

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Ekologická a evoluční biologie



Tadeáš Ryšan

Pohlavní chromozomy u zástupců podřádu Nematocera

Sex chromosomes of Nematocera

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Petr Volf, CSc.

Praha, 2022

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 dne 28. 4. 2022

Tadeáš Ryšan

.....

Poděkování

Rád bych poděkoval svému školiteli prof. RNDr. Petrovi Volfovi, CSc. za trpělivost a čas, který mi při psaní mé práce věnoval. Děkuji také doc. RNDr. Jiřímu Královi, CSc. za cenné rady a připomínky k mé práci a své partnerce Karolíně Dobešové za podporu.

Abstrakt

Parafyletická skupina Nematocera je značně diverzifikovaná jak do morfologie těla, tak i do životních strategií. Na základě morfologie pohlavních chromozomů (gonozomy) ji lze rozdělit do čtyř skupin definovaných již v polovině 20. století. Veškeré tyto systémy jsou založené na přítomnosti pohlavních chromozomů XY/XX, popřípadě na ztrátě chromozomu Y. Jednotlivé skupiny se rozlišují na základě toho, zda jsou chromozomy diferencované, jsou-li přítomná chiasmata a zda je zachován chromozom Y. Pozdější výzkumy však ukazují daleko vyšší diverzitu pohlavních chromozomů, a to převážně ve skupinách s homomorfními gonozomy. I přes skutečnost, že většina zástupců této skupiny nemá diferencované pohlavní chromozomy, nalezneme zde opakovaný vznik diferencovaných gonozomů a dokonce i pohlavních systémů $X_1X_2Y_1Y_2$, $X_1X_1X_2X_2$ a ZW/ZZ, které jsou pro dvoukřídle méně typické. Tato zjištění naznačují, že podoba pohlavních chromozomů u dvoukřídle nemusí být tak stabilní, jak se dříve myslelo. Nedávno objevená nehomologie gonozomů napříč skupinou dvoukřídle, včetně několika zástupců Nematocera, tuto myšlenku podporuje. Mnohonásobný nezávislý vznik gonozomů by mohl rovněž vysvětlit různorodost primárních faktorů určujících pohlaví u těchto skupin, kde jsou tyto faktory známé.

Klíčová slova: Nematocera, *Phlebotomus*, *Lutzomyia*, pohlavní chromozomy, určení pohlaví

Abstract

The paraphyletic group Nematocera is highly diversified in both body morphology and life strategies. Based on sex chromosome morphology, it can be divided into four groups defined as early as the mid-20th century. All these systems are based on the presence of the XY/XX sex chromosomes or the loss of the Y chromosome. The different groups are distinguished based on whether the chromosomes are differentiated, whether chiasmata are present and whether the Y chromosome is retained. However, later research has shown much higher sex chromosome diversity, mostly in groups with homomorphic gonosomes. Even though most representatives of this group do not have differentiated sex chromosomes, we find the recurrence of differentiated gonosomes and even the $X_1X_2Y_1Y_2$ / $X_1X_1X_2X_2$ and ZW/ZZ sex systems, which are less typical for Diptera. These findings suggest that the form of sex chromosomes in Diptera may not be as stable as previously thought. The recently discovered non-homology of gonosomes across the Diptera, including several representatives of Nematocera, supports this idea. Multiple independent gonosome formation could also explain the diversity of primary sex-determining factors in those groups where these factors are known.

Key words: Nematocera, *Phlebotomus*, *Lutzomyia*, sex chromosomes, sex determination

Seznam zkratek

Cm – Chromosome maintenance

Cma– Chromosome maintenance amorphic allele

CmD– Chromosome maintenance dimorphic allele

CmL– Chromosome maintenance hypomorphic allele

dsx – doublesex

fle – femaleless

fru – fruitless

GRC – germinal restricted chromosomes

Guy1 – Gene unique to the Y chromosome

MoY – Maleness-on-the-Y

Ppedsx – Phlebotomus perniciosus doublesex

Ppefru – Phlebotomus perniciosus fruitless

Ppetra – Phlebotomus perniciosus transformer

SNP – single nucleotide polymorphism

sxl– Sex lethal

tra– transformer

tra2 – transformer2

Obsah

1. Úvod	1
2. Základní charakteristika dvoukřídlých (Diptera)	1
3. Určení pohlaví dvoukřídlých	4
4. Pohlavní chromozomy dvoukřídlých.....	6
4.1. Tipulomorpha.....	9
4.2. Psychodidae	10
4.3. Culicidae	13
4.4. Chironomidae.....	15
4.5. Simuliidae.....	17
4.6. Ceratopogonidae	19
4.7. Bibionomorpha	20
5. Závěr a diskuse.....	23
Seznam literatury	25

1. Úvod

Dlouhorozí jsou důležitou skupinou dvoukřídlých hlavně proto, že někteří zástupci jsou medicínsky i veterinárně významní. Někteří zástupci jsou schopni způsobit značné ekonomické škody na kulturních plodinách. V obou případech však škodí pouze samice – v případě medicínsky a veterinárně významných druhů fungují jako vektory různých onemocnění, obecně počty samic ovlivňují populaci výrazně více než počty samců, to platí pro medicínsky i ekonomicky významné druhy. Právě boj s těmito druhy je v současnosti hlavní motivací k výzkumu pohlavních chromozomů. Na základě těchto znalostí lze například produkovat samce s defektními pohlavními chromozomy, tito jsou samci neplodní nebo jejich samičí potomstvo má sníženou životaschopnost. Historicky byla cytogenetická data využívána k rekonstrukci fylogenetických vztahů mezi jednotlivými skupinami.

Moderní výzkum cílí na odhalení faktoru určujícího pohlaví na pohlavním chromozomu a na ovlivnění poměru pohlaví potomstva nebo zabránění jeho vzniku prostřednictvím manipulace s tímto genem. V současné době takovéto výzkumy probíhají hlavně u čeledi *Culicidae*, ale nově se objevují i výzkumy zaměřené na flebotomy patřící do čeledi *Psychodidae*.

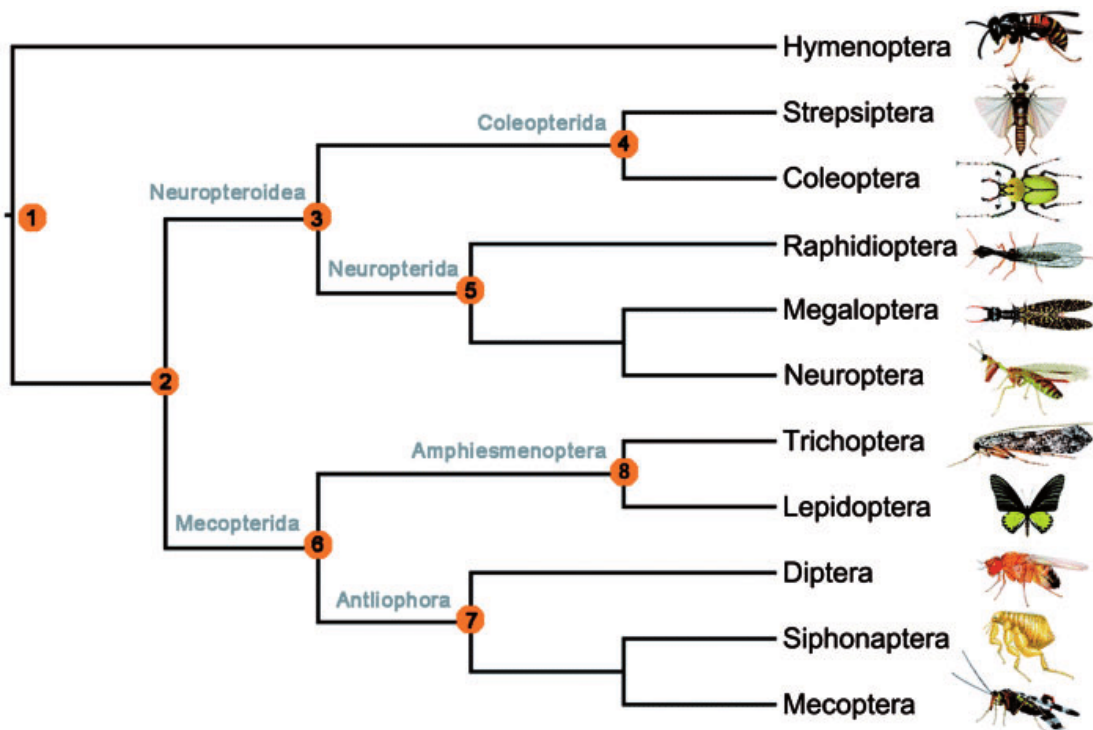
Hlavním problémem ve výzkumu pohlavních chromozomů u dlouhorohých dvoukřídlých je skutečnost, že řada významných druhů disponuje homomorfními chromozomy., Druhům s heteromorfními chromozomy nebyla zase věnována taková pozornost.

Největšího rozkvětu cytogenetika dvoukřídlých dosáhla v druhé polovině 20. století, od té doby je četnost výzkumu v řadě skupin dvoukřídlých nižší. V současné době se provádí výzkumy hlavně na zástupcích významných pro člověka, s cílem popsat systém určení pohlaví. Fylogenetická funkce cytogenetických dat byla nahrazena spolehlivějšími a rychlejšími metodami jako je „barcoding“.

Cílem této práce je shrnout diverzitu pohlavních chromozomů a jejich vliv na určení pohlaví u jednotlivých skupin dlouhorohých dvoukřídlých.

2. Základní charakteristika dvoukřídlých (Diptera)

Dvoukřídlí (Diptera) jsou řádem hmyzu patřícím do skupiny Holometabola. Sesterská linie dvoukřídlých je tvořena srpicemi (Mecoptera) a blechami (Siphonaptera). Společně tyto řády tvoří skupinu Antliophora. Této skupině je sesterská linie tvořená chrostíky (Trichoptera) a motýly (Lepidoptera) (Song *et al.*, 2016) (obr. 1).

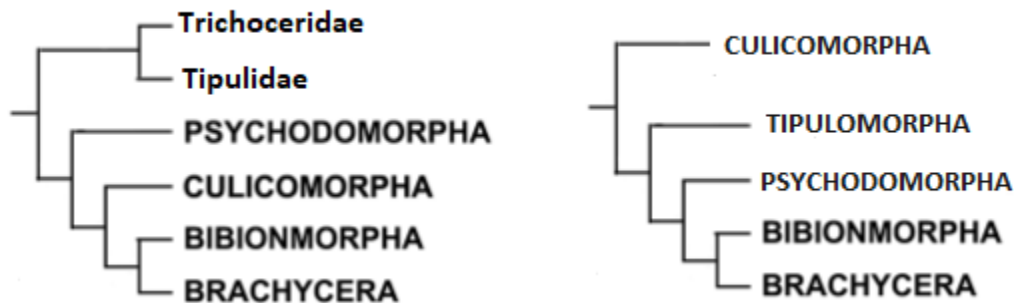


Obr 1. – Kladogram Holometabola. Převzato ze Song et al., 2016.

V současné době je popsáno více jak 158 tisíc druhů dvoukřídlých ve více jak 180 čeledích. Podle morfologie hlavy, počtu článků tykadel a morfologie křídel se dají dvoukřídlí rozdělit do dvou skupin – na dlouhorohé (Nematocera) a krátkorohé (Brachycera). Toto dělení však neodpovídá fylogenezi skupiny – krátkorozí jsou vnitřní skupinou dlouhorohých. Pokud bychom chtěli dlouhorohé pojmut jako monofyletickou skupinu, jednalo by se o synonymum řádu Diptera. Za skupinu na bázi fylogenetického stromu dvoukřídlých je považována čeleď Deuterophlebitidae, která je sesterská všem ostatním dvoukřídlým. Z velkých skupin dipter je za bazální považován infrařád Tipulomorpha a jim sesterská čeleď Nymphomyiidae. Významnými skupinami jsou v rámci dlouhorohých infrařády Psychodomorpha a Culicomorpha. Tyto infrařády jsou významné hlavně proto, že někteří jejich zástupci přenášejí významná onemocnění. Velkým a relativně málo prozkoumaným infrařádem je Bibionomorpha, který je sesterský krátkorohým (Brachycera) (Wiegmann *et al.*, 2011). Bohužel ani v současnosti není systém dvoukřídlých zcela dořešen. Existují i hypotézy, podle kterých se za bazální skupinu považují Culicomorpha, zatímco Tipulomorpha by měla být sesterská skupině Psychodomorpha (Kang *et al.*, 2017).

Krátkorozí (Brachycera) vykazují gradient znaků jako je redukce žilnatiny, snižování počtu tykadlových článků a snižování počtu larválních instarů. Zatímco nižší krátkorozí mají více článkovaná tykadla, u

odvozených zástupců jsou tykadla vždy tříčlanková. Významnou apomorfií odvozené skupiny krátkorohých (Cyclorapha) je puparium – kukla zůstává uvnitř pokožky posledního larválního instaru.



Obr. 2. – Kladogramy možných fylogenetických vztahů významných skupin dlouhorohých dvoukřídlých.
Převzato a upraveno z Kang et al., 2017.

Ačkoli jsou dlouhorozí (Nematocera) parafiletickým taxonem, je tato skupina stále používána pro svou snadnou morfologickou determinaci. Dlouhorozí sdružují dvoukřídlý hmyz s dlouhými nitkovitými tykadly s více než šesti články, kdy první dva bazální články jsou velmi snadno odlišitelné od zbylých článků, které tvoří bičík. Bičík je obvykle nitkovitý nebo růžencovitý, jen velmi vzácně štětinovitý. Nohy jsou u mnoha zástupců velmi dlouhé a tenké. Na pátém chodidlovém článku je arolium (neboli polštářek). Křídla jsou často dlouhá a úzká, ale existují i linie s nápadně širokými křídly, nebo dokonce i apterní zástupci. Křídelní žilnatina je oproti zástupcům Brachycera vždy jen málo redukovaná (viz dále). Maxilární makadla mají čtyři až pět článků, sekundární redukce počtu jejich článků jsou vzácné. Larvy jsou apodní, obvykle eucephální nebo hemicephální, zatímco acephální larvy jsou vzácné (Heming, 2006).

