

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta životního prostředí

Katedra aplikované ekologie



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

Bakalářská práce

**Stanovení velikosti genomu u vybraných skupin
hmyzu (Insecta: Mantodea, Phasmatodea)**

Genome size of selected group in Insects
(Insecta: Mantodea, Phasmatodea)

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Hana Šípková, Ph.D.

Bakalant: František Difko

© 2021 ČZU v Praze

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

František Difko

Environmentální vědy
Aplikovaná ekologie

Název práce

Stanovení velikosti genomu u vybraných skupin hmyzu (Insecta: Phasmatodea, Mantodea)

Název anglicky

Genome size of selected group in Insects (Insecta: Phasmatodea, Mantodea)

Cíle práce

Cílem práce bude analýza absolutní velikosti genomu vybraných zástupců z řádu Phasmatodea a Mantodea (Insecta) s přihlédnutím k jejich odlišným ekologickým vlastnostem. Součástí práce bude i literární rešerše dosud publikovaných prací zabývajících se problematikou ekologických vlastností dané skupiny a velikosti genomu jako druhově specifického parametru.

Metodika

V rešeršní části práce autor podá na základě literárních zdrojů přehled dosavadních znalostí o ekologii vybrané modelové skupiny a o velikosti genomu jako parametru, který může být odlišnou ekologií ovlivněn. V praktické části provede měření absolutní velikosti genomu vybraných zástupců dvoustupňovou metodikou dle Otto 1990 (Doležel et al. 2007) s využitím průtokové cytometrie a propidium iodidu jako fluorescenčního barviva. Získaná data statisticky zpracuje (zhodnocení mezidruhových rozdílů pomocí ANOVy, Tukyho testu, boxplotů s přihlédnutím k ekologickým vlastnostem) a vhodně diskutuje výsledky s ohledem na publikované práce.

Doporučený rozsah práce

cca 30 stran

Klíčová slova

genom, Insecta, strašilky, pakobylky, kudlanky

Doporučené zdroje informací

Gregory T.R., 2011: Animal genome size database. <http://www.genomesize.com>

Hanrahan S.J., Johnston J.S., 2011: New genome size estimates of 134 species of arthropods. *Chromosome Res.*, 19: 809-823.

Kraaijeveld K., 2010: Genome size and species diversification. *Evolutionary Biol.*, 37:227–233

Předběžný termín obhajoby

2020/21 LS – FŽP

Vedoucí práce

Ing. Hana Šípková, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie

Konzultant

mgr. Petr Vít, Ph.D.

Elektronicky schváleno dne 10. 3. 2020

doc. Ing. Jiří Vojar, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 10. 3. 2020

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 30. 03. 2021

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: Stanovení velikosti genomu u vybraných skupin hmyzu (Insecta: Mantodea, Phasmatodea) vypracoval samostatně a citoval jsem všechny informační zdroje, které jsem v práci použil a které jsem rovněž uvedl na konci práce v seznamu použitých informačních zdrojů. Jsem si vědom, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, především ustanovení §35 odst. 3 tohoto zákona, tj. o užití tohoto díla. Jsem si vědom, že odevzdáním bakalářské práce souhlasím s jejím zveřejněním podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a to i bez ohledu na výsledek její obhajoby. Svým podpisem rovněž prohlašuji, že elektronická verze práce je totožná s verzí tištěnou a že s údaji uvedenými v práci bylo nakládáno v souvislosti s GDPR.

V Praze dne _____

František Difko

Poděkování

Rád bych touto cestou vyjádřil poděkování Ing. Haně Šípkové, Ph.D, za odborné vedení práce a za podporu a trpělivost při jejím vytváření. Děkuji také Veronice Uhrincatové za poskytnutí podkladů a materiálů k tomuto tématu se vztahujících. V neposlední řadě patří obrovské poděkování mé rodině, bez které bych tuto práci nemohl dokončit.

Stanovení velikosti genomu u vybraných skupin hmyzu (Insecta: Mantodea, Phasmatodea)

Abstrakt

Velikost genomu je znakem organismu, a to napříč všemi eukaryotickými organismy. Vedle schopnosti pomoci s pochopením evolučních procesů hraje i významnou roli například pro taxonomy. Při mnoha studiích rozličných skupin byla důležitost znalosti velikosti genomu zvyrazňována právě coby užitečný taxonomický znak. Samotnou velikost genomu u jednotlivých druhů může ovlivnit mnoho faktorů jako např. pohlaví, původ, vývoj či velikost jedinců. Tato práce se zaměřuje na analýzu velikosti genomu u dvou vybraných řádů z třídy hmyzu s přihlédnutím k jejich rozličným ekologickým vlastnostem. Konkrétně se jedná o řády Mantodea a Phasmatodea. Velikost genomu je měřena pomocí průtokové cytometrie. Tato moderní metoda se využívá hlavně na výzkum lidských, rostlinných a živočišných buněk. U dravých jedinců z řádu Mantodea se hodnoty velikosti genomu pohybovaly od $2C = 4,89$ pg po $2C = 13,45$ pg. Naproti tomu se u herbivorního řádu Phasmatodea hodnoty pohybovaly od $2C = 1,29$ pg po $2C = 19,32$ pg. Celkově byla pomocí práce tedy zjištěna velikost genomu dohromady u 47 jedinců. Naměřené hodnoty velikosti genomů sahaly od $2C = 1,29$ pg až po $2C = 19,32$ pg. Na základě dosažených výsledků můžeme tedy předpokládat, že velikost genomu některých druhů souvisí s velikostí jedinců, jejich zbarvením, pohlavím či původem.

Klíčová slova: genom, velikost genomu, Insecta, strašilky, pakobylky, kudlanky, průtoková cytometrie

Genome size of selected group in Insects (Insecta: Mantodea, Phasmatodea)

Abstract

Genome size is a hallmark of an organism across all eukaryotic organisms. In addition to the ability to help with understand evolutionary processes, it also plays an important role for taxonomists, for example. In many studies of different groups, the importance of knowing the size of the genome has been emphasized as a useful taxonomic character. The size of the genome of individual species can be affected by many factors such as sex, origin, evolution or size of individuals. This work focuses on the analysis of the genome size of two selected orders of the insect class, taking into account their different ecological properties. In particular, these are orders of Mantodea and Phasmatodea. Genome size is measured by flow cytometry. This modern method is mainly used for the research of human, plant and animal cells. Genom size values of Matodea predator individuals ranged from $2C = 4,89$ pg to $2C = 13,45$ pg. On the other side, values for the order of Phasmatodea herbivores ranged from $2C = 1,29$ pg to $2C = 19,32$ pg. In total, the size of the genome was determined for 47 individuals.

The measured values of genome sizes ranged from $2C = 1,29$ pg to $2C = 19,32$ pg. Based on the results, we can assume that the size of the genome of some species is related to the size of individuals, their color, sex and origin.

