal of Heredity*. 100: 545–555.
- Schneider MC, Cella DM 2010: Karyotype conservation in 2 populations of the parthenogenetic scorpion *Tityus serrulatus* (Buthidae): rDNA and its associated heterochromatin are concentrated on only one chromosome. *Journal of Heredity*. 101: 491–496.
- Silvestro D, Michalak I 2012: raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms Diversity and Evolution*. 12: 335–337.

- Sokolow I 1930: Untersuchungen über die spermatogenese bei den arachniden. Iv. Über die spermatogenese der Phalangiden (Opiliones). *Zeitschrift für zellforschung und mikroskopische anatomie*. 10: 164-194.
- Suzuki S 1954: Cytological studies in spiders III. Studies on the chromosomes of fifty-seven species of spiders belonging to seventeen families with general considerations on chromosomal evolution. *Journal of Science of Hiroshima University*. 15: 23–136.
- Svojanovská H, Nguyen P, Hiřman M, Tuf IH, Wahab RA, Haddad CR, Šťáhlavský F 2016: Karyotype Evolution in Harvestmen of the Suborder Cyphophthalmi (Opiliones). *Cytogenetic and Genome Research*. 148(2–3): 227–236.
- Šťáhlavský F, Král J 2004: Karyotype analysis and achiasmatic meiosis in pseudoscorpions of the family Chthoniidae (Arachnida: Pseudoscorpiones). *Hereditas*. 140: 49–60.
- Šťáhlavský F, Král J, Harvey MS, Haddad CR 2006: A karyotype study on the pseudoscorpion families Geogarypidae, Garypinidae and Olpiidae (Arachnida: Pseudoscorpiones). *European Journal of Entomology*. 103: 277–289.
- Šťáhlavský F, Boyer SL, Harvey MS, Giribet G 2012a: First cytogenetic study of a member of the harvestman family Pettalidae (Opiliones: Cyphophthalmi). *Australian Journal of Entomology*. 51(4): 299–302.
- Šťáhlavský F, Král J, Harvey MS, Haddad CR 2012b: The first cytogenetic characterisation of atemnids: pseudoscorpions with the highest chromosome numbers (Arachnida: Pseudoscorpiones). *Cytogenetic and Genome Research*. 137: 22-30.
- Taberlet P, Bouvet J 1994: Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 255: 195-200.
- Traut W 1976: Pachytene mapping in the female silkworm, *Bombix mori* L. (Lepidoptera). *Chromosoma*. 58: 275–284.
- Tsurusaki N 1985: Geographic variation of chromosomes and external morphology in the montanum-subgroup of the *Leiobunum curvipalpe*-group (Arachnida, Opiliones, Phalangiidae) with special reference to its presumable process of raiation. *Zoological Science*. 2: 767-783.
- Tsurusaki N 1989: Geographic variation of chromosomes in *Sabacon makinoi* Suzuki (Arachnida, Opiliones, Sabaconidae). *Bulletin of the Biogeographical Society of Japan*. 44: 111-116.

Tsurusaki N, Cokendolpher J 1990: Chromosomes of sixteen species of harvestmen (Arachnida, Opiliones, Caddidae and Phalangididae). *The Journal of Arachnology*. 18: 151–166.

Tsurusaki N, Murakami M, Shimokawa K 1991: Geographic Variation of Chromosomes in the Japanese Harvestman, *Gagrellopsis nodulifera*, with Special Reference to a Hybrid Zone in Western Honshu. *Zoological Science*. 8: 265–275.