Oproti tomu krátkorozí (Brachycera) nemají nikdy více než osm tykadlových článků a jejich maxilární palpy nemají více jak dva články. Krátkorozí jsou vnitřní skupinou dlouhorohých, sesterskou infrařádu Bibionomorpha. V rámci krátkorohých můžeme pozorovat trend redukce počtu tykadlových článků, redukci křídelní žilnatiny a přechod morfologie larev od hemicephálních k acephálním (Scholtz, 2018).

Pro dvoukřídlé jsou typické adaptace pro rychlý a obratný let a pro příjem tekuté potravy. Zachován je pouze první pár blanitých křídel s nápadným análním lalokem – existuje zde trend ve zvětšování análního laloku a v redukci křídelní žilnatiny. Druhý pár křídel je přeměněn v haltery – kyjovité orgány sloužící k vyvažování za letu a umožňující rychlou změnu směru. Hlava je pohyblivá, obvykle s párem velkých, složených očí a třemi ocely. Ústní ústrojí imag je přizpůsobeno k příjmu kapalné potravy. U Brachycera je obvykle lízací, zatímco u ostatních Nematocera nalézáme bodavě sací ústní ústrojí, ale i zde někteří zástupci mají lízací ústní ústrojí. Právě tato přizpůsobení ústního ústrojí umožňují dvoukřídlým využívat

řadu nik. Mnozí zástupci se živí nektarem, časté jsou však i fytofagní, hematofágní, mykofágní, skatofágní a parazitické skupiny. Řada z nich může být i významnými opylovači. Hematofagové jsou často vektory různých parazitů.

3. Určení pohlaví dvoukřídlých

Obecně je určení pohlaví u dvoukřídlých typu *Drosophila* – tedy heterogametičtí jsou samci, kteří nesou pohlavní chromozomy XY, zatímco samice mají chromozomy XX a jsou homogametické. Rod *Drosophila* má šest párů chromozomů, pět párů velkých chromozomů a jeden pár malých tečkovitých chromozomů. Systém heteromorfních pohlavních chromozomů typu XY/XX byl považován za ancestrální, neboť se vyskytuje u různých skupin řádu (White, 1949).

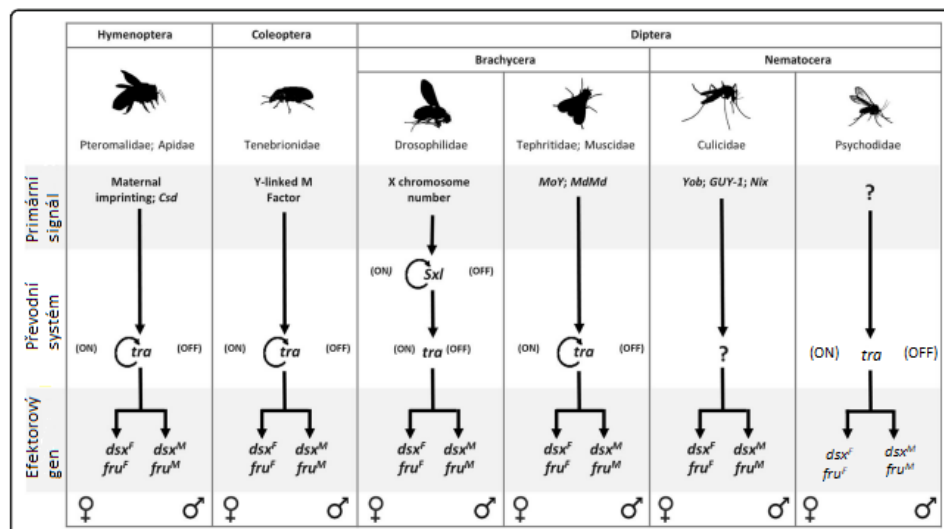
Přestože většina zástupců řádu Diptera má chromozomové určení pohlaví determinováno systémem XY, nejedná se u všech linií o odpovídající chromozomy. Nezávislý vznik systému XY lze vysledovat na základě evoluce tzv. Müllerových elementů. Dá se tak ukázat, že systém heteromorfních chromozomů XY/XX vznikl u dvoukřídlých několikrát. Müllerovy elementy jsou standardně pojmenovaná raménka chromozomů popsána u rodu *Drosophila*. Dnes se využívají pro sledování přestaveb chromozomů u dvoukřídlých (Vicoso a Bachtrog, 2015). Příkladem odvozeným od klasického XY/XX modelu jsou systémy, kdy chromozom Y ztratil gen určující pohlaví, nebo zanikl. Chromozom Y zanikl u Sciaridae a Cecidomyiidae a vznikl zde systém XO nebo X_1X_2O (Hodson a Ross, 2021). Zcela minoritním systémem určení pohlaví je *Abraxas* určený pohlavními chromozomy ZW, kdy heterogametické pohlaví je samice. Tento systém nalezneme pouze u některých zástupců Chironomidae a Simuliidae (Kuvangkadilok *et al.*, 2008; Porter a Martin, 1977).

Systém pohlavních chromozomů i jeho vznik je založen na přítomnosti genů na gonozomech, které hrají úlohu v determinaci pohlaví. Pro hmyz je typická vysoká variabilita primárních signálů a velmi konzervovaná signální kaskáda určující pohlaví. Primárním signálem je obvykle produkt genu neseného jedním z pohlavních chromozomů, jeho exprese moduluje kaskádu určení pohlaví (Sanchez, 2008; Verhulst a van de Zande, 2014). Kaskáda je spuštěna primárním signálem, který je specifický pro samce a samici. To vede k expresi a specifickému sestřihu genů *transformer (tra)* a *transformer-2 (tra2)*, které se vyskytují u obou pohlaví. Produkty těchto genů řídí sestřih mRNA genů *fruitless (fru)* a *doublesex (dsx)* do forem specifických pro jednotlivá pohlaví (Schutt a Nothiger, 2000).

O značné konzervativnosti kaskády vypovídá i to, že *dsx* ovlivňuje finální vývoj fenotypu u různých skupin hmyzu jen s minimálními změnami. Můžeme jej nalézt u *Drosophila melanogaster* (Coschigano a Wensink,

1993), *Bombyx mori* (Suzuki *et al.*, 2001), *Apis mellifera* (Cho *et al.*, 2007), *Anopheles gambiae* (Scali, 2005), *Culex pipiens* (Price *et al.*, 2015) a *Aedes aegypti* (Salvemini *et al.*, 2011). O vysoké konzervativnosti a stáří tohoto systému určení pohlaví vypovídá i fakt, že byl nalezen i v *Daphnia magna* (korýš ze skupiny Branchiopoda). Určení pohlaví u *Daphnia magna* je determinováno environmentálně. Finální fenotyp je určen pohlavně specifickým sestřihem genu *dsx* (Kato *et al.*, 2011).

Oproti tomu primární signály se často liší i mezi blízkými skupinami. Typickým primárním signálem je specifický faktor na chromozomu Y nebo Z. Takovými faktory jsou například tři specifické samčí geny na chromozomu Y u vrtule *Ceratitis capitata* – nejdůležitější z nich je *MoY* (maleness-on-the-Y), který je zcela nezbytný při vytváření samčího fenotypu. Pokud je *MoY* inaktivován pomocí metody CRISPR, vznikají intersexuální imaga nebo dokonce samice s karyotypem XY. Stejnou funkci má i gen *Yob* na Y chromozomu komára *Anopheles gambiae* (Krzywinska *et al.*, 2016) a gen *Nix* na jednom chromozomu prvního páru u samců *Aedes aegypti* (Hall *et al.*, 2015). U rodu *Drosophila* chromozom Y postrádá samčí faktor – pohlaví je určováno poměrem počtu chromozomů X k autozomům. Pokud jeden chromozom X vychází na haploidní sadu, spouští se klasická kaskáda určení pohlaví, s tím rozdílem, že sestřih mRNA pro geny *tra* a *tra2* řídí gen *sex-lethal (sxl)*. Tento sestřih následně vede k samičímu fenotypu. Pokud je však poměr chromozomů X ku autozomům 1:6, produkty kaskády budou řídit vývoj k samčímu fenotypu. Zapojení genu *sxl* do určení pohlaví je unikátní pro *Drosophila*, u jiných skupin gen *sxl* funguje jako pohlavně nespecifický regulátor exprese (Bopp *et al.*, 2014; Erickson a Cline, 1998; Gempe a Beye, 2011).



Obr. 3 – Schematické porovnání kaskád určující pohlaví u různých skupin hmyzu

Je patrná hluboká konzervovanost kaskády, odlišují se pouze primární signály, které tuto kaskádu spouštějí.

Převzato a upraveno z Petrella *et al.*, 2019.

4. Pohlavní chromozomy dvoukřídlých

Systém geneticky určeného pohlaví je spojen se vznikem pohlavních chromozomů, které vznikly z páru autozomů nesoucí faktor určující pohlaví (Ohno, 1967). V oblasti lokusu genu určujícího pohlaví dochází k akumulaci genů prospěšných pouze pro jedno z pohlaví a k následnému omezení rekombinace (Rice, 1987). Jednou z možností, jak omezit rekombinace mezi pohlavními chromozomy X a Y, potažmo Z a W jsou chromozomové přestavby. Takovými přestavbami mohou být inverze, delece nebo translokace (Davisson a Akeson, 1993).

V případě přestaveb dojde k přemístění nebo odstranění homologické oblasti z jednoho z páru pohlavních chromozomů, což vede k zabránění rekombinace. Rekombinace může být zastavena pouze v jednom lokusu, nebo ve více lokusech. V druhém případě se tato omezení rekombinace liší svým stářím (Berendes, 1966; Lahn a Page, 1999). Tyto jednotlivé ztráty rekombinace na homologních pohlavních chromozomech u samců (v případě systému XY/XX) nebo u samic (v případě systému ZW/ZZ) můžeme pozorovat v podobě tzv. strat. Strata jsou evoluční vrstvy, které se od sebe liší nejen svým stářím, ale i divergencí sekvencí jednotlivých genů. Strata vznikají na chromozomech Y a W mimo pseudoautozomální oblasti, v nichž je schopnost rekombinace zachována (Rappold *et al.*, 1992).

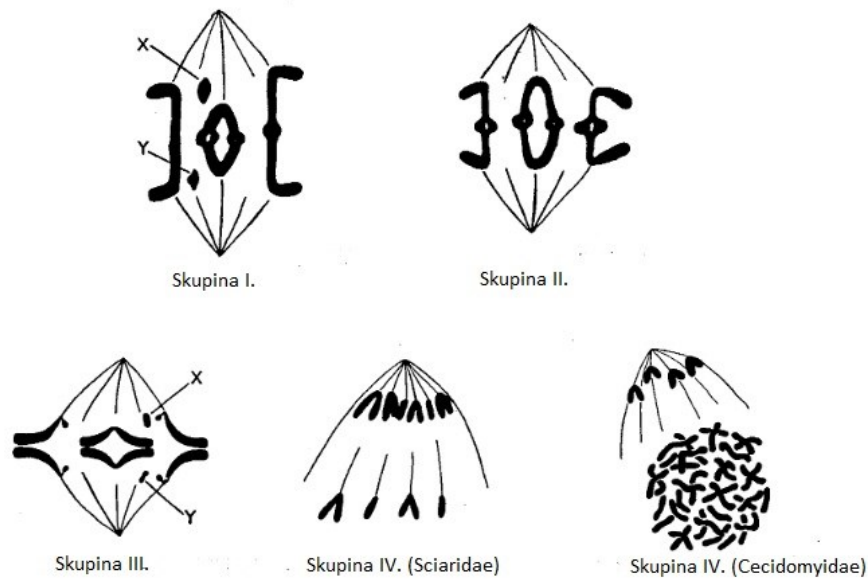
V oblastech ve kterých nedochází k rekombinaci genů na chromozomech Y a W postupně dochází k divergenci homologů na chromozomech X a Z. Dalším jevem je degenerace nepárových pohlavních chromozomů Y/W (Charlesworth a Charlesworth, 2000), která zahrnuje ztrátu některých genů, akumulaci heterochromatinu a repetitivní DNA (Charlesworth, 1991; Skaletsky *et al.*, 2003). Tyto jevy následně vedou k tomu, že se původně zcela homologické chromozomy odlišují morfologicky. Na základě morfologie rozlišujeme homomorfní chromozomy, které se od sebe morfologicky neliší a heteromorfní chromozomy, které se od sebe liší a je možné je určit cytologicky (Rao a Rai, 1987). Homomorfní pohlavní chromozomy se dají určit např. analýzou jednonukleotidových polymorfismů (SNP – *single nucleotide polymorphism*), která je schopná odlišit gonozomy stále sdílející významné homologní oblasti (Koerich *et al.*, 2008). V pokročilých stádiích diferenciace nepárového gonozomu je nutné kompenzovat dávku genů na pohlavních chromozomech z důvodu značně degradovaného nebo dokonce zcela chybějícího nepárového gonozomu (Abbott *et al.*, 2017).

Přemístění stávajícího faktoru určujícího pohlaví na jiný pár chromozomů může odstartovat antagonistickou selekci. Postupně tak může převládnout nový systém pohlavních chromozomů (Abbott *et al.*, 2017).

Absolutní většina dlouhorohých vykazuje systém určení pohlaví XY. Navzdory podobné chromozomální architektuře i genotypovému určení pohlaví, prokázaly srovnávací studie, že pohlavní chromozomy vznikaly opakovaně a že se jejich geny mohou lišit mezi jednotlivými skupinami dvoukřídlých (Sanchez, 2008; White, 1949). To lze prokázat například sledováním evoluce různých Müllerových elementů. U různých skupin vznikají gonozomy z různých elementů (Sanchez, 2008; Vicoso a Bachtrog, 2015). V některých případech vznikaly pohlavní chromozomy dokonce opakovaně ze stejných chromozomů. Gonozomy pak mohou být homologické, ale vznikly nezávisle (Holt *et al.*, 2002; Sanchez, 2008).