Keywords: genome, genome size, Insecta, Mantodea, Phasmatodea, Flow cytometry

Obsah

1 Úvod	1
2 Cíl práce	1
3 Řád Mantodea	2
3.1 Historie řádu.....	3
3.2 Taxonomie.....	3
3.3 Morfologie.....	4
3.4 Ekologické vlastnosti zkoumaných jedinců.....	6
4 Řád Phasmatodea	11
4.1 Historie řádu.....	12
4.2 Taxonomie.....	12
4.3 Morfologie.....	13
4.4 Ekologické vlastnosti zkoumaných jedinců.....	14
5 Průtokový cytometr	20
5.1 Princip metody.....	20
5.2 Výhody a nevýhody.....	20
5.3 Komponenty.....	21
5.3.1 Fluidní systém.....	22
5.3.2 Optický systém.....	22
5.3.3 Elektronický systém.....	23
5.4 Standardy a barviva.....	23
5.4.1 Standardy.....	23
5.4.2 Barviva.....	24
5.5 Využití.....	25
5.5.1 Stanovení velikosti genomu.....	25
6 Metodika	27
6.1 Získání hmyzího materiálu.....	27
6.2 Příprava analyzovaných vzorků.....	27
6.3 Příprava barviva.....	28
6.4 Analýza dat.....	29
6.4.1 Nastavení parametrů.....	29
6.4.2 Vyhodnocení výsledků.....	30
6.4.3 Výpočet velikosti genomu.....	30
6.5 Statistické zpracování výsledků.....	31
7 Výsledky	32
7.1 Řád Mantodea.....	32

7.2	Řád Phasmatodea.....	35
7.3	Porovnání obou řádů.....	40
8	Diskuse.....	42
9	Závěr.....	45
10	Použitá literatura.....	46
11	Přílohy.....	53

1 Úvod

Průtoková cytometrie (flow cytometry) je moderní a rychle se rozvíjející metoda používaná k detekci a měření fyzikálních (optických) a chemických (fluorescenčních) vlastností buněk nebo částic v suspenzi (Picot et al., 2012; Roubalová, 2019). Od vzniku v 50. letech 20. století našla široké uplatnění v mnoha oborech. Využívá se pro třídění částic či buněk (jádra, chromozomy) a jejich následnou analýzu. Dnešní moderní přístroje umožňují kvalitativní a kvantitativní analýzu několika parametrů najednou, a to až rychlostí 100 000 částic za sekundu (Adan et al., 2016; Preffer, Dombkowski, 2009).

Tato metoda má uplatnění v mnoha oblastech, včetně molekulární biologie, patologie, imunologie, virologie (Zamora, Aguilar, 2018), rostlinné a mořské biologie (Murphy et al., 1997). Také v medicíně je velmi populární, a to zejména v transplantacích, hematologii, embryologii, imunologii nádorů, chemoterapii, genetice či veterinární medicíně (Brown a Wittwer, 2000; Givan, 2001). Konkrétně v biologických oborech se využívá ke stanovení obsahu jaderné DNA, analýze buněk a jejich cyklu, detekci mikroorganismů. Ke studiu hmyzu však není tato metoda doposud dostatečně využívána. Překvapivě existuje jen malý počet studií, které se zabývají tématem velikosti genomu u vybraných skupin hmyzu, ačkoliv tato metoda skýtá mnohé výhody oproti jiným. Jednou z mála výhod je velká přesnost měření, nenáročnost ovládání a poměrně velká rychlost (Suda, 2011).

2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je výzkum jádra buněk a stanovení velikosti genomu u vybraných zástupců z řádu **Mantodea** a **Phasmatodea** pomocí průtokové cytometrie a následné vyhotovení výsledků. Jde především o výzkum, který souvisí s absolutní velikostí genomu s přihlédnutím na odlišné ekologické vlastnosti a nároky zkoumaných skupin.

3 Řád Mantodea

Tento řád obsahuje výhradně dravé živočichy rozmanité velikosti s typickou stavbou těla. Jejich štíhlé tělo zaujme velkou pohyblivou hlavou či charakteristickým předním párem loupeživých končetin. Tělo bývá podlouhlé a zadeček je v dospělosti kryt dvěma páry křídel. Nejdrobnější druhy, např. *Mantoida tenuis*, dosahují stěží výšky 1 cm, největší jsou zástupci rodu *Hierodula*, kteří dorůstají velikosti dokonce 25 cm (Hessler et al. 2008).

Kudlanky se obecně chrání maskováním, většina druhů je krypticky zbarvena tak, aby se podobala listí či jinému pozadí, a to jak proto, aby se vyhnuly predátorům, tak aby lépe ulovily svou kořist (Gullan, Cranston, 2010).

V současné době je rozpoznáno více než 2 400 druhů kudlanek v asi 430 rodech (Otte et al. 2012).

Areál jejich rozšíření je velice široký. Rozkládá se od mírného pásma přes subtropy až do tropů, kde je počet výskytu tohoto druhu nejpočetnější (Hessler et al. 2008). Nejbohatší na výskyt tohoto řádu v počtu druhů je jihovýchodní Asie. Zdejší tropické lesy a podmínky jsou pro tento řád ideálním biotopem (Janšta et al. 2008). V Evropě se vyskytuje přibližně 14 rodů, např. rod *Mantis*, *Geomantis*, *Ameles* (Ehrmann, 2002).

Kudlankou s pravděpodobně největším areálem výskytu je *Mantis religiosa* (kudlanka nábožná). Nalezneme ji ve střední a jižní Evropě, včetně České republiky. Dále tento druh nalezneme v Africe, Japonsku či v Austrálii a Americe (Janšta et al. 2008).

Kudlanky nalezneme nejčastěji na travách, keřích, či ostatní nízké vegetaci, kde je dobrý přístup světla. Zde dokáží celé hodiny nehybně čekat na svoji kořist. Díky velice dobrému maskování si jich často nevšimne jak kořist, tak jiný predátor (Ehrmann, 2002).

Samičky snášejí mezi 10 až 400 vajec, v závislosti na druhu. Vajíčka se obvykle ukládají do pěny hromadně produkované žlázami v břiše samičky. Tato pěna na vzduchu ztvdne a vytvoří ochranou tobolku, která se společně s vaječnou hmotou nazývá ootheca. V závislosti na druhu může být ootheca připevněna k rovnému povrchu, obalena kolem rostliny či dokonce uložena v zemi (Enne, 1964).

Vývoj kudlanek popisuje např. Hurd et al. (1999), kdy lze vývoj jedince rozdělit na tři úrovně. Vajíčko, nymfa (několik stádií) a dospělý jedinec. Tento vývoj se nazývá proměna nedokonalá neboli hemimetabolie. Délka života jedince závisí na druhu. Menší jedinci se mohou dožít 4-8 týdnů, zatímco větší mohou žít 4 až 6 měsíců. Kudlanky chované v zajetí se díky dostatku potravy i nepřítomnosti predátorů dožívají déle (Hurd et al. 1999).

3.1 Historie řádu

Řád Mantodea je prastarou skupinou živočichů. Nejstarší nalezené zbytky těl jsou doloženy z druhohorních zkamenělin (období křídly), dochované fosilie z třetihor nám odhalují morfologicky blízké exempláře zástupců z čeledi *Metallyticidae* (Hessler et al. 2008).

Fosilie tohoto řádu jsou vzácné. Do roku 2007 bylo známo pouze asi 25 fosilních druhů (Martill et al. 2007).

Ve křídovém jantaru byly nalezeny fosilní pozůstatky japonských druhů kudlanek s trny na předních končetinách. Tyto druhy se nápadně podobaly dnešním jedincům (Ryall et al. 2015).

Většina nalezených fosilií v jantaru jsou ale nymfy. Kompresní fosilie (ve skále) zahrnují dospělé. Fosilní pozůstatky dospělých jedinců popsáné v roce 2003 poukazují na to, že již předkové dnešních kudlanek měli silné přední loupeživé končetiny pro lov kořisti (Martill et al. 2007).

3.2 Taxonomie

V roce 1758, Carl Linné zařadil kudlanky mezi brouky (Coleoptera), poté v roce 1767 mezi Hemiptera (polokřídli). V roce 1802 je Pierre André Latreille zařadil do samostatné skupiny Mantides. Neustálé přesuny v systému jen dokazují, že si vědci dlouho nebyli jisti, kam tyto živočichové patří. Název **Mantodea**, který známe dnes, poprvé použil Hermann Burmeister v roce 1838. Došlo ke sloučení kudlanek se šváby (Blattodea) do řádu Oothecaria. S nově objevenými druhy se ale prosadil názor, že kudlanky a švábi jsou sice příbuzní, ale jedná se o dva samostatné řády hmyzu (Ehrmann, 2002).