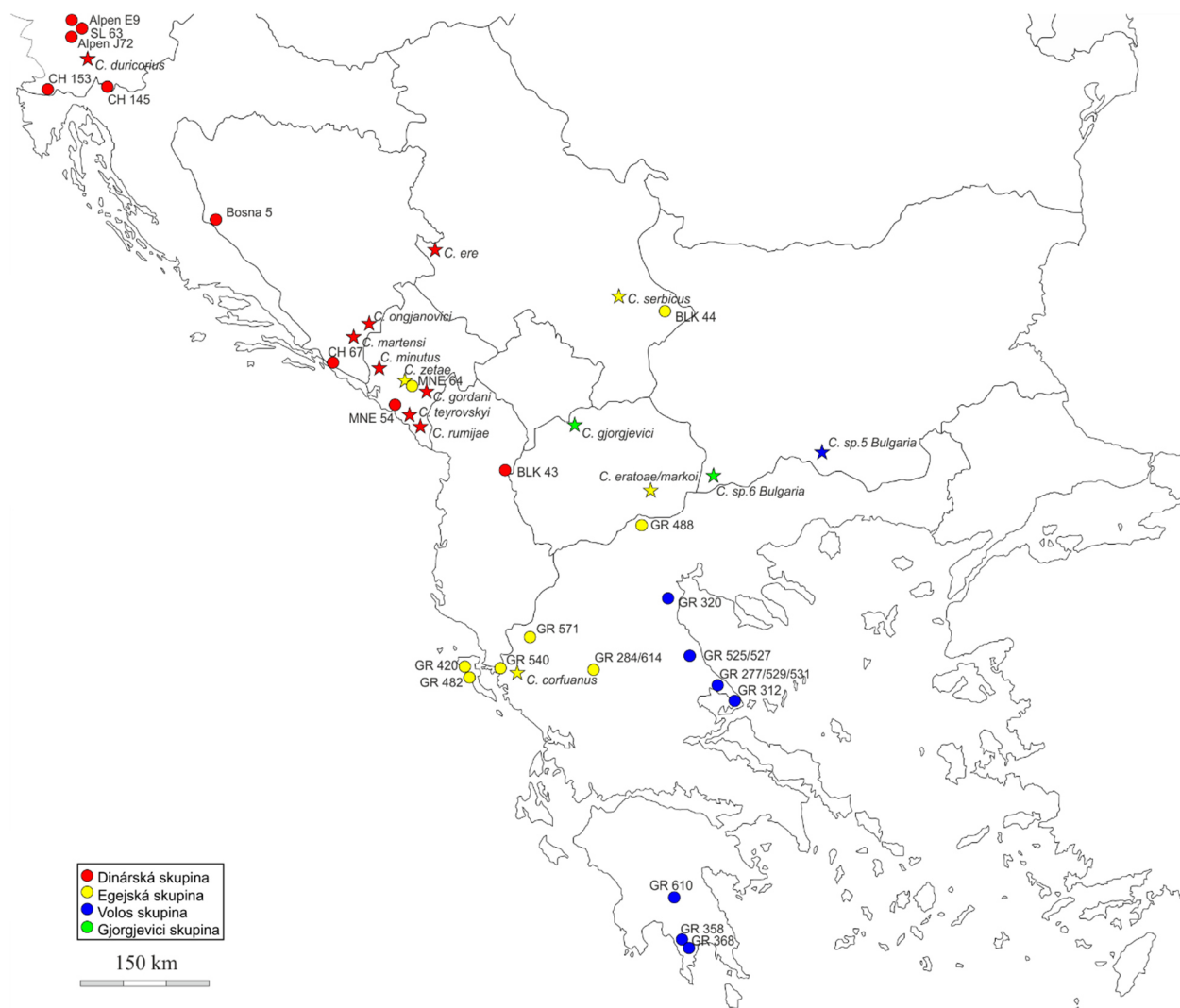
Tsurusaki N 2007: Harvestmen: The Biology of Opiliones. *Cytogenetics*. Chapter 6: 266-279.