Na základě morfologie chromozomů byli dlouhoroží rozděleni do čtyř skupin (White, 1949). Přestože v daných skupinách nalezneme četné výjimky, tyto skupiny relativně odpovídají i moderní fylogenezi založené na molekulární analýze genů (Wiegmann *et al.*, 2011).

První skupina se vyznačuje přítomností chiasmat mezi gonozomy a tyto chromozomy lze cytologicky odlišit – patří sem čeleď Tipulidae. Charakteristickým znakem druhé skupiny jsou homomorfní gonozomy a zachování chiasmat i u samčích gonozomů – sem řadíme čeledi Culicidae, Psychodidae, Simuliidae, Ceratopogonidae a další jim příbuzné čeledi. Ačkoli jedním ze základních znaků skupiny jsou homomorfní chromozomy, nalezneme zde i zástupce s chromozomy heteromorfními. U řady zástupců mohou být homomorfní chromozomy odhaleny na základě studia heterochromatinu nebo polytenních chromozomů. Původní předpoklad byl, že homomorfní chromozomy vznikly u této skupiny jako nové pohlavní chromozomy po ztrátě původních heteromorfních chromozomů. Recentně se spíše soudí, že se jedná o ancestrální stav (Vicoso and Bachtrog, 2015; White, 1949). Třetí skupina je charakterizována heteromorfními pohlavními chromozomy bez chiasmat – do této skupiny řadíme čeledi Scatopsidae, Thaumaleidae, Bibionidae, Mycetophilidae a Blephariceridae (White, 1949). Čtvrtá skupina je unikátní úplnou ztrátou chromozomu Y a systémem určení pohlaví, který zahrnuje eliminaci chromozomu X. Dalším zajímavým znakem je přítomnost zvláštních chromozomů přítomných pouze v zárodečné linii, které jsou ze somatických buněk následně eliminovány. Do této skupiny patří Sciaridae a Cecidomyidae (Hodson a Ross, 2021; White, 1949).



Obr. 4 – Schématické znázornění karyotypů jednotlivých skupin dlouhorohých (Nematocera)

První skupina má morfologicky rozlišitelné gonozomy, mezi nimiž jsou vyvinuta chiasmata (dochází k předčasnému rozpadu chiasmata, již v diakinezi lze pozorovat univalenty gonozomů). Druhá skupina má typicky s homomorfní pohlavní chromozomy, třetí a čtvrtá skupina je typická pro infrařád Bibionomorpha. Většina zástupců tohoto infrařádu disponuje heteromorfními pohlavními chromozomy, u kterých došlo ke ztrátě chiasmata (třetí skupina). V případě čeledí Sciaridae a Cecidomyiidae došlo k degradaci chromozomu Y a vznikl systém Protenor vyznačující se absencí chromozomu Y. Tyto dvě čeledi tvoří čtvrtou skupinu, kromě absence chromozomu Y jsou pro ně typické i specifické chromozomy přítomné jen v zárodečné linii buněk. Upraveno a převzato z White (1949).

Čeď	Typ pohlavních chromozomů
Tipulidae	XY/XX (John, 1957)
Trichoceridae	XY/XX (Vicoso a Bachtrog, 2015)
Psychodidae	Obvykle XY/XX s homomorfními X a Y, někteří zástupci heteromorfní X a Y (Kreutzer et al., 1987; Troiano, 1977)
Culicidae	Culicinae XY/XX s homomorfními X a Y, Anophelinae heteromorfní X a Y (Rai, 1963; Rao a Rai, 1987)
Chironomidae	XY/XX s homomorfními X a Y, vzácně heteromorfní X a Y nebo X_1X_2Y/ X_1X_2 , jeden zástupce ZW/ZZ s homomorfními Z a W (Petrova, 1984; Porter a Martin, 1977; White, 1949)
Simuliidae	XY/XX s homomorfními X a Y, jeden zástupce ZW/ZZ (Kuvangkadilok et al., 2008; Rothfels, 1956)
Ceratopogonidae	Nejspíše XY/XX s homomorfními X a Y (Atchley a Jackson, 1968; White, 1949)
Bibionidae	XY/XX s heteromorfními X a Y (White, 1949)
Mycetophilidae	XY/XX s heteromorfními X a Y (Fahmy, 1949)
Sciaridae	XX/X0 (Metz a Moses, 1928)
Cecidomyiidae	$X_1X_1X_2X_2/ X_1X_20$ (Stuart a Hatchett, 1991; White, 1949)

Tabulka 1 - Typy pohlavních chromozomů zjištěných u různých čeledí Nematocera

Následující podkapitoly se budou týkat poznatků o karyotypech a pohlavních chromozomech ve dvou infrařádech dlouhorohých dvoukřídých (Tipulomorpha a Bibionomorpha) a několika velkých čeledích (konkrétně Psychodidae, Culicidae, Chironomidae, Simuliidae a Ceratopogonidae).

4.1. Tipulomorpha

Tipulomorpha je považována za jednu z bazálních skupin dlouhorohých dvoukřídých. Vyznačuje se nápadně dlouhými a tenkými tykadly a nohama, které jsou někteří zástupci schopni v případě nebezpečí odvrhnout. Rovněž i zbytek těla a křídla jsou nápadně protáhlá a štíhlá. Nitkovitá tykadla se liší počtem článků mezi jednotlivými čeleděmi. Ty se rovněž liší přítomností nebo absencí ocellů. Cytogeneticky byly prostudovány dvě čeledi z tohoto infrařádu – Tipulidae a Trichoceridae.

Typický diploidní počet čeledi Tipulidae je $2n=8$, karyotyp je tvořený třemi páry autozomů a jedním párem drobných pohlavních chromozomů. Karyotyp čeledi Tipulidae byl považován za ancestrální v rámci Diptera, což naznačuje i tečkovitý chromozom X. Současné poznatky to však vyvracejí (Vicoso a Bachtrog, 2015). U všech párů chromozomů jsou zachována chiasmata. Chiasmata mezi pohlavními chromozomy se předčasně rozpadají, poté se u těchto chromozomů uplatňuje tzv. vzdálené párování (White, 1949). Během rané profáze I dochází k synapsi homologických chromozomů, ale již během diakineze jsou gonozomy pozorovatelné jako univalenty (Fuge, 1979). Specifická situace byla pozorována u tiplice *Tipula maxima*. Výzkumy provedené na tomto druhu odhalily, že ačkoliv chromozomy X a Y v zygotene nepárují, tak na počátku meiózy se spojují nespecificky svým heterochromatinem (John, 1957).

Velmi zajímavá je situace u tiplice *Tipula paludosa*, u níž se karyotypy liší u jednotlivých jedinců v rámci jedné populace, $2n$ může být od 8 (což je karyotyp typický pro celou čeleď) až po 12 chromozomů. Obecně má však *T. paludosa* tři páry autozomů a jeden pár pohlavních chromozomů, případně zde mohou být i další drobné chromozomy homologické k pohlavním chromozomům, zřejmě B chromozomy. Právě tento nestandardní karyotyp může působit problémy při rozdělování chromozomů během meiózy a způsobovat i sterilitu jedince (Bauer, 1931). Dalším příkladem odlišného karyotypu jsou někteří zástupci rodu *Nephrotoma*. Dva odlišné typy chromozomu X popsány jako X_1 a X_k byly nalezeny u *Nephrotoma ferruginea*. U tohoto druhu se vyskytují jedinci s nadpočetnými pohlavními chromozomy. Kromě jedinců s chromozomy XY a XX tak můžeme nalézt i nestandardní samce XYY a XXY – navíc v obou případech jedinci zůstávají plodní (Ullerich *et al.*, 1964).

Čeleď Trichoceridae je nejen celkovým vzhledem, ale i karyotypem velmi podobná čeledi Tipulidae. Liší se od ní pouze sekundární ztrátou chiasmata mezi chromozomy X a Y (White, 1949). Pohlavní chromozomy jsou velmi drobné (Vicoso a Bachtrog, 2015).

4.2. Psychodidae

Psychodidae je čeleď malých až středně velkých dlouhorohých dvoukřídlých s poměrně krátkým tělem, velkými nápadně chlupatými křídly a dvanácti až šestnácti článkovanými tykadly. Tykadlové články jsou válcovitého až lahovitého tvaru. Oči jsou ledvinovitého nebo kulovitého tvaru. Ledvinovité oči mohou být téměř spojené, oceli zcela chybí. Imaga mají obvykle redukované ústní ústrojí. Výjimkou jsou pouze zástupci podčeledí Phlebotominae a Sycoracinae. Nápadně velká a široká křídla mají devět až deset podélných žilek. Radiální a mediální vidlice se nachází poblíž báze křídla, nebo mohou být zcela redukované (Oosterbroek, 2006).

U Psychodinae v meióze dochází k úplným synapsím autozomů kromě centromerických oblastí. Pohlavní chromozomy samců jsou v meióze obvykle zcela oddělené. Občas se dotýkají špičkami, což je způsobeno nespecifickými asociacemi heterochromatinu. V profázi I lze jen zřídka kdy pozorovat leptotene a zygotene. První hojně pozorovanou fází je pachytene. Diplotene byla pozorována jen několikrát. V metafázi I jsou chiasmata téměř úplně terminalizována. V anafázi I se heterozomy přesouvají do středu vřeténka, dokud se vzájemně nedotknou (Troiano, 1981).

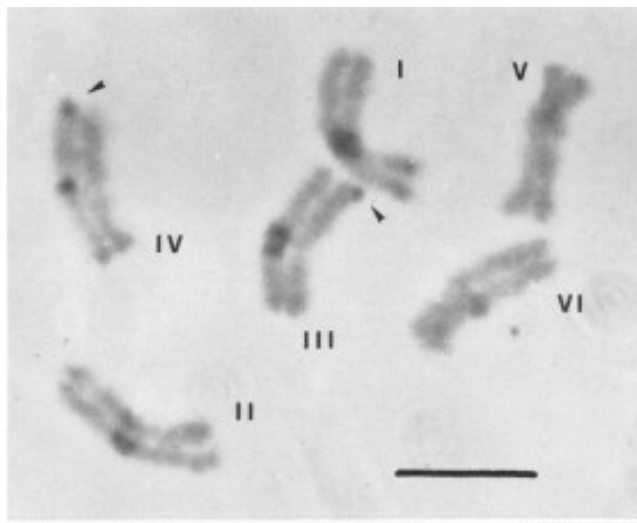
Absolutní většina všech analyzovaných zástupců čeledi Psychodidae má morfologicky nerozlišené pohlavní chromozomy. Pouze pár druhů se vyznačuje heteromorfními gonozomy nebo homomorfními gonozomy, které se dají určit na základě specifického vzoru pro pohlavně specifický heterochromatin (Kreutzer *et al.*, 1988, 1987).

Výzkumy prováděné na koutuli *Satchelliella nubila* z podčeledi Psychodinae odhalily přítomnost heteromorfních pohlavních chromozomů a šesti párů autozomů. Chromozom X dosahuje velikosti přibližně jedné třetiny čtvrtého páru autozomů, chromozom Y je o trochu delší než polovina délky chromozomu X (Troiano, 1981). Velmi podobný karyotyp má i koutule *Pericoma modesta* se šesti páry autozomů a s pohlavními chromozomy typu XY/XX. Zajímavým úkazem je rozdílná kondenzace chromozomu Y v mozkové tkáni larev a v gonádách samců. V případě larválních tkání se chromozomy X a Y velikostně neodlišují. Ve varlatech během spermatogoniální mitózy i meiózy je Y naopak výrazně menší než X (Troiano, 1977).

Koutule *Satchelliella opaca*, *Tonnoiriella pulchra* a *Berdeniella sp.* mají rovněž karyotyp $2n=14$ s párem heteromorfních chromozomů typu XY/XX. Jednotlivé druhy se mezi sebou různí poměrem velikosti gonozomu X a autozomů. *Satchelliella opaca* má chromozom X dlouhý jako jedna třetina nejmenšího autozomu, oproti tomu *Tonnoiriella pulchra* má chromozomy XY stejně velké jako nejmenší pár autozomů (Giorgio Troiano, 1981).

Tropická synantropní koutule *Clogmia albipunctata* disponuje pouze šesti páry chromozomů, které lze rozlišit pouze na základě polohy centromerického heterochromatinu. Brazílské populace se liší vzorem centromerického a terminálního heterochromatinu na třetím a čtvrtém páru chromozomů, kdy oba páry mají u samic stejný vzor, zatímco u samců se vzor heterochromatinu v rámci obou párů liší. U třetího a čtvrtého páru samců nese centromerický heterochromatin jen jeden z chromozomů, u samic jsou chromozomy těchto párů bez centromerického heterochromatinu. Současně byly u samců pozorovány rozdíly v terminálním heterochromatinu. Zatímco na třetím páru chromozomů je terminální

heterochromatin pouze na předpokládaném chromozomu X_1 , čtvrtý pár nese terminální heterochromatin pouze na možném chromozomu Y_2 . Tyto intersexuální rozdíly ve vzoru heterochromatinu by mohly znamenat, že třetí a čtvrtý pár chromozomů by mohl představovat gonozomy. Oba tyto páry chromozomů během meiozy tvoří bivalenty. Podle této teorie karyotyp samice je $X_1 X_1 X_2 X_2$, zatímco samci mají sestavu $X_1 X_2 Y_1 Y_2$ (Troiano, 1988).



Obr. 5 - Koutule *Clogmia albipunctata*, metafáze I.

Všimněte si pohlavně specifického centromerického a terminálního heterochromatinu na třetím a čtvrtém páru chromozomů (označené šipkami). Na základě specifického vzoru heterochromatinu byly tyto chromozomy popsány jako Y_1 a Y_2 . Upraveno a převzato z Troiano (1988).