Jednou z prvních klasifikací, které rozdělily Mantidae na více čeledí, byla ta, kterou navrhl Max Beier v roce 1968. Tato klasifikace přidala 8 čeledí. Ehrmannova reklasifikace do 15 čeledí v roce 2002 přidala další čeledi a byla všeobecně přijata (Ehrmann, 2002). Nicméně čeledě Mantidae a Thespidae byly považovány za polyfyletické (nesdíle společného předka) (Hedges et al. 2008). Schwarz et al. (2019) revidoval celý systém živočichů a podstatně změnil pohled na fylogenezi kudlanek.

Říše: *Animalia* (živočichové)

Podříše: *Metazoa* (mnohobuněční)

Kmen: *Arthropoda* (členovci)

Podkmen: *Hexapoda* (šestinozí)

Třída: *Insecta* (hmyz)

Podtřída: *Pterygota* (křídlatí)

Nadřád: *Polyneoptera* (mnohožilní)

Řád: *Mantodea* (kudlanky)

3.3 Morfologie

Povrch těla kudlanek je slabě sklerotizován, zejména spodní pár křídel je velmi jemný. Jejich kutikula se skládá z endokutikuly a exokutikuly. Stavba je velmi podobná jako u švábů. Hnědý pigment je uložen v kutikule a zelený je uložen pod ní, v tzv. epidermální vrstvě. (Obenberger, 1955).

Mnoho druhů má také na povrchu těla různé výčnělky, hrbolky, trny, špičaté útvary, díky kterým mohou nabývat kudlanky bizarní podoby. U zástupců řádu Mantodea je značně vyvinut mimetismus (schopnost napodobování). Tato schopnost je v jejich životě velice důležitá. Pomáhá jim přežít v prostředí plném ostatních predátorů. Některé kudlanky mají listovitě rozšířenou hrud', jiné zase mají na holeních kráčivých končetin kruhové přívěsky. Všechno toto maskování využívají převážně při čekání na kořist (Obenberger, 1955).

Hlava kudlanek je zřetelně oddělená od těla a je poměrně výrazná, často trojúhelníkovitého tvaru. Pohyblivost krku je také pozoruhodně flexibilní. Některé druhy kudlanek mohou otáčet hlavou téměř o 180° (Obenberger, 1955). Oči jsou mimořádně dobře vyvinuty. Momentálně neznáme žádné slepé druhy kudlanek (Obenberger, 1955). Kudlanky mají stereofonní vidění, tzn. schopnost vnímání trojrozměrné struktury (Rossel, 1989). Ústní ústrojí kudlanek je kousacího typu. Ústní orgány jsou velice silně vyvinuty. Mandibuly jsou krátké, velmi silné a reprezentují mohutný orgán, který je určen k zachycení a rozdrcení kořisti. Rovněž jsou značně dobře vyvinuty maxily. Čelistní makadla jsou pětičlenná (Obenberger, 1955).



Obrázek 1: Detailní pohled na hlavu kudlanky (foto autor, 2020)

Hrud' kudlanek je často protáhlá. Známe však mnoho modifikací. Obecně se jejich hrud' skládá ze tří částí – prothorax, mesothorax, metatorax. Prothorax je značně pohyblivý a v závislosti na druhu kudlanky je různě zploštělý a tvarovaný. Prothorax u kudlanek nikdy nepřekrývá hlavu. Z předohrudi jim vyrůstají lapavé končetiny (Obenberger, 1955).

První pár nohou kudlanek je zcela jiný než dva zbývající. První pár je heteronomní a nazývá se loupeživé končetiny. Kudlance slouží k ulovení a přidržení kořisti. Na spodní straně se nachází tři řady ostnů. Okrajové řady mají větší počet ostnů než prostřední. Dle tvaru a ozbrojení loupeživých končetin tak můžeme kudlanku zařadit do čeledi nebo rodu. Také díky nim můžeme odhadnout, čím se daná kudlanka živí. Čeledi, které preferují létavý hmyz, mají většinou loupeživé nohy slabší než jedinci, kteří loví lezoucí hmyz. Zbylé dva páry končetin slouží kudlance k pohybu (Obenberger, 1955).

Kudlanky lze volně kategorizovat jako makropterózní (s dlouhými křídly), brachypterní (s krátkými křídly), mikropterózní (zakrnělá křídla), apterózní (bez křídla). Kudlanka má dvě sady křídel. Vnější křídla neboli tegmina jsou obvykle úzká a kožovitá. Fungují jako maskování a jako štít zadních křídel, které jsou jasnější a jemnější (Kemper, William, 2015).

Abdomen (zadeček) široce přisedá na zadohrud' a je málo pohyblivý. Sestává se u všech kudlanek z 10 tergů (svrchní články). Tergity jsou dobře viditelné a je jich deset. Počet sternitů (spodní články) závisí na pohlaví. U samců je sternitů 9 a u samic je jich jen 7. Na okraji posledního sternitu samců je párový stylus. Zadeček kudlanek má tendenci být štíhlejší a více zploštělý u samečků než u samic. U samic bývá více či méně rozšířen a je zavalitější kvůli vnitřním pohlavním orgánům (Roy, Roger, 1999).

3.4 Ekologické vlastnosti zkoumaných jedinců

Tato podkapitola obsahuje záměrně vypsané dostupné informace o mnou zkoumaných jedincích z tohoto řádu.

Ameles spallanzania (Rossi, 1792)

Tento druh kudlanky se vyskytuje ve středomořské oblasti. Oblast jejího rozšíření sahá od Maroka po Řecko a od jižní Evropy až po severní Afriku. Jde tedy o oblasti Albánie, Alžírsko, Dalmácie, Itálie, Malty či Španělska (Battiston et al. 2010).

Dosahují délky 1,8 až 4 cm. Jejich barva může být hnědá, zelená či šedá. U tohoto druhu je patrný pohlavní dimorfismus. Samečkové jsou okřídlené a mají velmi štíhlé tělo. Samičky mají tělo podsadité a nejsou schopny letu, jelikož mají jen malá brachypterní křídélka (Battiston et al. 2010).

Bohužel je i přes velmi dobře studovanou a popsanou taxonomii tohoto druhu (Battiston et al. 2010) je o jeho ekologických vlastnostech známo jen velmi málo informací. Díky velkému rozšíření je tento druh velmi adaptabilní a tudíž nelze přesně stanovit jeho ekologické vlastnosti. Tento teplomilný druh vykazuje adaptabilní strategii životního cyklu v různých zeměpisných šířkách. Tento cyklus zahrnuje dřívější líhnutí, stvoření více než jedné generace za rok či přezimování nymf a ooték. Dospělé jedince lze najít od pozdního jara do pozdního léta, v závislosti na zeměpisné šířce. Nalezneme je v řídké vegetaci na teplých a suchých místech. Jedinci, kteří se vyskytují v teplejším podnebí, mají velmi rychlý vývoj a nepotřebují přezimovat, protože zimy jsou mírné. Jedinci, kteří žijí v chladnějších oblastech, mají vývoj prodloužený a jejich nymfy a ootěky přezimují. Je to z důvodu nižších teplot (Battiston et al. 2010).

Creobroter sp. (Westwood, 1889)

Jelikož u tohoto druhu neznáme druhové jméno, tak uvádím pouze základní charakteristiku rodu.