Tsurusaki N, Svojanovská H, Schöenhofer A, Štáhlavský F 2017: The harvestmen cytogenetic database. Available in <http://www.arthropodacytogenetics.bio.br/index.html>

Zaragoza JA, Štáhlavský F 2008: A new *Roncus* species (Pseudoscorpiones: Neobisiidae) from Montseny Natural Park (Catalonia, Spain), with remarks on bryology. *Zootaxa*. 1693: 27–40.

Zohary M 1973: Geobotanical Foundations of the Middle East. Vol. 2, *Gustav Fisher Verlag, Stuttgart*.

8 Přílohy



Obrázek 23: Distribuce jedinců využitých při fylogenetické analýze. Kolečka označují jedince vlastního sběru; hvězdičky označují jedince z GenBank. Determinace druhů a názvy lokalit viz Tabulka 7.

Tabulka 7: Shrnutí použitých vzorků v analýze: 2n – zjištěné diploidní počty; NOR – použitá metoda FISH; COI – použitá sekvence pro gen COI; 28S – použitá sekvence pro gen 28S; H3 – použitá sekvence pro gen histon H3; * – použitá data z GenBank; (1) – Boyer et al. 2005; (2) – Boyer et al. 2007; (3) – Muriene et al. 2010.

Druh	Kód	Stát	Lokalita	GPS	2n	NOR	COI	28S	H3
Dinárská linie									
<i>C. duricorius</i>	ALPEN D 17	Rakousko	Tscheppachslucht	46.5038, 14.2844	24				
<i>C. duricorius</i>	ALPEN E 9	Rakousko	Trögern	46.4536, 14.4906	24		COI	28S	H3
<i>C. duricorius</i>	ALPEN J 103	Slovinsko	Srpenica	46.2955, 13.4931	24	18S			
<i>C. duricorius</i>	ALPEN J 104	Slovinsko	Srpenica	46.2955, 13.4931	24	18S			
<i>C. duricorius</i>	ALPEN J 72	Slovinsko	Kamniška Bistrica	46.2957, 14.6140	24		COI	28S	H3
<i>C. duricorius</i>	ALPEN J 73	Slovinsko	Kamniška Bistrica	46.2957, 14.6140	24	18S			
<i>C. duricorius</i>	ALPEN K 33	Slovinsko	Šniklavž	46.2708, 14.7687	24	18S			
<i>C. duricorius</i>	BOSNA 5	Bosna	Podovi	44.4788, 16.4028	24		COI	28S	H3
<i>C. duricorius</i>	BOSNA 6	Bosna	Podovi	44.4788, 16.4028	24				
<i>C. duricorius</i>	CH 135	Slovinsko	Nomenj	46.2826, 14.0421	24				
<i>C. duricorius</i>	CH 137	Slovinsko	Nomenj	46.2826, 14.0421	24				
<i>C. duricorius</i>	CH 156	Slovinsko	Nomenj	46.2826, 14.0421	24				
<i>C. duricorius</i>	CH 138	Slovinsko	Dolenja ves	46.2069, 14.2239	24				
<i>C. duricorius</i>	CH 158	Slovinsko	Dolenja ves	46.2069, 14.2239	24				