Diverzita počtu chromozomů je vyšší v podčeledi Phlebotominae. *Phlebotomus colabaensis* má v diploidní sadě šest chromozomů ($2n=6$), první pár chromozomů je metacentrický a 2,5krát delší než nejmenší pár chromozomů. Zbývající dva páry jsou submetacentrické. Velmi podobný karyotyp mají i *P. argentipes* a *P. papatasi*. Oba zmíněné druhy mají osm chromozomů ($2n=8$), největší pár je metacentrický, druhý a třetí jsou submetacentrické a nejmenší pár je telocentrický. V karyotypu není možné podle morfologie určit pohlavní chromozomy. Karyotypy jedinců z Egypta, Izraele a Indie jsou identické (Kreutzer *et al.*, 1987).

Lutzomyia spinicrassa má rovněž osm chromozomů a morfologie chromozomů nenasvědčuje přítomnosti heteromorfních gonozomů. Velmi podobný karyotyp má i *L. longipalpis*, kde bylo na základě molekulárních technik detekováno samčí pohlaví jako heterogametické, což jasně dokazuje existenci homomorfních XY gonozomů (Kreutzer *et al.*, 1987; Vigoder *et al.*, 2021). Karyotyp se čtyřmi páry chromozomů je pro rod *Lutzomyia* typický. Byl pozorován u všech druhů s výjimkou *L. trapidoi* s karyotypem $2n=6$. Ostatní druhy se od sebe odlišují morfologií a velikostí jednotlivých párů

chromozomů. U *L. gomezi* je jeden pár subtelocentrický, zbylé tři páry jsou metacentrické. *L. erwindonaldi*, *L. carmelinoi*, *L. walkeri* a *L. columbiana* mají rovněž čtyři páry chromozomů, první tři jsou metacentrické, poslední pár submetacentrický (Kreutzer *et al.*, 1988). U *L. youngi* a *L. longiflocosa* byl pozorován karyotyp, v němž je první pár submetacentrický a další tři páry metacentrické. Podobný karyotyp byl pozorován u *L. spinicrassa* a *L. torvida*, kdy první dva páry chromozomů byly submetacentrické a zbylé dva metacentrické. Karyotyp skládající se ze čtyř párů metacentrických chromozomů byl rovněž pozorován u *L. quasitowsendi* (Escovar *et al.*, 2002).

U dvou zástupců podčeledi Phlebotominae byly objeveny heteromorfní gonozomy. Jedním z nich je *Lutzomyia (Psathyromyia) shannoni*, která zůstává jediným zástupcem podrodu *Psathyromyia*, který byl cytologicky zkoumán (Jiménez *et al.*, 2001). Heteromorfní pohlavní chromozomy byly popsány i u *Phlebotomus perniciosus* (Kreutzer *et al.*, 1987). Zbytek zástupců podčeledi Phlebotominae a i valná většina dalších zástupců čeledi Psychodidae má morfologicky nerozlišitelné homomorfní gonozomy (Kreutzer *et al.*, 1988).

Během určení pohlaví u *Phlebotomus perniciosus* hraje významnou roli specifický sestřih produktů genů *doublesex* a *fruitless*, zde popsané jako *Ppedsx* a *Ppefru*. Jejich sestřih na samičí izomer je řízen genem *transformer (Ppetra)*, který byl nalezen pouze u samic. Samci rovněž disponují geny vykazujícími blízkou podobnost k *tra*, jsou však nefunkční. Existenci specifického samčího lokusu na heteromorfním chromozomu Y se doposud nepovedlo potvrdit. Heteromorfie Y nasvědčuje možnou přítomnost specifických samčích genů. Je zajímavé, že u tohoto druhu byl také objeven gen *transformer*. Tento objev potvrdil přítomnost konzervované molekulární kaskády určující pohlaví i u *Nematocera* (Petrella *et al.*, 2019).

4.3. Culicidae

Zástupci této čeledi jsou malí až středně velcí, mají protáhlé tělo a křídla a nápadně dlouhé a křehké nohy. Hlava má protažené ústní ústrojí a nitkovitá tykadla. Vodní larvy mají typickou morfologii. Samice většiny druhů komárů sají krev z rozličných skupin suchozemských obratlovců, někteří zástupci jsou významnými vektory onemocnění. Nejvýznamnější rody jsou *Anopheles*, *Aedes* a *Culex* (Oosterbroek, 2006).

Všichni zástupci této čeledi mají tři páry chromozomů ($2n=6$), jedinou výjimku je *Chagasia bathana* z podčeledi Anophelinae, která má v diploidní sadě osm chromozomů (Harbach a Howard, 2009). Velmi zajímavé jsou však rozdíly v pohlavních chromozomech mezi podčeledí Anophelinae a Culicinae.

Anophelinae mají plně diferencované pohlavní chromozomy XY, které lze morfologicky odlišit jak od autozomů, tak od sebe navzájem. Culicinae mají homomorfní pohlavní chromozomy X a Y. Karyotyp obsahuje tři páry metacentrických chromozomů, které se od sebe liší pouze velikostí. Nerekombinující oblast významná pro určení pohlaví se nachází na nejmenším páru chromozomů označovaném jako pár č. 1 (Rai, 1963). Tato oblast bez rekombinace zaujímá během samčí meiózy 40% délky páru č. 1 a označuje se jako oblast 1q21. V této oblasti byla nalezena i významná genetická diference mezi chromozomy X a Y. (Fontaine *et al.*, 2017).

Společný předek dnešních komárů měl nejspíš homomorfní pár pohlavních chromozomů X a Y. Po oddělení anopheloidní linie ustala rekombinace mezi proto-X a proto-Y, což vedlo k hromadění nepříznivých mutací na chromozomu Y a k jeho degeneraci. Na tomto chromozomu byla selekce účinná jen u genů ovlivňujících samčí morfologii a plodnost. Existují i teorie podle nichž měl předek dnešních komárů heteromorfní pohlavní chromozomy. Tato teorie předpokládá vznik homomorfních pohlavních chromozomů přenosem genu určujícího pohlaví z pohlavních chromozomů na pár autozomů, popř. mohla evoluce probíhat přes systém určení pohlaví X0. Teorie vzniku homomorfních chromozomů z X0 systému předpokládá mutaci inaktivující jeden z chromozomů X v samčím karyotypu a tím vznik samců s XX karyotypem. Tato teorie byla vyvrácena objevením samčího faktoru na jednom z páru homomorfních gonozomů u *Aedes aegypti* (Hall *et al.*, 2015; Touns and Hahn, 2010). Dostupné údaje ukazují jako mnohem pravděpodobnější vznik heteromorfních chromozomů z homomorfních krátce po oddělení podčeledi Anophelinae před zhruba 150 miliony lety (Touns a Hahn, 2010). Tuto teorii kromě molekulárních dat podporuje i skutečnost, že *Corethrella brakeleyi* z čeledi Corethrellidae, která je považována za sesterskou čeledi Culicidae, má rovněž tři páry homomorfních chromozomů (Rao and Rai, 1987; Zhang *et al.*, 2019).

Faktorem, který finálně u hmyzu určuje pohlaví jedince, je protein *doublesex* (*dsx*). RNA tohoto genu podléhá specifickému sestřihu u každého pohlaví je jiný. Gen pro *dsx* u komára *Anopheles gambiae* se skládá ze sedmi exonů. Pro vznik pohlavně specifického proteinu se však využívají jen některé exony. Ty se liší tím, zda jsou specifické pouze pro jedno pohlaví nebo zda jsou využívány u obou pohlaví (Scali, 2005). Důležitost *dsx* ve vývoji fenotypu pohlaví dokládá i fakt, že pokud jsou úseky pohlavně specifické pro samice vystřiženy za pomoci metody CRISPR-Cas9, můžeme u samic pozorovat prvky samčího fenotypu a rovněž abnormality v morfologii ústního ústrojí, který těmto transgenním samicím neumožňuje sít na hostiteli (Kyrou *et al.*, 2018).

Dsx a jeho pohlavně specifické izomorfy jsou pouze finálními prvky kaskády genů, které vedou ke specifickému sestřihu *dsx* a *fru*. U většiny hmyzu s výjimkou motýlů řídí specifický sestřih izoform *dsx* a *fru* gen *tra*. Ten však doposud nebyl objeven u komárů. Specifický sestřih *dsx* a *fru* u komára *Anopheles gambiae* řídí gen *femaleless (fle)* (Krzywinska *et al.*, 2021). U komárů je pohlaví jedince určeno sestřihem *dsx* a *fru*, sestřih je řízen specifickými faktory kódovanými geny na pohlavních chromozomech. Takovým faktorem je *Nix* v M-locusu, který je uložen na homomorfním Y chromozomu. Ten je součástí prvního páru chromozomů u samců *Aedes aegypti*. *Nix* se nachází v oblasti 1q21 na chromozomu 1. Jak bylo již dříve zmíněno, v této oblasti se homomorfní chromozomy X a Y výrazně liší. Pokud byl *Nix* vystřižen metodou CRISPR-Cas9, více než dvě třetiny samců byly feminizovány. Feminizace se projevovala zkrácením set na tykadlech a výraznou deformací kopulačních orgánů. Transgenní samci vykazovali mnohem vyšší koncentraci samičích izomorf *dsx* a *fru* než standardní samci. Naopak transgenní samice s vloženým genem *Nix* vykazují značnou deformaci a maskulinizaci. Objevují se u nich deformované samčí kopulační orgány, a dokonce i deformované samčí gonády. Významná transkripce genu *Nix* probíhá již 3 až 4 hodiny po iniciaci embryonálního vývoje, na začátku stádia syncytialního blastodermu (Hall *et al.*, 2015).

Komár *Anopheles gambiae* disponuje specifickým samčím genem situovaným na chromozomu Y. Tento gen, popsáný jako *Yob*, funguje stejně jako *Nix* u *Aedes aegypti*. Tyto geny jsou homologické (Krzywinska *et al.*, 2016). Gen *Yob* ovlivňuje specifický sestřih *dsx* na samčí izomorf. Pokud je do genomu samic vložena sekvence *Yob* metodou CRISPR-Cas9, pozorujeme jejich značnou maskulinizaci. U těchto samic pozorujeme také významný úhyn během embryogeneze, i ve stádiu kukly. Během larválního vývoje významný úhyn nebyl pozorován, ale vývoj trval o několik dnů déle než u kontrolních samic. Přeživší samice jsou v dospělosti deformované a nesou samčí znaky. Můžeme u nich pozorovat delší tykadla s hustšími setami, prodloužený poslední článek palp a deformovaný terminální segment zadečku. Vzácně mohou být vyvinuty i samčí kopulační orgány. Transgenní samice nejeví zájem o možné hostitele, nesají krev a často záhy umírají (Krzywinska a Krzywinski, 2018). Velmi podobný gen je i na Y chromozomu *Anopheles stephensi*. *Guy 1*, jak byl tento gen nazván, rovněž ovlivňuje specifický sestřih *dsx* na samčí izomorf. Pokud je vnesen do samic, umírají již během embryogeneze. Doposud tak nebyly získány dospělé transgenní samice (Ciscione *et al.*, 2016; Ciscione *et al.*, 2013).

4.4. Chironomidae

Velmi početná čeleď drobného hmyzu, který je podobný komárům. Mají štíhlé tělo s nitkovitými přívěsky a protáhlá křídla.

U zástupců čeledi Chironomidae nalezneme 4 až 12 chromozomů v diploidní sadě. Karyotyp se může lišit i mezi populacemi. Příkladem může být druh *Prodiamesa olivacea*, jehož standardní karyotyp se skládá z pěti párů chromozomů a postrádá jak rozlišitelné gonozomy tak i chromozomy B (Michailova, 1984; Petrova, 1984). U tohoto druhu byl však popsán i karyotyp se třemi páry standardních chromozomů, kdy pohlavní chromozomy nejsou rozlišitelné a jeden chromozom B se vyznačuje výrazným množstvím heterochromatinu. Většina zástupců podčeledi Chironominae disponuje osmi chromozomy v diploidní sadě. Pakomáři z rodu *Glyptotendipes* mají čtyři páry chromozomů, kdy první pár je největší a čtvrtý je nejmenší. Čtvrtý pár je akrocentrický (Karmokov a Akkizov, 2016; Michailova *et al.*, 2001). Velmi podobný karyotyp nalezneme i u *Lipiniella prima* $2n=8$, naopak *L. arenicola* má pouze šest akrocentrických chromozomů v diploidní sadě a *L. moderata* má dokonce pouze dva páry chromozomů. První pár je metacentrický a druhý akrocentrický (Michailova a Ferrington, 1992; Shilova *et al.*, 1992). Zástupci rodu *Chironomus* mají podobně jako většina zástupců podčeledi čtyři páry chromozomů. Karyotyp *Stictochironomus rosenscholdi* je velmi typický pro tuto podčeleď, první ze čtyř párů chromozomů je největší, následně velikost párů klesá. Zástupci rodu *Cryptochironomus* mají vyšší variabilitu: *C. obreptans* disponuje pouze dvěma páry chromozomů ($2n=4$), u blíže neurčeného *Cryptochironomus sp.* a *C. fridmanae* byly popsány karyotypy o čtyřech párech chromozomů ($2n=8$) (Michailova a Belcheva, 1982; Petrova *et al.*, 2013). Dalším zástupcem podčeledi Chironominae se čtyřmi páry chromozomů je *Axarus festivus* (Michailova a Ferrington, 1992).

Karyotypy podčeledi Orthoclaadiinae se skládají ze dvou nebo tří párů chromozomů. Oba tyto karyotypy lze pozorovat u rodu *Halocladius*, *H. variabilis* má karyotyp $2n=6$ a *H. varians* $2n=4$. Další diverzifikovaný rod z této podčeledi je *Cricotopus*. Zástupci nejsou variabilní ani v počtech chromozomů, ani v jejich morfologii. Dokonce se mezi sebou neliší ani podrody, všechny mají tři páry chromozomů s takřka stejnou morfologií, jakou nacházíme u jiných zástupců z čeledi Chironomidae (Michailova, 1984). Takřka totožný karyotyp nalezneme i u *Orthocladius bipunctellus*. Žádný zástupce z čeledi Orthoclaadiinae nemá heteromorfní gonozomy, ale někteří zástupci mají specifické chromozomy přítomné pouze v zárodečné linii (Hodson a Ross, 2021; Michailova a Belcheva, 1982).