Květinové kudlanky rodu *Creobroter* pochází z Asie, a to konkrétně z oblasti Vietnamu a jižní části Filipín. Jsou známy tím, že mají pestrobarevné (žluté, bílé, červené, hnědé atd.) zbarvení, které jim slouží jako maskování. Pomocí pestrého zbarvení skryjí tvar těla a působí jako květ. Schopnost mimikry může být u nymf více rozvinutá než u dospělých jedinců. Je to z důvodu pouze částečné květinové mimikry. U některých druhů tohoto rodu (např. *C. gemmatus*) slouží schopnost mimikry i jako projev deimatického chování. Mají totiž na svých křídlech barevné „oči“, které používají k zastrašení jiných predátorů. Jiné druhy tohoto rodu se spoléhají na podobnost s mravenci během raných stádií vývoje. Díky tomu odradí predátory a zvýší tím šanci na přežití (Vokjůvka, 2010-2015)

Samotné druhy dorůstají velikosti zhruba 5 cm. Samice dorůstají většinou 4 až 4,5 cm a dožívají se zhruba 8 až 10 měsíců. Samečkové dorůstají 3,5 až 4 cm a žijí zhruba 5 měsíců. Díky květinovému vzezření kudlanky rodu *Creobroter* preferují létající potravu, ale většinou loví vše, co je v jejich blízkosti. Po navržení dospělosti kladou samice ootěky, ze kterých se líhne po měsíci zhruba 20 až 50 nymf. Jejich vývoj trvá poté zhruba 5 až 7 měsíců (Volfová, 2019).

Danuria sp. (Stål, 1856)

Jelikož u tohoto druhu neznáme druhové jméno, tak uvádím pouze základní charakteristiku rodu.

Danuria je rod kudlanek pocházející z Afriky. Samec je výrazně menší než samička, je okřídlený a velmi štíhlý. Samička je větší, zavalitější a má menší křídla. Barva obou pohlaví je hnědá (Dollingers, 2021).

Deroplatys lobata (Guérin-Méneville, 1838)

Tato kudlanka pochází z oblasti Thajska, Jávy, Bornea a Sumatry (Volfová, 2019).

Vyznačuje se silnou schopností mimikry. Její tělo připomíná uschlý list. Z toho důvodu ji často najdeme na zemi mezi uschlým listím, kde je prakticky neviditelná (Dollingers, 2021).

Samičky dorůstají 9 cm, dožívají se zhruba 8 až 10 měsíců a jsou celkově robustnější než samečkové. Ti dorůstají 4,5 až 5 cm, žijí velmi krátce, a sice maximálně 3 až 3,5 měsíce, jsou užší a lehčí než samičky. Je zde tedy patrný pohlavní dimorfismus. Obě pohlaví mají křídla a jsou tmavě až světle šedě zbarvení. Samičky se páří ve věku 4 až 5 týdnů. Samci už po 14 dnech života kvůli velmi krátké době života. Nymfy se líhnou po 6 týdnech a je jich z jedné ootěky zhruba 50 (Volfová, 2019).

Gongylus gongylodes (Linné, 1758)

Tato velmi zvláštní kudlanka pochází z oblasti Jižní Indie, Srí Lanky, Thajska a Barmy (Volfová, 2019).

Samičky dorůstají délky 10 cm, dožívají se zhruba 15 měsíců a mají menší tykadla a robustnější tělo. Samečkové dorůstají délky 9 cm, dožívají se 6-7 měsíců, jsou schopni letu a mají větší tykadla a menší tělo než samičky. Obě pohlaví se vyznačují extrémně štíhlými končetinami a velmi zvláštním tvarem těla. Mezi základní barevné kombinace patří hnědá, béžová či zelená. (Volfová, 2019).

Schopnost mimikry tohoto druhu nespadá do skupiny květinových kudlanek. Svým tvarem těla připomíná spíše větévku. Tomuto tvaru uzpůsobil i své chování. Čeká na kořist, a přitom se pohybuje jako větévka, čímž splývá s prostředím. Také vyhledává společnost ostatních jedinců svého druhu. Žije a množí se ve velkých skupinách, aniž by samičky požírali samce (Stearn, 1983; Dollingers, 2021).

Haania vitalisi (Chopard, 1920)

Tato kudlanka pochází z jižní Číny, Indonésie a Filipín. Jde o velmi malý druh, který svým vzezřením napodobuje mech. Tento druh se nalezneme v přízemních mechových vrstvách či na stromech obalených mechem. Jsou to velmi malé kudlanky. Se svojí celkovou délkou cca. 2 cm patří mezi jedny z nejmenších druhů kudlanek. Tento druh má skoro nulovou vnitrodruhovou agresivitu. Lze tedy na jednom místě nalézt pohromadě i několik jedinců (Volfová, 2019).

Hierodula membrane, sp. Golden (Burmeister, 1838)

Zde uvádím informace o druhu *Hierodula membrane* a jeho druhé barevné formě *Hierodula sp. Golden*.

Hierodula membrane pochází z jihovýchodní Asie a patří mezi největší kudlanky. Dospělé samice dosahují délky 8 až 9 cm, dožívají se zhruba jednoho roku a jsou často kanibalistické. Tento životní styl jim pomáhá zvýšit plodnost (Birkhead et al. 1988; Barry et al. 2008). Samci dosahují o něco méně, a sice 7 až 8 cm, dožívají se zhruba 6-7 měsíců a jsou také lehčí a tenčí než samičky. Obě pohlaví jsou okřídlená, ale samička má kratší křídla než sameček. Také mají stejnou barvu (hráškově zelenou), existují však žluté, béžové či hnědé odrůdy, které se vyskytují v různých prostředích. Jedinci dovedou barvu změnit během několika dní. Doposud není jasné, co tuto změnu přesně způsobuje (Volfová, 2019).

Tyto kudlanky jsou aktivními predátory. Jakmile spatří kořist, tak ji neváhají pronásledovat. Jedinci dovedou skákat zhruba dvakrát dál, než je jejich samotná délka těla a tím překvapit kořist. Je to také velmi agresivní druh, který se nebojí i většího predátora či kořisti (Birkhead et al. 1988).

Hierodula sp. Golden pochází ze Sumatry. Samičky jsou žluté a samečci zelení. Toto jsou jediné odlišující se informace od původního druhu *Hierodula membrane* (Volfová, 2019).

Idolomantis diabolica (Saussure, 1869)

Setkáme se též s označením „Devil’s Flower“ či kudlanka ďábelská (Volfová, 2019). Tento plachý druh patří k největším druhům kudlanek a je pravděpodobně největší z kudlanek, které napodobují květiny. Díky svému vzezření nejsou aktivními lovci, ale pouze čekají, až se kořist přiblíží. Pokud se kudlanka cítí v ohrožení, zvedá přední část těla a roztahuje křídla. Tím odkrývá křiklavé zbarvení na spodní straně těla a hrůznou oční kresbu na křídlech. Pokud tento zastrašující manévř nepůsobí, kudlanka neváhá použít své ostré končetiny (Macek, 2001).

Pochází z východní Afriky, a to konkrétně z oblastí Etiopie, Keni, Somálska a Tanzanie. Živí se převážně létajícím hmyzem, ale nepohrdne ani pozemní potravou. Dožívají se zhruba jednoho roku (Volfová, 2019).

Základní anatomická struktura těla je podobná jako u většiny kudlanek. Mění se však morfologické vzezření, a to kvůli prostředí, kde se druh vyskytuje. Tato změna je navíc umocněna mimikou květiny. Čím je totiž nymfa starší, tím více jsou přídatky na těle výraznější. Samičky dorůstají délky zhruba 13 cm a mají malá péřitá tykadla. Samečkové jsou o něco menší, dorůstají 10 cm a mají delší péřitá tykadla. Obě pohlaví jsou pestrobarevně zbarvena a stejně tak i jejich křídla. Přibližně 2 až 4 týdny po dosažení dospělosti je samička připravená na spáření. Mladé hnědé nymfy se líhnou z ootěky přibližně po 6 týdnech a svoje pestrobarevné zbarvení získávají postupným růstem (Kovařík a kol. 2000; Dollingers, 2021).

Orthodera novaezealandiae (Colenso, 1882)

Tento endemický druh kudlanky pochází z Nového Zélandu, kde je velmi aktivním predátorem (Ramsey, 1990).