<i>C. duricorius</i>	CH 141	Slovinsko	Pirniče	46.1331, 14.4471	24				
<i>C. duricorius</i>	CH 142	Slovinsko	Gradež	45.8798, 14.6165	24				
<i>C. duricorius</i>	CH 145	Slovinsko	Dolga vas	45.6188, 14.8712	24		COI	28S	H3
<i>C. duricorius</i>	CH 167	Slovinsko	Dolga vas	45.6188, 14.8712	24				
<i>C. duricorius</i>	CH 150	Slovinsko	Senožeče	45.7219, 14.0510	24				
<i>C. duricorius</i>	CH 151	Slovinsko	Senožeče	45.7219, 14.0510	24				
<i>C. duricorius</i>	CH 153	Slovinsko	Veliki Otok	45.7952, 14.1983	24		COI	28S	
<i>C. duricorius</i>	CH 154	Slovinsko	Štefanja gora	46.2856, 14.4894	24				
<i>C. duricorius</i>	CH 171	Chorvatsko	Malik	45.3459, 15.2198	24				
<i>C. duricorius</i>	CH 59	Chorvatsko	Plitvička jezera	44.8681, 15.5685	24				
<i>C. duricorius</i>	CH 60	Chorvatsko	Mrzla Vodica	45.3698, 14.6621	24				
<i>C. duricorius</i>	CH 62	Chorvatsko	Mrzla Vodica	45.3698, 14.6621	24				
<i>C. duricorius</i>	CH 98	Chorvatsko	Zavižan	44.8274, 15.0275	24				
<i>C. duricorius</i>	SL 63	Slovinsko	Logarská dolina	46.3877, 14.6231	24		COI	28S	H3
<i>C. duricorius</i>	SL 65	Slovinsko	Logarská dolina	46.3877, 14.6231	24				
<i>C. duricorius</i>	SL 67	Slovinsko	Veliki Otok	45.7865, 14.1956	24				
<i>C. duricorius</i>	SL 68	Slovinsko	Veliki Otok	45.7865, 14.1956	24				
<i>C. cf. ere</i>	BLK 43	Albánie	Peshkopi	41.6560, 20.4522	30	18S	COI		H3
<i>C. martensi</i>	CH 67	Chorvatsko	Zaton Doli	42.8265, 17.7620	28	18S	COI	28S	H3
<i>C. rumijae</i>	MNE 54	Černá Hora	Njeguši	42.4186, 18.7938	24	18S	COI	28S	H3
<i>C. duricorius</i> * ⁽¹⁾	DNA 100487	Slovinsko	Javor	46.0167, 14.6667			COI	28S	
<i>C. ere</i> * ⁽¹⁾	DNA 100499	Srbsko	Vitasi	43.8286, 19.5261			COI	28S	H3
<i>C. gordani</i> * ⁽¹⁾	DNA 100495	Černá Hora	Zagorič	42.4500, 19.2667					H3
<i>C. martensi</i> * ⁽¹⁾	DNA 101041	Bosna	Prisoje	43.0322, 18.2697			COI	28S	H3
<i>C. minutus</i> * ⁽¹⁾	DNA 100493	Černá Hora	Grahovo	42.6497, 18.6835			COI		H3
<i>C. ongjanovici</i> * ⁽¹⁾	DNA 101039	Bosna	Korita	43.0167, 18.5167				28S	H3
<i>C. rumijae</i> * ⁽¹⁾	DNA 100492	Černá Hora	Zupci	42.1531, 19.1131			COI	28S	H3
<i>C. teyrovskyi</i> * ⁽¹⁾	DNA 100910	Černá Hora	Virpazar	42.2333, 19.0667				28S	H3