Zástupci podčeledi Diamesinae disponují čtyřmi páry chromozomů s dobře patrnými centromerami, jinak se od zbytku čeledi neliší (Petrova, 1984).

U většiny zástupců čeledi Chironomidae většinou nelze morfologicky odlišit pohlavní chromozomy. Existují však výjimky s heteromorfními pohlavními chromozomy. Heteromorfní pohlavní chromozomy X a Y se podařilo potvrdit u rodů *Telmatogeton*, *Clinotanytus* a *Procladius* (Petrova a Zhiron, 2014).

Rod *Telmatogeton* je zajímavý tím, že je primárně mořský, ale zástupci obývající Havajské ostrovy osídlili prudce tekoucí potoky. Havajští zástupci se od svých mořských předků liší nejen ekologií, ale i sníženým počtem chromozomů. U dvou druhů nalezneme heteromorfní pohlavní chromozomy – těmi jsou *T. abnormis* s pohlavními chromozomy XY/XX a *T. hirtus* se systémem $X_1X_2Y/X_1X_1X_2X_2$ (Newman, 1975).

Zcela odlišný je systém pohlavních chromozomů u pakomára *Polypedilum nubifer*. Ačkoli ani zde nejsou heteromorfní pohlavní chromozomy jako u většiny pakomárů, během výzkumu rozložení heterochromatinu na chromozomech bylo objeveno, že čtvrtý pár chromozomů je u samic tvořen dvěma různými pohlavními chromozomy. Samice jsou tedy heterogametickým pohlavím – pohlavní chromozomy se od sebe liší v oblasti 41c-d. Samci jsou homogametičtí – pohlavní chromozomy se od sebe neliší. *P. nubifer* se tedy vyznačuje systémem ZW/ZZ (Porter a Martin, 1977).

4.5. Simuliidae

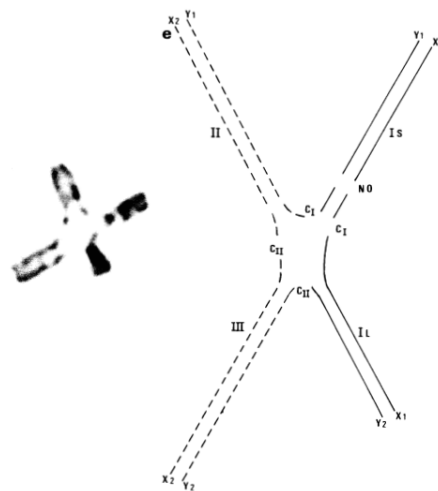
Zástupci této čeledi jsou velmi drobní až středně velcí krevsající dvoukřídli. Mají relativně velké zavalité tělo a krátké nohy. Larvy jsou vázány na rychle tekoucí potoky a peřeje, filtrují potravu z proudící vody. Larvy se k podkladu připřadají za pomoci slinných žláz. Na tyto tkáně je zaměřená řada studií. Samice sají na hostitelích během dne, nejčastěji v ranních a večerních hodinách. Muchničky mohou být významnými přenašeči parazitů jako je třeba původce onchocerkózy. V případě velkých populačních hustot jsou trapiči skotu (Oosterbroek, 2006).

Muchničky jsou početnou čeledí s často velkým množstvím kryptických druhů, některé mohou být určeny na základě morfologie larvy nebo kukly, popřípadě odlišných ekologických nároků. Většina kryptických druhů však může být určena pouze na základě inverzí na polytenních chromozomech ze slinných žláz larev nebo za pomoci DNA barcodingu (Adler *et al.*, 2004; Merritt, 2005). Druhy jsou tedy často charakterizovány jedinečnými inverzemi. Při rozlišování jednotlivých druhů se nejčastěji používají na paracentrické inverze. Ty jsou uváděny římskou číslicí (podle čísla páru chromozomů), písmenem L nebo S (podle toho, zda se nalézají na krátkém nebo dlouhém raménku chromozomu) a číslicí (označuje pořadí jednotlivých chromomer na chromozomu) (Spironello a Hunter, 2005). Právě dlouhodobý výzkum polytenních chromozomů činí z muchniček organismy, u nichž je genetika volně žijících populací velmi dobře probádána (Adler *et al.*, 2010). Kryptické druhy se mezi sebou mohou lišit schopností přenášet kožní filárie *Onchocerca volvulus*, proto je rozlišování jednotlivých druhů důležité (Post *et al.*, 2007).

Karyotyp většiny muchniček se skládá ze tří párů chromozomů ($2n=6$), nalezneme však i zástupce s pouze dvěma páry chromozomů jako je *Cnephia pallipes* (syn. *C. lapponica*) (Rothfels, 1979), u níž došlo k fúzi

druhého a třetího chromozomu (Procunier, 1982). Konvergentně došlo ke stejné fúzi i u *Simulium aureum* (Vlasov *et al.*, 2018). Existují i muchničky s karyotypem $3n=9$. Často se jedná o allotriploidy vzniklé křížením dvou příbuzných druhů. Dobrým příkladem jsou muchničky z rodu *Gymnopaia* v Severní Americe, u nichž dochází ke křížení druhů *G. dichopticus* a *G. holopticus*. Vznikají dva možní allotriploidní hybridy, kteří se liší počtem sad chromozomů od jednotlivých rodičovských druhů. Disponují dvěma sadami od *G. dichopticus* a jednou sadou od *G. holopticus*, nebo naopak (Rothfels, 1979).

Muchničky mají pohlaví určené pohlavními chromozomy XY. Ty nelze morfologicky odlišit – kterýkoliv ze tří párů chromozomů v karyotypu může sloužit jako pohlavní chromozom. Veškeré znalosti o chromozomovém určení pohlaví jsou založené na studiu polytenních chromozomů ze slinných (hedvábných) žláz larev. Pohlavní chromozomy se liší vzorem heterochromatinových bloků. Zajímavá situace nastává u muchničky *Cnephia lapponica*, kde fúzí druhého a třetího páru chromozomů vznikl karyotyp pouze s dvěma páry chromozomů. Jeden z těchto párů je tvořen pohlavními chromozomy X a Y. U většiny samců z Norska nese karyotyp translokaci mezi oběma páry, v důsledku čehož byl začleněn mezi pohlavní chromozomy také druhý pár chromozomů. Systém určení pohlaví u těchto samců je tedy $X_1X_2Y_1Y_2/X_1X_1X_2X_2$. Jedná se o neopohlavní chromozomy, karyotyp je tvořen jen pohlavními chromozomy (Procunier, 1982). Chromozom Y byly rovněž detekován v karyotypu samců *Simulium nigricoxum*. Jednotlivé populace se liší rozmístěním inverzí, což naznačuje nezávislé omezení rekombinace na chromozomu Y mezi populacemi (Adler *et al.*, 2016).



Obr. 6 - Meiotické párování chromozomů u samce muchničky *Cnephia lapponica* s přestavbou mezi prvním a druhým párem, metafáze I

Během metafáze I můžeme pozorovat křížový tetraivalent vznikající v důsledku přestavby mezi prvním a druhým párem chromozomů. Vpravo fotografie tetraivalentu, vlevo jeho schematický náčrt.

Upraveno a převzato z Procunier (1982).

Zcela odlišný systém byl popsán u jihoasijské muchničky *Simulium siamense*, kde heterogametickým pohlavím je samice, což odpovídá pohlavním chromozomům typu *Abraxas*. Chromozomy ZW u samic jsou však stejně homomorfní jako chromozomy XY u samců jiných muchniček (Kuvangkadilok *et al.*, 2008).

Základním rozdílem mezi chromozomy X a Y je přítomnost určitého samčího faktoru na chromozomu Y, jinak jsou tyto chromozomy vesměs homologní (Ottonen a Nambiar, 1969; Rothfels, 1956). Situaci navíc komplikuje fakt, že každý ze tří párů chromozomů u Simuliidae může vystupovat jako pohlavní u různých druhů (Bedo, 1977). Dobrým příkladem je druhový komplex *Eusimulium venum*, kde různé blízce si příbuzné druhy používají 5 z 6 možných ramen chromozomů pro umístění samčího lokusu (Brockhouse, 1985). To jasně nasvědčuje, že jako pohlavní chromozomy mohou fungovat různé chromozomy i u velmi blízce příbuzných druhů (Rothfels *et al.*, 1978).

4.6. Ceratopogonidae

Zástupci této čeledi jsou velmi drobní, obvykle tmavě zbarvení dlouhorozí dvoukřídlí. Některé druhy jsou vektory onemocnění hospodářských a divokých zvířat, častěji je však známe jako trapiče. Jejich larvy se vyvíjejí ve vlhkém prostředí nebo ve vodě a dospělci mohou být v určitých částech roku velmi hojní (Oosterbroek, 2006).

U všech doposud zkoumaných zástupců se diploidní karyotyp skládal ze tří párů chromozomů (Nunamaker *et al.*, 1996). První pár by měl být největší a třetí nejmenší, ale rozdíly jsou tak nepatrné, že je nelze použít pro rozlišení jednotlivých chromozomových párů. Jednotlivé páry byly odlišeny pomocí techniky multicolor FISH, a to na základě specifického vzoru vysoce repetitivní DNA (Nunamaker *et al.*, 1999, 1996). Stejný typ karyotypu byl popsán i u tiplíků *Culicoides nubeculosus*, *Nilobezzia brevicornis* a *Bezzia sp.* (Atchley a Jackson, 1968; Bell-Sakyi *et al.*, 2020).

Vzhledem k velmi podobné morfologii všech chromozomů v karyotypu nebylo možné odhalit gonozomy. Předpokládá se tedy určení pohlaví XY/XX s homomorfními pohlavními chromozomy X a Y, které jsou typické pro příbuzné čeledi. Pohlavní chromozomy se nepodařilo odhalit ani pomocí polytenních chromozomů, neboť polytenní chromozomy čeledi Ceratopogonidae nemají žádné oblasti heterochromatinu (s výjimkou centromery) (Urbanek *et al.*, 2013).

4.7. Bibionomorpha

Původně byly čeledi infrařádu Bibionomorpha řazeny do dvou skupin na základě jejich karyotypu a morfologie gonozomů. První skupina sdružuje zástupce, kteří postrádají chiasmata mezi pohlavními chromozomy u heterogametického pohlaví. Pohlavní chromozomy jsou heteromorfní, typu XY. Do této skupiny jsou řazeny čeledi Scatopsidae, Bibionidae a Mycetophilidae. Druhá skupina je typická absencí chromozomu Y a přítomností specifických chromozomů přítomných pouze v zárodečné linii buněk (White, 1949; Wiegmann *et al.*, 2011).

Apoliphisa subincana z čeledi Mycetophilidae má párující pohlavní chromozomy. Velký akrocentrický chromozom X páruje s drobným metacentrickým Y. K tomuto ději však dochází až po vzniku všech autozomálních bivalentů a párování je mnohem slabší – jedná se pouze o velmi krátkou homologní oblast, která navíc není u všech jedinců stejná. Pohlavní chromozomy některých jedinců párují centromerickou oblastí, zatímco jindy pouze raménky. Oba chromozomy jsou v době párování již zcela kondenzované. K vytvoření bivalentu nemusí dojít – 15 % metafázních jader spermatocytů bylo bez bivalentů gonozomů. Čtyři páry autozomů se chovají v meióze zcela standardně (Fahmy, 1949).

Druhá cytologická skupina Bibionomorpha sdružuje čeledi Sciaridae a Cecidomyiidae. Charakteristickým znakem této skupiny je určení samčího pohlaví eliminací jednoho nebo více chromozomů X během vývoje embrya (při oddělení somatické linie buněk). Obě čeledi navíc disponují chromozomy, které se objevují pouze v zárodečné linii buněk a před vznikem linie somatických buněk jsou eliminovány. U samců se během meiózy objevuje unipolární dělicí vřetenko (White, 1949).

Tyto čeledi lze charakterizovat systémem určení pohlaví X_0 v případě Sciaridae a X_1X_2O v případě Cecidomyiidae. Tento typ určení pohlaví je způsoben právě vyloučením X chromozomu v somatické dráze při rané embryogenezi. Stav X_0 , nebo případně X_1X_2O tedy můžeme pozorovat pouze v somatických buňkách, v zárodečné linii buněk obou pohlaví zůstává karyotyp XX u Sciaridae a $X_1X_1X_2X_2$ v případě Cecidomyiidae (Gerbi, 1986).

Pohlaví u obou čeledí určuje matka na základě vyloučení X chromozomů. Zajímavým úkazem je existence tzv. monogenních a digenních samic. Monogenní samice produkují potomstvo pouze jednoho pohlaví, zatímco digenní samice produkují potomstvo obou pohlaví. Jsou známé celé druhy nebo jen populace monogenních nebo digenních smutnic (Sciaridae) (Metz, 1931).