Dospělí jedinci jsou jasně zelení a dorůstají délky 3,5 až 4 cm. Stejně jako u ostatních kudlanek je samička větší. Nymfy tohoto druhu jsou bledě průsvitné zelené barvy. Samičky kladou ootéky s vajíčky nymf na stromy (Ramsey, 1990).

Tento druh dává přednost otevřenému, křovinatému terénu, kde splývá díky své barvě s vegetací. Často se vyskytuje ve velkém počtu na větvích menších stromů a keřů, kde loví. Jako endemický druh Nového Zélandu je velmi prospěšný pro zemědělce, protože jeho potravou jsou často škůdci plodin. S tím je ale spojena citlivost na postřiky a jedy, které se v zemědělství používají (Ramsey, 1990).

Rhombodera valida (Burmeister, 1838)

Tento velký druh kudlanky pochází z Indie a jihovýchodní Asie (Volfová, 2019).

V potravě nejsou tyto kudlanky vybíravé. Loví jak okřídlený, tak bezkřídlý hmyz. Zkrátka vše, co se přiblíží na dosah jejich loupeživých končetin. Dokonce jsou potvrzené i výskyty kanibalismu. Větší jedinci nemají problém napadnout menší. Z toho důvodu je páření pro samce často náročné, a pokud včas neunikne, může se stát potravou (Dollingers, 2021).

Samice dosahují délky 10 až 11 cm, dožívají se až dvou let a jsou robustnější. Samci dosahují délky 9 cm, dožívají se zhruba roku a půl a jsou štíhlejší. Obě pohlaví jsou zelená a mají křídla. Samice se začínají pářit ve věku 5 až 6 týdnů. Samci už ve třetím týdnu života. Ze samičí vytvořené ootéky se líhnou nymfy po šesti až sedmi týdnech a je jich zhruba sto (Volfová, 2019).

Sibylla pretiosa (Stål, 1856)

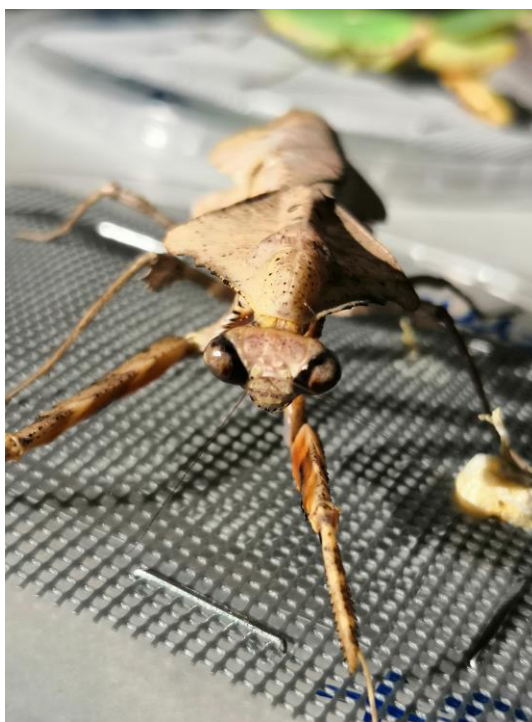
Tato velmi zvláštní kudlanka pochází z Jižní Afriky, kde žije ve skupinkách a loví hlavně létající hmyz (Picker et al. 2004).

Samičky dorůstají 5 až 6 cm, dožívají se zhruba 9 až 11 měsíců. Samečci dorůstají o něco méně, a sice 4 až 5 cm, a dožívají se 8 až 9 měsíců. Obě pohlaví jsou hnědě zbarvená a mají zelená křídla. Dospělý jedinci se odlišují od ostatních druhů kudlanek svými křídly, které připomínají listy. Také jejich hrudník je velmi protáhlý a tenký. Samičky vytváří ootéky, ze kterých se po 4 týdnech líhnou nymfy (Picker et al. 2004; Volfová, 2019).

Sphodromantis lineola (Burmeister, 1838)

Tento středně velký druh kudlanky, pro který jsou typické silné loupeživé končetiny, pochází z Afriky (Volfová, 2019).

Samičky dorůstají 8 cm, dožívají se 7 až 8 měsíců a jsou robustnější a těžší než samečci. Ti dosahují 6 cm, dožívají se 3 měsíce a jsou lehčí než samice. U obou pohlaví nalezneme několik barevných forem. Nejvíce jsou zastoupení jedinci hnědé a zelené barvy, ale nalezneme i žluté barevné formy. Jedinci jsou také velmi agresivní (obzvláště samičky). Proto je moc nevidíme se shlukovat. Díky své silné agresivitě se nebojí zaútočit i na větší kořist než jsou oni. V potravě nejsou vybíraví a loví vše, co se pohne v jejich blízkosti. Samice se rozmnožují ve věku 5 až 6 týdnů. Samci už po dvou týdnech. Pokud je samice hladová, hrozí kanibalismus na samci. Ootéku tvoří samička zhruba po měsíci. Po 6 týdnech se narodí nymfy, kterých může být až 250 (Volfová, 2019; Dollingers, 2021).



Obrázek 2: Detailní pohled na samici druhu *Deroplatys lobata* (foto autor, 2020)

4 Řád Phasmatodea

Název tohoto řádu je odvozen od starořeckého **phasma**, což znamená zjevení nebo fantom. Tento název odkazuje na jejich schopnost přirozeného maskování, které ztěžuje predátorům jejich objevení. Některé druhy přizpůsobily přímo vzhled těla. Nalezneme druhy, které mají válcově tyčinkové tvary, zatímco jiné druhy jsou zploštělé a připomínají tvarem list. Mnoho druhů je také bezkřídých nebo mají zmenšená křídla (Hoell et al. 1998).

Členové řádu Phasmatodea mohou dosahovat relativně velkých rozměrů. Nalezneme jedince v rozmezí velikosti od 1,5 cm až po více než 30 cm jedince. Životnost jedinců se liší podle druhu. Většinou se ale pohybuje od několika měsíců do tří let (Hale, Tom, 2017).

V současné době bylo popsáno více než 3000 druhů, přičemž toto číslo stále roste díky objevování nových druhů z tropických oblastí. Řád Phasmatodea se vyskytuje po celém světě s výjimkou Antarktidy. Nejpočetněji je tento řád zastoupen v oblastech tropů a subtropů. Největší rozmanitost je v oblastech jihovýchodní Asie a Jižní Ameriky, následovaná oblastmi Austrálie, střední a jižní USA. Z ostrova Borneo je známo více jak 300 druhů. Toto číslo z něj činí nejbohatší místo na světě pro tento řád (Bragg, 2001). Některé skupiny strašilek však můžeme nalézt pouze na určitých místech výskytu. Například podčeď *Timeminae*, která žije v Kalifornii (Kovařík, 2000).

Strašilky jsou býložravé a žijí se většinou listy stromů a keřů (Willing et al. 1986).

Některé druhy mají velmi dobře vyvinutou schopnost regenerace, což jim kolikrát umožňuje uniknout predátorovi za cenu ztráty končetiny. Ke ztrátě končetiny může ale dojít i během svlékání, a proto jsou schopny ji nahradit. Nové končetiny jsou ale často menší a méně odolné (Lynne-Maginnis, 2008). Jiné druhy zase při napadení predátorem spoléhají na aktivní obranu, která spočívá v uvolňování obranné sekrece, včetně chemických sloučenin s různým účinkem. Tyto látky mohou způsobovat zápach nebo pálení očí či úst dravce (Dossey, Aron, 2010).

Pro tento řád je charakteristická proměna nedokonalá neboli hemimetabolie. U této proměny neprochází jedinci stádiem kukly, ale pouze stádiem vajíčka, larvy (nymfy), které dorůstají v imago po několikanásobném svlékání, a na závěr se stávají dospělým jedincem. Mezi tuto kategorii hmyzu patří také kudlanky (Mantodea), kobylky (Ensifera) či šváby (Blattodea) (Baker, 2007).