Egejská linie									
<i>C. cf. eratoae</i>	GR 281	Řecko	Meteora	39.7216, 21.6305	26	18S			
<i>C. cf. eratoae</i>	GR 284	Řecko	Meteora	39.7216, 21.6305	26		COI		
<i>C. cf. eratoae</i>	GR 614	Řecko	Meteora	39.7216, 21.6305			COI		H3
<i>C. corfuanus</i> cytotyp 1	GR 480	Řecko	Liapades	39.6731, 19.7294	28				
<i>C. corfuanus</i> cytotyp 2	GR 482	Řecko	Liapades	39.6731, 19.7294	26		COI	28S	H3
<i>C. corfuanus</i> cytotyp 2	GR 420	Řecko	Prinilas	39.7025, 19.6942	26		COI		H3
<i>C. corfuanus</i> cytotyp 2	GR 476	Řecko	Prinilas	39.7025, 19.6942	26				
<i>C. corfuanus</i> cytotyp 2	GR 540	Řecko	Kotsika	39.6579, 20.2452	26	18S	COI	28S	H3
<i>C. corfuanus</i> cytotyp 2	GR 571	Řecko	Vikos	39.9155, 20.7481	26		COI	28S	H3
<i>C. corfuanus</i> cytotyp 2	GR 274	Řecko	Vikos	39.9155, 20.7480	26				
<i>C. serbicus</i>	BLK 44	Srbsko	Rsovci	43.1754, 22.7460			COI	28S	H3
<i>C. cf. serbicus</i>	GR 488	Řecko	Periklia	41.1019, 22.1944	28		COI	28S	H3
<i>C. zetae</i>	MNE 64	Černá Hora	Tvorilo	42.5890, 19.0627	26	18S	COI	28S	H3
<i>C. corfuanus</i> * ⁽³⁾	DNA 102111	Řecko	Finiki	39.6106, 20.3394			COI	28S	
<i>C. eratoae</i> * ⁽²⁾	DNA 100497	Makedonie	Chelevec	41.4167, 22.2667				28S	
<i>C. markoi</i> * ⁽¹⁾	DNA 100497	Makedonie	Chelevec	41.4167, 22.2667			COI	28S	H3
<i>C. serbicus</i> * ⁽³⁾	DNA 102098	Srbsko	Čukljenik	43.2792, 22.0639			COI		
<i>C. zetae</i> * ⁽¹⁾	DNA 100908	Montenegro	Zagorak	42.6264, 19.0241			COI	28S	H3
Volos linie									
<i>C. sp. 1</i>	GR 368	Řecko	Gorani	36.9293, 22.4136	28	18S	COI	28S	H3
<i>C. sp. 1</i>	GR 277	Řecko	Chania	39.3961, 23.0629	28		COI		
<i>C. sp. 1</i>	GR 529	Řecko	Chania	39.3961, 23.0629	28		COI		
<i>C. sp. 1</i>	GR 531	Řecko	Chania	39.3961, 23.0629			COI		
<i>C. sp. 2</i>	GR 312	Řecko	Argalasti	39.2309, 23.2245			COI		
<i>C. sp. 2</i>	GR 313	Řecko	Platamonas	39.9615, 22.6227	28	18S			
<i>C. sp. 2</i>	GR 314	Řecko	Platamonas	39.9615, 22.6227	28				
<i>C. sp. 2</i>	GR 317	Řecko	Tsaganára	40.2771, 22.5394	28	18S			
<i>C. sp. 2</i>	GR 320	Řecko	Tsaganára	40.2771, 22.5394	28		COI	28S	
<i>C. sp. 2</i>	GR 525	Řecko	Sklithro	39.6152, 22.8809			COI	28S	
<i>C. sp. 2</i>	GR 527	Řecko	Sklithro	39.6152, 22.8809			COI	28S	
<i>C. sp. 3</i>	GR 360	Řecko	Xiokambi	36.9434, 22.4083	24				
<i>C. sp. 3</i>	GR 605	Řecko	Kerasia	37.3652, 22.3955	24				
<i>C. sp. 3</i>	GR 610	Řecko	Kerasia	37.3652, 22.3955	24		COI		
<i>C. sp. 4</i>	GR 358	Řecko	Xiokambi	36.9434, 22.4083	30	18S	COI		
<i>C. sp. 5 Bulgaria</i> * ⁽¹⁾	DNA 101343	Bulharsko	Smolyan	41.5833, 24.6833			COI		H3
Gjorgjevici linie									
<i>C. gjorgjevici</i> * ⁽¹⁾	DNA 100498	Makedonie	Dolna Matka	41.9483, 21.3008			COI	28S	H3
<i>C. sp. 6 Bulgaria</i> * ⁽¹⁾	DNA 101342	Bulharsko	Petrich	41.4000, 23.2167				28S	
Outgroup									
<i>Paramiopsalis ramulosus</i> * ⁽²⁾	DNA 100459	Španělsko	As Lombas	42.3150, -8.4867			COI		