Během spermatogeneze jsou odstraněny samčí homology. Zůstávají pouze chromozomy zděděné od matky a oba X chromozomy, což má za následek, že rod *Sciara*, na němž studie proběhla, přenáší na potomstvo pouze maternální alely (Metz, 1928, 1927). Po oplození tak vzniká embryo se třemi chromozomy X, což ztěžuje vysvětlení systému určení pohlaví, protože takovýto karyotyp mají raná embryo obou pohlaví. Problém určení pohlaví osvětlil objev dlouhé paracentrické inverze na jednom z X chromozomů u samic. Na základě této inverze byl tento X chromozom klasifikován jako X'. Tato inverze určuje pohlaví – homozygotní samice produkují samce (arhenogenní samice), zatímco heterozygotní samice plodí pouze samice (thelygenní samice). Právě tento chromozom je velmi významný během procesu určení pohlaví, embryo obsahující X' chromozom eliminuje pouze jeden chromozom X ze somatických buněk a následně se vyvíjí jako samice. Samice mohou mít karyotyp somatických i zárodečných buněk X'X nebo XX. Thelygenní samice (X'X) plodí typicky pouze samičí potomstvo, přičemž dcery těchto samic jsou jak X'X, tak XX. Arhenogenní samice (XX) plodí typicky jen samčí potomstvo (Metz a Moses, 1928). Embrya X'XX podléhají eliminaci jednoho pohlavního chromozomu jak u somatické, tak u germinální buněčné linie. Velmi výjimečně může docházet k eliminaci dvou X chromozomů – může vzniknout samec. Velmi vzácní X'0 samci jsou obvykle sterilní. Pokud vznikne embryo pouze s třemi chromozomy X, obvykle je vyloučen jeden chromozom X ze zárodečné linie buněk a dva chromozomy X ze somatické linie, následně z nich vzniká samec (Gerbi, 1986; Metz a Schmuck, 1931). Byly popsány také případy chybného rozchodu a eliminací chromozomů, které vedly ke vzniku obou pohlaví v jedné snůšce (Reynolds, 1938).

Determinace pohlaví u Cecidomyiidae funguje rovněž na základě vyloučení X chromozomů. I zde nalzáme faktor, který způsobuje, že heterozygotní samice produkují jen samičí potomstvo, zatímco homozygotní samice pouze samčí. Určujícím faktorem je v tomto případě gen *Chromosome maintenance (Cm)*. Tento gen se vyskytuje ve třech podobách *Cma* (amorfní alela), *CmD* (dimorfní alela) a *CmL* (hypomorfní nebo neuplná alela). Samci a arhenogenní samice (plodí jen samčí potomstvo), nesou dvě *Cma*. Pokud se v zygotě sejdou právě dva *Cma* faktory, budou vyloučeny chromozomy X₁ a X₂, což povede k vývoji samce. Thelygenní samice nesou jednu kopii *CmD* nebo *CmD* a *Cma*, vzácně dokonce mohou nést dvě kopie *CmD* – v takovém případě plodí pouze samičí potomstvo. Thelygenní samice s genotypem *CmD Cma* produkují thelygenní a arhenogenní dcery v poměru 1:1 – tento fakt byl studován u *Mayetiola destructor*. Přítomnost *CmL* v samici způsobuje produkci potomstva obou pohlaví v závislosti na síle exprese. Jedno pohlaví však vždy převažuje (Stuart a Hatchett, 1991).

U *Mayetiola destructor* se gen pro *Cm* nalézá na chromozomovém páru č. 1. Tento pár je tedy významným faktorem pro určení pohlaví u tohoto druhu. Zajímavý je tím, že heterogametickým pohlavím pro tento pár jsou samice. Nejedná se však o neopohlavní chromozomy, jak uvádí autoři (ty vznikají přestavbami mezi gonozomy a autozomy), ale o nové, dosud velmi málo diferencované pohlavní chromozomy. Samičí verze A1 dokonce nese inverze, které zabraňují rekombinaci s verzí nesenou oběma pohlavími. Tento chromozom nesoucí inverze je označován jako A1'. Je možné, že vznik genu *Cm* umožnil také vznik arhenogenních a thelygenních samic u *M. destructor*. Chromozomy A1 a A1' jsou díky snížené rekombinaci na nejlepší cestě stát se chromozomy Z a W. (Benatti *et al.*, 2010).

Dalším zajímavým jevem u čeledi Cecidomyiidae je pedogeneze. Jedná se o proces, kdy již ve stadiu larvy dojde k vyloučení folikulu z vaječníku do haemocoelu, kde se následně vajíčko vyvíjí. Určení pohlaví těchto larev je značně obtížné vysvětlit, neboť existují larvy plodící pouze samce, pouze samice nebo dokonce obě pohlaví. Samčí vajíčka projdou během pedogeneze dvěma maturačními děleními, během nichž klesá počet chromozomů v zárodečné linii z 66 na 33 a v somatické linii na pouhých 5. U samic vzniklých pedogenezí v zárodečné linii zůstává 66 chromozomů a v somatické linii 10 chromozomů. Tento fakt naznačuje, že by se mohlo jednat o haplodiploidní systém. Proti tomu však mluví skutečnost, že imaginální embrya (embrya vyvíjející se ve vajíčkách nakladených dospělými samicemi) procházejí stejnou redukcí počtu chromozomů jako pedogenetičtí samci (Went *et al.*, 1972; Went a Camenzind, 1980).

Vajíčka pedogenetických druhů byla kultivovaná *in vitro* na mediu připraveném z hemolymfy larev plodící buď pouze samčí a samičí potomstvo. Tento pokus potvrdil, že právě složení hemolymfy ovlivňuje pohlaví potomstva během pedogeneze (Went, 1979).

Dalším zajímavým znakem známým u Sciaridae, Cecidomyiidae, ale rovněž i u pakomárů podčeledi Orthoclaadiinae, jsou nadbytečné chromozomy v zárodečné linii buněk. V somatické linii buněk jsou odstraněny již během embryogeneze. Jejich název (germinal restricted chromosomes, GRC) je odvozen právě od toho, že jsou omezeny jen na zárodečnou dráhu. Ve starší literatuře jsou označovány jako B (nadpočetné) chromozomy (White, 1949) nebo L chromozomy (limited) u čeledi Sciaridae (Gerbi, 1986) a E chromozomy (eliminated) u čeledi Cecidomyiidae (Geyer-Duszyńska, 1959). Pro Sciaridae je typický nízký počet GRC – 1 až 4 relativně velké chromozomy s významnými oblastmi euchromatinu. Cecidomyiidae mívají obvykle 10 až 67 těchto chromozomů. Jsou však daleko menší než ty, které nalézáme u Sciaridae. Vznik GRC není zatím zcela objasněn – mohly vzniknout polyploidizací nebo jako B chromozomy, jejich počty se mohou lišit velmi výrazně i v rámci jednoho druhu. Jejich úplná ztráta se projevuje vždy negativně (Hodson a Ross, 2021).

Tyto chromozomy neznámým způsobem ovlivňují určení pohlaví a mono/digenní systém, který můžeme pozorovat u Sciaridae a Cecidomyiidae. U *Bradysia impatiens*, drobné smutnice s určením pohlaví XO a 2-3 GRC, byly tyto chromozomy odstraněny ze zárodečné linie. Tento původně monogynní druh se tak stal digenním – postupně však se stále větší převahou samců. Až v poslední generaci přešel zpět na monogenní produkci pouze samců. Laboratorní kolonie však následně vymřela (Crouse *et al.*, 1971).

5. Závěr a diskuse

Tato práce shrnuje údaje o pohlavních chromozomech u dlouhorohých dvoukřídlých. Ze shrnutých dat vyplývá, že různé skupiny jsou probádány do různé hloubky. To je dáno jednak rozdílnou atraktivitou skupin a také rozdílnou atraktivitou jejich karyotypů. Skupiny považované za karyotypově uniformní nepřitahovaly takovou pozornost. To se však díky novým metodám výzkumu v budoucnu možná změní. Bohužel, ve srovnání s jinými řády, řád Diptera celkově nepřitahuje tak velkou pozornost. To je škoda, pokud přihlídneme nejen k obrovské diverzitě druhů a životních strategií, ale také k velkému vlivu, který má tento řád na lidskou populaci.

Dlouhorohé dvoukřídlé lze i dnes rozdělit do čtyř skupin, tak jak je definoval White ve své práci „Cytological evidence on the phylogeny and classification of the Diptera“ již v roce 1949. Do první patří Tipulidae a Trichoceridae – karyotypy samců obsahují drobné heteromorfní gonozomy systému XY, mezi nimiž jsou v meióze chiasmata. Čeleď Trichoceridae chiasmata mezi pohlavními chromozomy sekundárně ztratila. Druhá skupina sdružuje infrařády Culicomorpha a Psychodomorpha s homomorfními gonozomy. Samci třetí skupiny se vyznačují heteromorfními gonozomy bez chiasmata. Řadí se sem infrařád Bibionomorpha s výjimkou čeledi Sciaridae a Cecidomyiidae – ty tvoří čtvrtou skupinu. Pro čtvrtou skupinu je typický zánik chromozomu Y a specifické chromozomy přítomné pouze v zárodečné linii buněk, které jsou nazývány GRC, o jejichž původu je zatím známo velmi málo. Tyto skupiny nejspíš do určité míry kopírují fylogenezi, ač vztahy mezi jednotlivými skupinami lze jen obtížně odhadovat čistě na základě údajů o pohlavních chromozomech. Celkově jsou Whitem definované skupiny relativně uniformní – odchylkami jsou spíše jen jednotlivé druhy než celé rody. Odchylky celých čeledí jsou velmi vzácné. Jednou takovou odchylkou je čeleď Thaumaleidae, která byla na základě heteromorfních pohlavních chromozomů XY a absence chiasmata mezi těmito chromozomy řazena do infrařádu Bibionomorpha. Dnes na základě fylogeneze založené na mitochondriální a jaderné DNA víme, že patří do příbuzenstva komárů a muchniček, tedy čeledí s homomorfními pohlavními chromozomy. Právě u čeledí s homomorfními chromozomy jsou různé výjimky celkem četné.

Opakovaný vznik heteromorfních pohlavních chromozomů u skupin s původně homomorfními gonozomy otevřel diskusi o původní podobě pohlavních chromozomů u dvoukřídlých, neboť ve fylogenetickém stromu se objevují jak skupiny jak s heteromorfními, tak i s homomorfními pohlavními chromozomy. Starší publikace uvádějí jako původní podobu heteromorfní chromozomy XY, které nalézáme jak u skupin na bázi stromu, tak i u řady odvozených zástupců ze skupiny krátkorohých. Homomorfní chromozomy byly považovány za odvozené. V současnosti se stále častěji uvažuje homomorfní stav jako původní, což je dokládáno tím, že u různých skupin vznikly pohlavní chromozomy z různých Müllerových elementů. Tuto teorii podporují i některé moderní fylogeneze, které považují Culicomorpha za primitivní skupinu dlouhorohých. Rané cytogenetické práce předpokládaly vznik homomorfních chromozomů z heteromorfních – jako neopohlavní chromozomy nebo systém nových pohlavních chromozomů. Pravděpodobné však je, že heteromorfní pohlavní chromozomy vznikly z homomorfních – podobně, jako to můžeme pozorovat u skupin s primárně homomorfními gonozomy. Rekonstrukce evoluce pohlavních chromozomů je rovněž ztížena faktem, že primární faktory určení pohlaví vznikly u dvoukřídlých mnohokrát nezávisle na sobě, ač kaskáda určení pohlaví je dobře konzervovaná u všech Pancrustaceae. Geny určující pohlaví jsou navíc známy pouze u zlomku dvoukřídlých.

Znalost pohlavních chromozomů dvoukřídlých a s tím spojené výzkumy systému určení pohlaví jsou důležité, obzvláště u druhů s medicínským nebo ekonomickým významem. V případě medicínsky významných zástupců jsou vektory onemocnění hematofágní samice. Byly provedeny experimenty, kdy do genomu samičích zygot byl vnesen gen určující samčí pohlaví. To vedlo k vysoké mortalitě samičích embryí a larev. Pokud dosáhly dospělosti, nesly znaky jak samčí, tak samičí a jejich gonády byly deformované, intersexuální nebo zcela nevyvinuté. S těmito znalostmi by bylo možné vyvinout GMO samce, kteří jsou sterilní, nebo jejich potomstvo bude intersexuální. Tím by se snížil počet samic schopných být vektory onemocnění nebo produkovat potomstvo, které by potenciálně škodilo na hospodářských plodinách. Genetické modifikace vyvolávají řadu etických otázek. Výhodou této metody je, že ve srovnání s použitím insekticidů nebo specifických kmenů *Bacillus thuringiensis*, je možnost přesnějšího zacílení. Celkově tedy dochází k výrazně nižšímu dopadu na společenstvo.