Mnoho druhů strašilek se rozmnožuje partenogeneticky, což znamená, že samičky kladou vajíčka, aniž by se musely pářit se samečkem. Jedinci z vajíček od těchto samiček jsou opět pouze samičky a líhnou se do nymf, které jsou přesnou kopií jejich matek (Morgan-Richards, Trewick 2005).

4.1 Historie řádu

Nejstarší fosilní nálezy řádu Phasmatodea, konkrétně druhu *Eophyllium messelensis* jsou staré 47 milionů let. Dle velikosti a formy těla, která se velmi podobá dnešním existujícím druhům, je pravděpodobné, že došlo pouze k menším změnám ve vývoji (Wedmann et al. 2006).

Fosilie dospělých jedinců či vajec jsou ale velmi vzácné. Nejčastěji nalezenou částí těl strašilek jsou jejich křídla. Některé z nalezených exemplářů, které jsou příbuzné řádu Phasmatodea, pomáhají aspoň s určením vývoje těla. Zatím se však povedlo najít pouze jeden druh, který byl označen jako předek dnešních skupin. Byl nalezen na fosilních nalezištích v Brazílii (Martill et al. 2007).

4.2 Taxonomie

Řád Phasmatodea je občas považován za příbuzný jiných řádů, jako jsou Blattodea, Mantodea či Neuroptera, ovšem jejich příbuznost není jistá a seskupení může být parafyletické (nemají společného předka), a tudíž neplatné v tradičním opisu (sada atributů, které všichni členové mají). Tento řád byl kdysi považován za podřád Orthoptera, ale nyní je samostatným řádem (Brock, Paul D., 2015)

Samotné zařazení je ovšem těžší. Na základním zařazení do systému (říše – řád) se entomologové shodují. V případě zařazení druhu do rodu je to těžší. Toto rozdělení totiž neexistuje, protože na jednotném řazení se entomologové neshodli (Zajíček, 2001-2013).

Samotné zařazení dle Ruggiero et al. 2015 je následující:

Říše: *Animalia* (živočichové)

Podříše: *Metazoa* (mnohobuněční)

Kmen: *Arthropoda* (členovci)

Podkmen: *Hexapoda* (šestinozí)

Třída: *Insecta* (hmyz)

Podtřída: *Pterygota* (křídlatí)

Nadřád: *Polyneoptera* (mnohožilní)

Řád: *Phasmida-Phasmatodea* (strašilky)

4.3 Morfologie

Phasmatodea jsou morfologicky velmi variabilní. Dají se rozdělit do tří typů, a to pakobylky, strašilky a lupenitky. Každý z těchto typů má jinou stavbu těla. Pakobylky jsou často neobyčejně úzké, štíhlé a dlouhonohé, aby jejich tělo připomínalo větévku či klacíky. Strašilky jsou o něco kratší a robustnější, přičemž jejich tělo je pokryté trny či jinými výrůstky. Lupenitky mají zcela odlišně formované tělo. Jejich zadeček je plochý a široký a na nožkách najdeme rozšířené laloky. Jak zbarvením, tak i tvarem připomínají list (Kovařík a kol. 2000).

Tělo je rozděleno na hlavu (s tykadly), hrud', zadeček a končetiny. Celkově je upraveno tak, aby připomínalo vegetaci s hřebeny připomínající listové žíly, kůru a další možné prostředí (Hoell et al. 1998).

Hlava je poměrem k tělu menší. Všechny typy mají jeden pár složených očí a jeden pár tykadel (Friedemann et al. 2012). Ústní orgány jsou kousacího typu, směřují rovně dopředu a podobají se těm, které lze vidět u rovnokřídlého hmyzu. Zvláště spodní čelisti jsou silně vyvinuty a horní čelist je na vnitřní straně ozubena. Čelistní makadla jsou pětičlenná a pysková makadla tříčlenná (Hoell et al. 1998).



Obrázek 3: Detailní pohled na hlavu strašilky (foto autor, 2020)

Hrudník se skládá ze tří hrudních článků, které se nazývají prothorax, mesothorax a metathorax. Je typický vzájemný poměr těchto tří článků (Obenberger, 1955). Hrudník je dlouhý u okřídlených druhů, protože jsou v něm letové svaly. Pokud je přítomen, první pár křídel je úzký, zrohovatělý (tvrzený) a vždy kratší než zadní křídla. Zadní křídla jsou dlouhá, široká, s rovnými žilkami po celé délce (Hoell et al., 1998). Mnoho druhů ale ztratilo schopnost létat, jejich křídla jsou zkrácená či zcela zakrnělá. Vyvinutá křídla má tak jen malé množství druhů. U bezkřídlých druhů je hrudník podstatně menší, čímž je jejich hůlkovitý tvar ještě více umocněn (Kovařík a kol., 2000).

Jedinci mají 3 páry končetin. Každý pár se nalézá na jednom ze tří částí hrudníku a jsou podobně vyvinuty. Kráčivé končetiny u strašilek s pakobyilkami jsou silné a u pakobylek i velmi dlouhé. Končetiny lupenitek jsou kratší a zploštělé, čímž napomáhají vytvářet dojem listu. Pro stehna a holeně strašilek jsou typická žebra, na kterých často nalezneme trny, zuby nebo různé výčnělky (Zajíček, 2001-2013).

Zadeček je válcovitý a delší. Liší se u jednotlivých druhů. Je buďto zploštělý, úzký, širší nebo hůlkovitý. Je dělen na články, tzv. tergity (destičky tělních článků hmyzu) (Hoell et al. 1998). Jeho zakončení se u obou pohlaví výrazně liší. U samečků je desátý tergít zduřelý a na konci rozdělený a vykrojený. Samičky mají rozdílný zadeček už od sedmého a osmého sternitu. Na sedmém sternitu se nalézá preoperkulární orgán a na osmém nalezneme subgenitální plošku. Tato ploška může být někdy protáhlá a tvořit jakýsi ochranný obal ze spodní strany pro kladélko (Zajíček, 2001-2013).

4.4 Ekologické vlastnosti zkoumaných jedinců

Tato podkapitola obsahuje záměrně vypsané dostupné informace o mnou zkoumaných jedincích z tohoto řádu.

***Acrophylla wuelfingi* (Redtenbacher, 1908)**

Tato pakobyilka pochází z Austrálie, kde obývá především lesy a křovinné oblasti (Motyčková, Motyčka, 2012). Je považována za jeden z největších druhů křídlatých pakobylek (Pecina, 1999).

Samičky dosahují délky až 29 cm, jsou větší a okřídlené. Samečci dosahují maximálně délky 13,5 cm, mají delší tykadla, jsou velmi zdatnými letci, ale objevují se v populacích velmi zřídka. Proto se samičky rozmnožují převážně partenogeneticky. Obě pohlaví jsou zbarvena šedohnědě a na nohách jsou silně otrněné. Samičky kladou oválná 4,5 mm dlouhá vajíčka, která padají na zem. Za svůj život stihnou naklást až tisíc vajíček. Mladé nymfy se líhnou po 6 měsících, jsou dlouhé asi 2,5 cm a dospějí po 5 až 6 měsících. Samičky se dožívají zhruba 8 měsíců (Bártová, Klimeš, 2004; Motyčková, Motyčka, 2012).

***Andropromachus scutatus* (Carl, 1913)**

Tato strašilka pochází z Vietnamu, je to převážně noční živočich a žije několik měsíců. Samičky tohoto druhu dosahují délky 6 až 7 cm a jejich zbarvení je variabilní. Můžeme nalézt hnědé, šedohnědé, červenohnědé či zelené jedince. Jsou také velice ostnaté. Zvláště velké ostny nalezneme na metathoraxu. Samečci měří 4,5 až 5 cm, mají též ostny jako samičky a jsou podobně zbarveni. Obě pohlaví jsou bezkřídlá. Samičky kladou vajíčka po 3 až 4 týdnech dospělosti. Velikost vajíček je asi 1,5x1 mm a odhazují je na zem. Inkubační doba je 3 až 5 měsíců (Zajíček, 2001-2013).

Extatosoma tiaratum (MacLay, 1826)

Tento druh pakobylky pochází ze suchých lesů a křovin severovýchodního Queenslandu v Austrálii a Papuy Nové Guineje. Celkově žijí necelý rok. Samičky dosahují délky až 16 cm, jsou širší, mají menší křídla a nalezneme hnědozelené či světlehnědé jedince. Při ohrožení svírají zadní pár otrněných nohou k sobě a zadeček zatočí dovnitř. Připomínají tak štíra v útočné pozici. Samečci jsou opět menší než samičky. Dosahují délky až 10 cm, jsou hnědí, bez trnů, štíhlejší než samička a mají i větší křídla, což jim umožňuje létat. Tento druh se rozmnožuje jak pohlavně, tak partenogeneticky. Samička klade 4 až 6 mm velká vajíčka zhruba 5 týdnů po posledním svleku, a to takovým způsobem, že je „vystřeluje“ i několik metrů daleko. Vajíčka tohoto druhu mají na povrchu látku, která přitahuje mravence. Inkubační doba je 6 měsíců a po navržení této doby se líhnou malé, asi 2 cm nymfy, které svým zbarvením připomínají duh australských mravenců *Leptomyrme*. Toto zbarvení je ze začátku chrání před hmyzožravými živočichy (Zajíček, 2001-2013; Motyčková, Motyčka, 2012).

Lamponius guerini (Saussure, 1868)

Tento menší bezkřídlý druh strašilky pochází z Antilského ostrova Guadeloupe a dožívá se až 10 měsíců (Pecina, 1999). Samička dosahuje délky 10 cm. Existují dvě barevné formy, a to tmavě hnědá se světlými skvrnami na těle a zadečku (připomíná kůru stromu). Druhá barevná forma je světlehnědá s malými tmavými skvrnkami na zadečku. Samička je celkově mohutnější a silnější než sameček. Sameček dosahuje maximálně 8 cm a najdeme u něj pouze jednu barevnou formu, a to hnědou se světlými skvrnami na zadečku. Je také menší a štíhlejší než samička. U tohoto druhu probíhá rozmnožování převážně pohlavně. Sameček putuje často se samičkou na jejich zádech. Samička klade soudečkovitá 3 mm vajíčka, která padají na zem. Inkubační doba trvá 4 měsíce. Mladé vylíhlé nymfy jsou asi 1 až 1,5 cm veliké a vývoj jim trvá zhruba půl roku (Zajíček, 2001-2013).

Myronides sp. Peleng (Stål, 1875)

Tento druh pakobylky pochází z Vietnamu. Samičky nedorůstají velkých rozměrů, asi 9 až 10 cm, jejich vývoj trvá okolo 6 měsíců a jsou velmi pestře zbarvené. Jejich základní zbarvení je tyrkysově až modré a po stranách jsou světlejší. Celkový vzhled je tak modrozelenožlutý. Samečci dorůstají maximálně 8 cm, jejich vývoj trvá okolo 5 měsíců, nejsou tak pestře zbarvení jako samičky. Barva jejich těla je červenohnědá. Samičky snášejí vajíčka volně na zem, a to 3 až 4 týdny po posledním svleku. Vajíčka jsou oválná a nymfy se z nich líhnou po 3 až 4 měsících. Celková doba života u obou pohlaví je až rok (Imladis, 2017)

Orthomeria kangi benguet (Vallotto, 2016)

Tento okřídlený druh byl poprvé objeven roku 2016 v provincii Benguet na ostrově Luzon, která spadá pod oblast Filipín. Má výrazně červeně zbarvenou oblast zadních křídel. Samičky dorůstají 5,5 cm, jsou černé s červenými křídly, mají větší a robustnější tělo než samečci a dožívají se 4 měsíců. Samci dorůstají 4,5 cm, jsou okřídlení a létají nebo skáčí a dožívají se pouze 1,5 měsíce. Samička klade zaoblená 3x2 mm vajíčka, ze kterých se líhnou po dvou měsících asi 1 cm nymfy. Pokud se cítí ohroženě, tak stříkají mléčný sekret (Vallotto et al. 2016).

Periphetes forcipatus (Bates, 1865)

Tato pakobylka pochází z Indonésie a dožívá se 9 měsíců. Samička dosahuje délky 8 až 10 cm, má mohutnější tělo a metalicky zelené zbarvení. Sameček dosahuje 7 až 8 cm a má menší tělo než samička, přičemž je oranžový se zelenými nohama. Rozmnožují se jak pohlavně, tak partenogeneticky. Samičky kladou 3,5 mm vajíčka volně na zem. Inkubace trvá 3 až 4 měsíce, poté se líhnou zelenohnědé nymfy (Imladis, 2017).

Periphetes graniferum (Westwood, 1859)

Tato pakobylka pochází z Filipín a dožívá se 12 měsíců. Samička dosahuje délky 8 cm, má mohutnější tělo a metalicky zelené zbarvení s modrými částmi. Oči a břicho jsou však oranžové. Sameček dosahuje 7 cm a je pestrobarevný (zelená, modrá, oranžová, černá). Rozmnožování je převážně pohlavní, ale zvládnou se rozmnožovat i partenogeneticky. Samičky kladou přibližně 2,5 mm vajíčka volně na zem, kde jejich inkubace trvá 4 měsíce. Po završení inkubace se líhnou mladé nymfy (Motyčková, Motyčka, 2012).

Peruphasma schultei (Cole & Hennemann, 2005)

Tato poměrně nově objevená strašilka pochází ze severního Peru, a to konkrétně z oblasti Cordilera del Condor, která se nachází v nadmořské výšce 1200 až 1800 m n. m. Je to převážně noční živočich, který se přes den schovává v hustém listoví (Motyčková, Motyčka, 2012).

Samičky dosahují délky 5 až 7 cm, jsou zavalité, sametově černé s malými křídélky. Spodní část zadních křídel je šarlatově červená. Samečci dorůstají 4 až 5 cm a podobají se samičkám. Tento druh se dokáže v případě ohrožení aktivně bránit vystříknutím bělavé tekutiny. Ta nepříjemně páchne a dráždí sliznice. Rozmnožují se výhradně pohlavně. Páření je časté, a i když se nekoná, tak nalezneme často samce na zádech samičky. Ty začínají klást 2 až 3 týdny po posledním svleku, a to černá soudečkovitá vajíčka. Jejich inkubace trvá 4 až 5 měsíců. Vývoj mladých nymf trvá zhruba 6 měsíců, a stejně tak trvá život dospělých (Zajíček, 2001-2013; Motyčková, Motyčka, 2012).

***Phobaeticus serratipes* (Gray, 1835)**

Tato pakobylka je považována za jeden z největších žijících druhů hmyzu na světě. Největší žijící exemplář měřil 27 cm (bez měření nohou, s nohama měřil 55 cm). Pochází z pralesů západní Malajsie a Velkých Sund (Motyčková, Motyčka, 2012).

Samičky dosahují délky 23 až 25 cm, jsou bezkřídle a mnohem masivnější než sameček. Žijí zhruba 5 až 10 měsíců. Jejich zbarvení je dosti proměnlivé na prostředí, kde žijí. Nalezneme hnědé či zelené jedince. Samečci dosahují velikosti 15 až 17 cm, jsou okřídlení, ale nejsou schopni letu a jejich zbarvení je většinou zelené. Dožívají se 4 až 5 měsíců. Obě pohlaví při napadení pouští končetiny, čímž získají čas na útěk. Samičky kladou měsíc po posledním svleku zploštěle oválná vajíčka o velikosti asi 5,5 mm. Inkubace trvá 5 měsíců. Z vajíček se líhnou přibližně 3 cm nymfy (Motyčková, Motyčka, 2012).