Seznam literatury

- Abbott, J.K., Nordén, A.K., Hansson, B., 2017. Sex chromosome evolution: historical insights and future perspectives. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 284, 20162806. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2806>
- Adler, P.H., Currie, D.C., Wood, D.M., 2004. *The black flies (Simuliidae) of North America*. Comstock Pub. Associates, New York.
- Adler, P.H., Cheke, R.A., Post, R.J., 2010. Evolution, epidemiology, and population genetics of black flies (Diptera: Simuliidae). *Infect. Genet. Evol.* 10, 846–865. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2010.07.003>
- Adler, P.H., Yadamsuren, O., Procnier, W.S., 2016. Chromosomal Translocations in Black Flies (Diptera: Simuliidae)—Facilitators of Adaptive Radiation? *PLOS ONE* 11, e0158272. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158272>
- Atchley, W.R., Jackson, R.C., 1968. Techniques and Preliminary Studies on the Chromosomes of *Nilobezzia* and *Bezzia*. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 61, 1524–1527. <https://doi.org/10.1093/aesa/61.6.1524>
- Bauer, H., 1931. Die Chromosomen von *Tipula paludosa* Meig. in Eibildung und Spermatogenese. *Z. Für Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 14, 138–193. <https://doi.org/10.1007/BF00397319>
- Bedo, D.G., 1977. Cytogenetics and evolution of *Simulium ornatipes* skuse (Diptera: Simuliidae) I. Sibling speciation. *Chromosoma* 64, 37–65. <https://doi.org/10.1007/BF00292888>
- Bell-Sakyi, L., Mohd Jaafar, F., Monsion, B., Luu, L., Denison, E., Carpenter, S., Attoui, H., Mertens, P.P.C., 2020. Continuous Cell Lines from the European Biting Midge *Culicoides nubeculosus* (Meigen, 1830). *Microorganisms* 8, 825. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060825>
- Benatti, T.R., Valicente, F.H., Aggarwal, R., Zhao, C., Walling, J.G., Chen, M.-S., Cambron, S.E., Schemerhorn, B.J., Stuart, J.J., 2010. A Neo-Sex Chromosome That Drives Postzygotic Sex Determination in the Hessian Fly (*Mayetiola destructor*). *Genetics* 184, 769–777. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.108589>
- Berendes, H.D., 1966. Differential replication of male and female X-chromosomes in *Drosophila*. *Chromosoma* 20, 32–43. <https://doi.org/10.1007/BF00331896>
- Bopp, D., Saccone, G., Beye, M., 2014. Sex Determination in Insects: Variations on a Common Theme. *Sex. Dev.* 8, 20–28. <https://doi.org/10.1159/000356458>
- Brockhouse, C., 1985. Sibling species and sex chromosomes in *Eusimulium vernalis* (Diptera: Simuliidae). *Can. J. Zool.* 63, 2145–2161. <https://doi.org/10.1139/z85-316>
- Charlesworth, B., 1991. The Evolution of Sex Chromosomes. *Science* 251, 1030–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1998119>
- Charlesworth, B., Charlesworth, D., 2000. The degeneration of Y chromosomes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 355, 1563–1572. <https://doi.org/10.1098/rstb.2000.0717>
- Cho, S., Huang, Z.Y., Zhang, J., 2007. Sex-Specific Splicing of the Honeybee *doublesex* Gene Reveals 300 Million Years of Evolution at the Bottom of the Insect Sex-Determination Pathway. *Genetics* 177, 1733–1741. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.078980>
- Coschigano, K.T., Wensink, P.C., 1993. Sex-specific transcriptional regulation by the male and female *doublesex* proteins of *Drosophila*. *Genes Dev.* 7, 42–54. <https://doi.org/10.1101/gad.7.1.42>
- Criscione, F., Qi, Y., Saunders, R., Hall, B., Tu, Z., 2013. A unique Y gene in the Asian malaria mosquito *Anopheles stephensi* encodes a small lysine-rich protein and is transcribed at the onset of embryonic development: A unique Y gene in *Anopheles stephensi*. *Insect Mol. Biol.* 22, 433–441. <https://doi.org/10.1111/imb.12034>
- Criscione, F., Qi, Y., Tu, Z., 2016. GUY1 confers complete female lethality and is a strong candidate for a male-determining factor in *Anopheles stephensi*. *eLife* 5, e19281. <https://doi.org/10.7554/eLife.19281>

- Crouse, H.V., Brown, A., Mumford, B.C., 1971. L-chromosome inheritance and the problem of chromosome "imprinting" in *Sciara* (Sciaridae, Diptera). *Chromosoma* 34. <https://doi.org/10.1007/BF00286156>
- Davisson, M.T., Akeson, E.C., 1993. Recombination suppression by heterozygous Robertsonian chromosomes in the mouse. *Genetics* 133, 649–667. <https://doi.org/10.1093/genetics/133.3.649>
- Erickson, J.W., Cline, T.W., 1998. Key aspects of the primary sex determination mechanism are conserved across the genus *Drosophila*. *Dev. Camb. Engl.* 125, 3259–3268.
- Escovar, J., Ferro, C., Cárdenas, E., Bello, F., 2002. Comparación cariotípica de cinco especies de *Lutzomyia* (diptera: psychodidae) de la serie townsendi grupo verrucarum en Colombia. *Biomédica* 22, 499. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v22i4.1176>
- Fahmy, O.G., 1949. The mechanism of chromosome pairing during meiosis in male *Apoliphthisa subincana* (mycetophilidae, diptera). *J. Genet.* 49, 246–263. <https://doi.org/10.1007/BF02986079>
- Fontaine, A., Filipović, I., Fansiri, T., Hoffmann, A.A., Cheng, C., Kirkpatrick, M., Rašić, G., Lambrechts, L., 2017. Extensive Genetic Differentiation between Homomorphic Sex Chromosomes in the Mosquito Vector, *Aedes aegypti*. *Genome Biol. Evol.* 9, 2322–2335. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx171>
- Fuge, H., 1979. Synapsis, desynapsis, and formation of polycomplex-like aggregates in male meiosis of *Pales ferruginea* (diptera, tipulidae). *Chromosoma* 70, 353–373. <https://doi.org/10.1007/BF00328772>
- Gempe, T., Beye, M., 2011. Function and evolution of sex determination mechanisms, genes and pathways in insects. *BioEssays* 33, 52–60. <https://doi.org/10.1002/bies.201000043>
- Gerbi, S.A., 1986. Unusual Chromosome Movements in Sciarid Flies, in: Hennig, W. (Ed.), *Germ Line — Soma Differentiation, Results and Problems in Cell Differentiation*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 71–104. https://doi.org/10.1007/978-3-540-39838-7_2
- Geyer-Duszyńska, I., 1959. Experimental research on chromosome elimination in cecidomyiidae (Diptera). *J. Exp. Zool.* 141, 391–447. <https://doi.org/10.1002/jez.1401410302>
- Hall, A.B., Basu, S., Jiang, X., Qi, Y., Timoshevskiy, V.A., Biedler, J.K., Sharakhova, M.V., Elahi, R., Anderson, M.A.E., Chen, X.-G., Sharakhov, I.V., Adelman, Z.N., Tu, Z., 2015. A male-determining factor in the mosquito *Aedes aegypti*. *Science* 348, 1268–1270. <https://doi.org/10.1126/science.aaa2850>
- Harbach, R.E., Howard, T.M., 2009. Review of the genus *Chagasia* (Diptera: Culicidae: Anophelinae). *Zootaxa* 2210, 1–25. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2210.1.1>
- Heming, B., 2006. The Evolutionary Biology of Flies. *BioScience* 56, 354. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2006\)56\[354:DFHATA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2006)56[354:DFHATA]2.0.CO;2)
- Hodson, C.N., Ross, L., 2021. Evolutionary Perspectives on Germline-Restricted Chromosomes in Flies (Diptera). *Genome Biol. Evol.* 13, evab072. <https://doi.org/10.1093/gbe/evab072>
- Holt, R.A., Subramanian, G.M., Halpern, A., Sutton, G.G., Charlab, R., Nusskern, D.R., Wincker, P., Clark, A.G., Ribeiro, JoséM.C., Wides, R., Salzberg, S.L., Loftus, B., Yandell, M., Majoros, W.H., Rusch, D.B., Lai, Z., Kraft, C.L., Abril, J.F., Anthouard, V., Arensburger, P., Atkinson, P.W., Baden, H., de Berardinis, V., Baldwin, D., Benes, V., Biedler, J., Blass, C., Bolanos, R., Boscus, D., Barnstead, M., Cai, S., Center, A., Chatuverdi, K., Christophides, G.K., Chrystal, M.A., Clamp, M., Cravchik, A., Curwen, V., Dana, A., Delcher, A., Dew, I., Evans, C.A., Flanigan, M., Grundschober-Freimoser, A., Friedli, L., Gu, Z., Guan, P., Guigo, R., Hillenmeyer, M.E., Hladun, S.L., Hogan, J.R., Hong, Y.S., Hoover, J., Jaillon, O., Ke, Z., Kodira, C., Kokoza, E., Koutsos, A., Letunic, I., Levitsky, A., Liang, Y., Lin, J.-J., Lobo, N.F., Lopez, J.R., Malek, J.A., McIntosh, T.C., Meister, S., Miller, J., Mobarry, C., Mongin, E., Murphy, S.D., O’Brochta, D.A., Pfannkoch, C., Qi, R., Regier, M.A., Remington, K., Shao, H., Sharakhova, M.V., Sitter, C.D., Shetty, J., Smith, T.J., Strong, R., Sun, J., Thomasova, D., Ton, L.Q., Topalis, P., Tu, Z., Unger, M.F., Walenz, B., Wang, A., Wang, J., Wang, M., Wang, X., Woodford, K.J., Wortman, J.R., Wu, M., Yao, A., Zdobnov, E.M., Zhang, H., Zhao, Q., Zhao, S., Zhu,

- S.C., Zhimulev, I., Coluzzi, M., della Torre, A., Roth, C.W., Louis, C., Kalush, F., Mural, R.J., Myers, E.W., Adams, M.D., Smith, H.O., Broder, S., Gardner, M.J., Fraser, C.M., Birney, E., Bork, P., Brey, P.T., Venter, J.C., Weissenbach, J., Kafatos, F.C., Collins, F.H., Hoffman, S.L., 2002. The Genome Sequence of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298, 129–149. <https://doi.org/10.1126/science.1076181>
- Jiménez, M.E., Bello, F.J., Ferro, C., Cárdenas, E., 2001. Brain cell karyotype of the phlebotomine sand fly *Lutzomyia shannoni* (Dyar) (Diptera: Psychodidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 379–380. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762001000300016>
- John, B., 1957. XY Segregation in the crane fly *Tipula maxima* (Diptera: Tipulidæ). *Heredity* 11, 209–215. <https://doi.org/10.1038/hdy.1957.18>
- Kang, Z., Zhang, X., Ding, S., Tang, C., Wang, Y., Jong, H. de, Cameron, S.L., Wang, M., Yang, D., 2017. Transcriptomes of three species of Tipuloidea (Diptera, Tipulomorpha) and implications for phylogeny of Tipulomorpha. *PLOS ONE* 12, e0173207. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173207>
- Karmokov, M., Akkizov, A.Y., 2016. Karyotype characteristics, larval morphology and chromosomal polymorphism peculiarities of *Glyptotendipes salinus* Michailova, 1983 (Diptera, Chironomidae) from Tambukan Lake, Central Caucasus. *Comp. Cytogenet.* 10, 571–585. <https://doi.org/10.3897/compcytogen.v10i4.9400>
- Kato, Y., Kobayashi, K., Watanabe, H., Iguchi, T., 2011. Environmental Sex Determination in the Branchiopod Crustacean *Daphnia magna*: Deep Conservation of a *Doublesex* Gene in the Sex-Determining Pathway. *PLoS Genet.* 7, e1001345. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001345>
- Koerich, L.B., Wang, X., Clark, A.G., Carvalho, A.B., 2008. Low conservation of gene content in the *Drosophila* Y chromosome. *Nature* 456, 949–951. <https://doi.org/10.1038/nature07463>
- Kreutzer, R.D., Modi, G.B., Tesh, R.B., Young, D.G., 1987. Brain Cell Karyotypes of Six Species of New and Old World Sand Flies (Diptera: Psychodidae). *J. Med. Entomol.* 24, 609–612. <https://doi.org/10.1093/jmedent/24.6.609>
- Kreutzer, R.D., Morales, A., Cura, E., Ferro, C., Young, D.G., 1988. Brain cell karyotypes of six new world sand flies (Diptera: Psychodidae). *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 4, 453–455.
- Krzywinska, E., Dennison, N.J., Lycett, G.J., Krzywinski, J., 2016. A maleness gene in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 353, 67–69. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5605>
- Krzywinska, E., Krzywinski, J., 2018. Effects of stable ectopic expression of the primary sex determination gene *Yob* in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Parasit. Vectors* 11, 648. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3211-z>
- Krzywinska, E., Ferretti, L., Li, J., Li, J.-C., Chen, C.-H., Krzywinski, J., 2021. *femaleless* Controls Sex Determination and Dosage Compensation Pathways in Females of *Anopheles* Mosquitoes. *Curr. Biol.* 31, 1084–1091.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.12.014>
- Kuvangkadilok, C., Lualon, U., Baimai, V., 2008. Cytotaxonomy of *Simulium siamense* Takaoka and Suzuki (Diptera: Simuliidae) in Thailand. *Genome* 51, 972–987. <https://doi.org/10.1139/G08-082>
- Kyrou, K., Hammond, A.M., Galizi, R., Kranjc, N., Burt, A., Beaghton, A.K., Nolan, T., Crisanti, A., 2018. A CRISPR–Cas9 gene drive targeting *doublesex* causes complete population suppression in caged *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Nat. Biotechnol.* 36, 1062–1066. <https://doi.org/10.1038/nbt.4245>
- Lahn, B.T., Page, D.C., 1999. Four Evolutionary Strata on the Human X Chromosome. *Science* 286, 964–967. <https://doi.org/10.1126/science.286.5441.964>
- Merritt, R.W., 2005. The black flies (Simuliidae) of North America. *J. North Am. Benthol. Soc.* 24, 442–444. [https://doi.org/10.1899/0887-3593\(2005\)24\[442:BR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1899/0887-3593(2005)24[442:BR]2.0.CO;2)

- Metz, C.W., 1927. Chromosome behavior and genetic behavior in *Sciara* (Diptera): II. Genetic evidence of selective segregation in *S. coprophila* Lint. Z. Für Indukt. Abstamm.- Vererbungslehre 45, 184–200. <https://doi.org/10.1007/BF01847027>
- Metz, C.W., 1928. Genetic Evidence of a Selective Segregation of Chromosomes in a Second Species of *Sciara* (Diptera). Proc. Natl. Acad. Sci. 14, 140–141. <https://doi.org/10.1073/pnas.14.2.140>
- Metz, C.W., Moses, M.S., 1928. Observations on Sex-Ratio Determination in *Sciara* (Diptera). Proc. Natl. Acad. Sci. 14, 930–932. <https://doi.org/10.1073/pnas.14.12.930>
- Metz, C.W., 1931. Unisexual Progenies and Sex Determination in *Sciara*. Q. Rev. Biol. 6, 306–312. <https://doi.org/10.1086/394382>
- Metz, C.W., Schmuck, M.L., 1931. STUDIES ON SEX DETERMINATION AND THE SEX CHROMOSOME MECHANISM IN *SCIARA*. Genetics 16, 225–253. <https://doi.org/10.1093/genetics/16.3.225>
- Michailova, P., Belcheva, R., 1982. Localization of the constitutive heterochromatin in chromosomes of *Orthocladius bipunctellus* Zett., 1850 and *Cryptochironomus fridmanae* Tshernovskij, 1949 (Diptera, Chironomidae). Cytologia (Tokyo) 47, 489–497. <https://doi.org/10.1508/cytologia.47.489>
- Michailova, P., 1984. Cytotaxonomic features of species of the subfamily Orthoclaadiinae (Diptera, Chironomidae) from Bulgaria. Genetica 52–53, 263–266. <https://doi.org/10.1007/BF00121835>
- Michailova, P.V.L., Ferrington, L.C., 1992. The karyotype of *Axarus festivus* (Say) and a comparison with species of *Lipiniella* (Chironomidae: Diptera). Neth. J. Aquat. Ecol. 26, 181–185. <https://doi.org/10.1007/BF02255239>
- Michailova, P., Warchałowska-Sliwa, E., Kownacki, A., 2001. Cytotaxonomic characteristics of the genus *Glyptotendipes* Kieffer (Chironomidae, Diptera) from fish and retention ponds (Silesia, southern Poland). Folia Biol. (Praha) 49, 163–173.
- Nunamaker, R.A., Brown, S.E., Knudson, D.L., 1996. Metaphase Chromosomes of *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). J. Med. Entomol. 33, 871–873. <https://doi.org/10.1093/jmedent/33.5.871>
- Nunamaker, R.A., Brown, S.E., Knudson, D.L., 1999. Fluorescence In Situ Hybridization Landmarks for Chromosomes of *Culicoides variipennis* (Diptera: Ceratopogonidae). J. Med. Entomol. 36, 171–175. <https://doi.org/10.1093/jmedent/36.2.171>
- Ohno, S., 1967. Sex Chromosomes and Sex-Linked Genes, Monographs on Endocrinology. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-88178-7>
- Oosterbroek, P., 2006. The European Families of the Diptera: Identification - Diagnosis - Biology. KNNV Publishing. <https://doi.org/10.1163/9789004278066>
- Ottonen, P.O., Nambiar, R., 1969. The salivary gland chromosomes of *Prosimulium multidentatum* Twinn and three forms included in *Prosimulium magnum* (Dyar and Shannon) (Diptera: Simuliidae). Can. J. Zool. 47, 943–949. <https://doi.org/10.1139/z69-154>
- Petrella, V., Aceto, S., Colonna, V., Saccone, G., Sanges, R., Polanska, N., Volf, P., Gradoni, L., Bongiorno, G., Salvemini, M., 2019. Identification of sex determination genes and their evolution in Phlebotominae sand flies (Diptera, Nematocera). BMC Genomics 20, 522. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5898-4>
- Petrova, N.A., 1984. Karyological research of Orthoclaadiinae (Diptera, Chironomidae). Genetica 52–53, 275–279. <https://doi.org/10.1007/BF00121837>
- Petrova, N.A., Michailova, P.V., Bovero, S., Sella, G., 2013. Karyotypes of four species of chironomids (Diptera, Chironomidae) from Northern Italy. Cell Tissue Biol. 7, 465–471. <https://doi.org/10.1134/S1990519X13050088>
- Petrova, N.A., Zhironov, S.V., 2014. Characteristics of the Karyotypes of three subfamilies of chironomids (Diptera, Chironomidae: Tanypodinae, Diamesinae, Prodiamesinae) of the world fauna. Entomol. Rev. 94, 157–165. <https://doi.org/10.1134/S001387381402002X>

- Porter, D.L., Martin, J., 1977. The Cytology of *Polypedilum nubifer* (Diptera: Chironomidae). *Caryologia* 30, 41–62. <https://doi.org/10.1080/00087114.1977.10796680>
- Post, R.J., Mustapha, M., Krueger, A., 2007. Taxonomy and inventory of the cytospecies and cytotypes of the *Simulium damnosum* complex (Diptera: Simuliidae) in relation to onchocerciasis: The *Simulium damnosum* complex. *Trop. Med. Int. Health* 12, 1342–1353. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2007.01921.x>
- Price, D.C., Egizi, A., Fonseca, D.M., 2015. Characterization of the *doublesex* gene within the *Culex pipiens* complex suggests regulatory plasticity at the base of the mosquito sex determination cascade. *BMC Evol. Biol.* 15, 108. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0386-1>
- Procnier, W.S., 1982. A cytological study of species in *Cnephia* s. str. (Diptera: Simuliidae). *Can. J. Zool.* 60, 2866–2878. <https://doi.org/10.1139/z82-365>
- Rai, K.S., 1963. A Comparative Study of Mosquito Karyotypes1. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 56, 160–170. <https://doi.org/10.1093/aesa/56.2.160>
- Rao, P.N., Rai, K.S., 1987. Comparative Karyotypes and Chromosomal Evolution in Some Genera of Nematoceros (Diptera: Nematocera) Families1. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 80, 321–332. <https://doi.org/10.1093/aesa/80.3.321>
- Rappold, G., Willson, T.A., Henke, A., Gough, N.M., 1992. Arrangement and localization of the human GM-CSF receptor α chain gene CSF2RA within the X-Y pseudoautosomal region. *Genomics* 14, 455–461. [https://doi.org/10.1016/S0888-7543\(05\)80241-1](https://doi.org/10.1016/S0888-7543(05)80241-1)
- Reynolds, J.P., 1938. Sex Determination in a “Bisexual” Strain of *Sciara coprophila*. *Genetics* 23, 203–220. <https://doi.org/10.1093/genetics/23.2.203>
- Rice, W.R., 1987. The Accumulation of Sexually Antagonistic Genes as a Selective Agent Promoting the Evolution of Reduced Recombination between Primitive Sex Chromosomes. *Evolution* 41, 911. <https://doi.org/10.2307/2408899>
- Rothfels, K.H., 1956. BLACK FLIES: SIBLINGS, SEX, AND SPECIES GROUPING. *J. Hered.* 47, 113–122. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a106618>
- Rothfels, K., Feraday, R., Kaneps, A., 1978. A cytological description of sibling species of *Simulium venustum* and *S. verecundum* with standard maps for the subgenus *Simulium* Davies (Diptera). *Can. J. Zool.* 56, 1110–1128. <https://doi.org/10.1139/z78-155>
- Rothfels, K.H., 1979. Cytotaxonomy of Black Flies (Simuliidae). *Annu. Rev. Entomol.* 24, 507–539. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.24.010179.002451>
- Salvemini, M., Mauro, U., Lombardo, F., Milano, A., Zazzaro, V., Arcà, B., Polito, L.C., Saccone, G., 2011. Genomic organization and splicing evolution of the *doublesex* gene, a *Drosophila* regulator of sexual differentiation, in the dengue and yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *BMC Evol. Biol.* 11, 41. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-41>
- Sanchez, L., 2008. Sex-determining mechanisms in insects. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 837–856. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072396ls>
- Scali, C., 2005. Identification of sex-specific transcripts of the *Anopheles gambiae doublesex* gene. *J. Exp. Biol.* 208, 3701–3709. <https://doi.org/10.1242/jeb.01819>
- Scholtz, C.H., 2018. Manual of Afrotropical Diptera, Vol. 1. Introductory chapters and keys to Diptera families / Manual of Afrotropical Diptera, Vol. 2. Nematoceros Diptera and lower Brachycera. *Trans. R. Soc. South Afr.* 73, 209–210. <https://doi.org/10.1080/0035919X.2018.1449770>
- Schutt, C., Nothiger, R., 2000. Structure, function and evolution of sex-determining systems in Dipteran insects. *Development* 127, 667–677. <https://doi.org/10.1242/dev.127.4.667>
- Shilova, A.I., Kerkis, I.E., Kiknadze, I.I., 1992. *Lipiniella prima* sp.nov. (Diptera, Chironomidae), larva and karyotype. *Neth. J. Aquat. Ecol.* 26, 197–201. <https://doi.org/10.1007/BF02255242>

- Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., Minx, P.J., Cordum, H.S., Hillier, L., Brown, L.G., Repping, S., Pyntikova, T., Ali, J., Bieri, T., Chinwalla, A., Delehaunty, A., Delehaunty, K., Du, H., Fewell, G., Fulton, L., Fulton, R., Graves, T., Hou, S.-F., Latrielle, P., Leonard, S., Mardis, E., Maupin, R., McPherson, J., Miner, T., Nash, W., Nguyen, C., Ozersky, P., Pepin, K., Rock, S., Rohlfling, T., Scott, K., Schultz, B., Strong, C., Tin-Wollam, A., Yang, S.-P., Waterston, R.H., Wilson, R.K., Rozen, S., Page, D.C., 2003. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423, 825–837. <https://doi.org/10.1038/nature01722>
- Song, F., Li, H., Jiang, P., Zhou, X., Liu, J., Sun, C., Vogler, A.P., Cai, W., 2016. Capturing the Phylogeny of Holometabola with Mitochondrial Genome Data and Bayesian Site-Heterogeneous Mixture Models. *Genome Biol. Evol.* 8, 1411–1426. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw086>
- Spironello, M., Hunter, F.F., 2005. Polytene chromosomes of an archipelagic subgenus, *Inseliellum* (Diptera: Simuliidae). *Genetica* 123, 217–226. <https://doi.org/10.1007/s10709-004-2282-2>
- Stuart, J.J., Hatchett, J.H., 1991. Genetics of Sex Determination in the Hessian Fly, *Mayetiola destructor*. *J. Hered.* 82, 43–52. <https://doi.org/10.1093/jhered/82.1.43>
- Suzuki, M.G., Ohbayashi, F., Mita, K., Shimada, T., 2001. The mechanism of sex-specific splicing at the *doublesex* gene is different between *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 1201–1211. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00067-4](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00067-4)
- Toups, M.A., Hahn, M.W., 2010. Retrogenes Reveal the Direction of Sex-Chromosome Evolution in Mosquitoes. *Genetics* 186, 763–766. <https://doi.org/10.1534/genetics.110.118794>
- Troiano, G., 1977. Chromosome Studies in *Pericoma modesta* Tonnoir (Diptera: Psychodidae). *Caryologia* 30, 27–39. <https://doi.org/10.1080/00087114.1977.10796679>
- Troiano, G., 1981. Karyotype and meiosis in the male of the moth-fly *Satchelliella nubila* (Meigen) (Diptera: Psychodidae). *Genetica* 57, 75–80. <https://doi.org/10.1007/BF00057544>
- Troiano, Giorgio, 1981. Studies of Karyotype and Male Meiosis in Three Species of Subfamily Psychodinae (Diptera: Psychodidae). *Caryologia* 34, 197–206. <https://doi.org/10.1080/00087114.1981.10796884>
- Troiano, G., 1988. Heterozygous Heterochromatin in Giemsa C-Banded Chromosomes of *Clogmia Albipunctata* (*Telmatoscopus Albipunctatus*) (Diptera: Psychodidae). *Caryologia* 41, 201–208. <https://doi.org/10.1080/00087114.1988.10797861>
- Ullerich, F.-H., Bauer, H., Dietz, R., 1964. Geschlechtsbestimmung bei tipuliden. *Chromosoma* 15, 591–605. <https://doi.org/10.1007/BF00319993>
- Urbanek, A., Szadziewski, R., Giłka, W., Borkent, A., 2013. First Description of Polytene Chromosomes in Biting Midges (Diptera: Ceratopogonidae). *J. Med. Entomol.* 50, 458–461. <https://doi.org/10.1603/ME12059>
- Verhulst, E.C., van de Zande, L., 2014. Insect Sex Determination: A Cascade of Mechanisms. *Sex. Dev.* 8, 5–6. <https://doi.org/10.1159/000358405>
- Vicoso, B., Bachtrog, D., 2015. Numerous Transitions of Sex Chromosomes in Diptera. *PLOS Biol.* 13, e1002078. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002078>
- Vigoder, F.M., Araripe, L.O., Carvalho, A.B., 2021. Identification of the sex chromosome system in a sand fly species, *Lutzomyia longipalpis* s.l. *G3 GenesGenomesGenetics* 11, jkab217. <https://doi.org/10.1093/g3journal/jkab217>
- Vlasov, S., Adler, P.H., Topolenko, V., Aibulatov, S., Gorlov, I., Harutyunova, M., Harutyunova, K., 2018. Karyotypic Characteristics of the Ornithophilic *Simulium aureum* Species Group (Diptera: Simuliidae) Along the Northern Black Sea Coast and the Origin of Chromosomal Reduction. *J. Med. Entomol.* <https://doi.org/10.1093/jme/tjy070>
- Went, D.F., Würigler, F.E., Ulrich, H., 1972. The karyotype of males and females of *Heteropeza pygmaea*: a radiobiological study. *Arch. Genet. (Zur.)* 45, 181–187.

- Went, D.F., 1979. Paedogenesis in the dipteran insect *Heteropeza pygmaea*: an interpretation. *Int. J. Invertebr. Reprod.* 1, 21–30. <https://doi.org/10.1080/01651269.1979.10553296>
- Went, D.F., Camenzind, R., 1980. Sex determination in the Dipteran insect *Heteropeza pygmaea*. *Genetica* 52–53, 373–377. <https://doi.org/10.1007/BF00121846>
- White, M.J.D., 1949. CYTOLOGICAL EVIDENCE ON THE PHYLOGENY AND CLASSIFICATION OF THE DIPTERA. *Evolution* 3, 252–261. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1949.tb00025.x>
- Wiegmann, B.M., Trautwein, M.D., Winkler, I.S., Barr, N.B., Kim, J.-W., Lambkin, C., Bertone, M.A., Cassel, B.K., Bayless, K.M., Heimberg, A.M., Wheeler, B.M., Peterson, K.J., Pape, T., Sinclair, B.J., Skevington, J.H., Blagoderov, V., Caravas, J., Kutty, S.N., Schmidt-Ott, U., Kampmeier, G.E., Thompson, F.C., Grimaldi, D.A., Beckenbach, A.T., Courtney, G.W., Friedrich, M., Meier, R., Yeates, D.K., 2011. Episodic radiations in the fly tree of life. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 5690–5695. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012675108>
- Zhang, X., Kang, Z., Ding, S., Wang, Y., Borkent, C., Saigusa, T., Yang, D., 2019. Mitochondrial Genomes Provide Insights into the Phylogeny of Culicomorpha (Insecta: Diptera). *Int. J. Mol. Sci.* 20, 747. <https://doi.org/10.3390/ijms20030747>