***Phyllium giganteum* (Hausleithner, 1984)**

Tento velmi zajímavý druh lupenitky, který je aktivní hlavně v noci, pochází z Asie, a to konkrétně z tropických pralesů západní Malajsie. Zde je přizpůsoben pro život ve větvích a svým tělem připomíná list (Motyčková, Motyčka, 2012). Lupenitky totiž mají velice dokonale vyvinutou schopnost mimikry (Pecina, 1999). Barva tohoto druhu je hráškově zelená, existují však linie, kde se vyskytují barvy žluté nebo hnědé. U tohoto druhu je vyvinut pohlavní dimorfismus. Samičky dosahují délky až 13 cm, nemohou létat, ale mají široké listové krytky, tzv. tegminy, a dožívají se 6 až 9 měsíců. Oproti tomu sameček dosahuje maximálně 8 cm, má dlouhá, úzce složená křídla, díky kterým je schopen letu, a žije pouze několik měsíců. V důsledku krátkého života samečka se populace rozmnožují převážně partenogeneticky. Samička klade 7 mm velká vajíčka, ze kterých se po 5 až 7 měsících líhnou 1,5 až 2 cm nymfy (Hanzák a kol., 1973; Zajíček, 2001-2013).

***Phyllium jacobsoni* (Rehn & Rehn, 1934)**

Tato lupenitka pochází z Východní Jávy. Stejně jako ostatní zástupci rodu *Phyllium*, i tato lupenitka žije ve větvích tropických stromů a je aktivní hlavně v noci. Stejně jako u *Phyllium giganteum*, i u tohoto druhu je silně vyvinutá schopnost mimikry. Samička dorůstá délky 7 až 8 cm, nelétá a žije zhruba 6 měsíců. Sameček dorůstá maximálně 5 cm, dospívá dříve než samička, létá a žije zhruba 3 měsíce. V důsledku krátkého života samců se populace rozmnožují převážně partenogeneticky. Samičky začínají klást 3 až 4 týdny po posledním svleku vajíčka 3 x 2 mm, jejichž inkubace trvá 4 měsíce. Samotná vajíčka často padají na zem a líhnou se z nich 1,5 cm velké nymfy (Zajíček, 2001-2013).

Pseudophasma subapterum (Redtenbacher, 1906)

Tato strašilka pochází z Venezuely. Samička dorůstá délky kolem 6 cm, je hnědá a má dva páry miniaturních křídýlek, které nejsou uzpůsobeny k letu. Samečci dorůstají délky 4 až 5 cm a jsou celkově subtilnější a tmavší než samičky. Poslední články na zadečku mají rozšířené v orgán, kterým se přidržují samiček. K páření dochází u tohoto druhu často, a i když právě neprobíhá, tak často najdeme samečka na zádech samičky. Samičky kladou soudečková vajíčka o velikosti 3,5 x 2 mm. Inkubace trvá 3 až 4 měsíce a z vajíček se líhnou 1,3 až 1,5 cm velké nymfy, kterým vývoj trvá 5 až 7 měsíců. Při podráždění je tento druh schopen se bránit vylučováním bělavé tekutiny (Motyčková, Motyčka, 2012).

Ramulus nematodes (Haan & W.de, 1842)

Tento druh pakobylky pochází z Thajska, Malajsie a dospělci žijí 5 až 7 měsíců. Je zde patrný barevný dimorfismus. Samičky dorůstají až 15 cm a jsou zeleně či hnědě zbarvené. Samečci dorůstají asi 10 cm a jsou krásně modří s hnědými nohama. Rozmnožují se pohlavně či partenogeneticky. Samička klade velmi plochá, 6 až 7 mm velká vajíčka, která připomínají kůru. Jejich vajíčka jsou dokonce nejplošší ze skupiny strašilek a pakobylek a jejich inkubační doba je 4 měsíce. (Motyčková, Motyčka, 2012; Zajíček, 2001-2013).

Sipyloidea sipylus (Westwood, 1859)

Tento druh okřídlené strašilky patří k nejrozšířenějšímu na světě. Původem je z jihovýchodní Asie, ale byl zavlečen do Austrálie, na Madagaskar či Seychelské ostrovy (Motyčková, Motyčka, 2012). V tropických oblastech jsou považovány za škůdce různých rostlin, které se pěstují na plantážích. Samci i samičky si jsou velice podobní. Jsou světle hnědé či žluté barvy a mají křídla. Samičky dosahují délky 10 cm a samci pouze 6 až 7 cm. Rozmnožují se jak pohlavně, tak partenogeneticky. Samička klade protáhlejší, 4 až 4,5 mm velká vajíčka, která často přilepuje na rostliny. Jejich inkubační doba je 3 až 4 měsíce. Z vajíček se líhnou malé, 2 cm velké nymfy, kterým trvá půl roku, než dospějí do imága, jenž žije přibližně jeden rok (Kurka, 1999; Zajíček, 2001-2013).

Sungaya inexpectata (Zompro, 1996)

Tato menší bezkřídlá strašilka pochází z Filipínského ostrova Luzon, kde obývá původní i druhotné pralesy (Motyčková, Motyčka, 2012).

Délka těla samičky se pohybuje kolem 8 až 9 cm, má poměrně masivní tělo, na kterém nalezneme drobné trny a čtyři výrazné výrůstky na hrudi. Bývají převážně světle hnědé až hnědošedé. Samečci jsou vzácností. V chovech se nevyskytují a v přírodě na ně narazíme vzácně. Jeho délka se pohybuje okolo 5 až 6 cm. Díky tomu se populace rozmnožují převážně partenogeneticky. Obě pohlaví jsou bezkřídlá a jejich tykadla jim sahají až do půlky těla. Samičky kladou 3,5 x 4,5 mm soudečkovitá vajíčka přímo do půdy. Inkubační doba je 4 až 5 měsíců a líhnou se z nich hnědé nymfy o velikosti 1,5 cm (Motyčková, Motyčka, 2012).

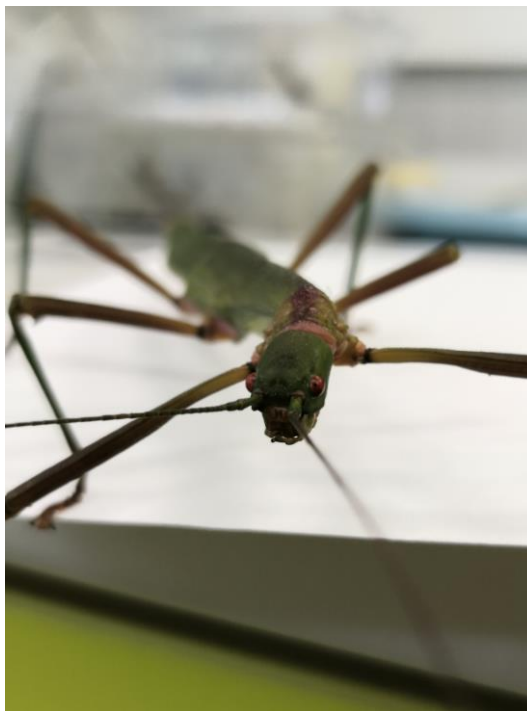
Vývoj nymf do dospělosti trvá stejně, jako je inkubační doba vajíček. Obě pohlaví se dožívají přibližně jednoho roku (Motyčková, Motyčka, 2012).

Pseudophasma scabriusculum panguana (Redtenbacher, 1906)

Tato strašilka pochází z Peru. Samičky dorůstají 12 až 14 cm. Samečkové dorůstají o něco méně než samičky, a sice 11 až 13 cm. Bohužel toto jsou jediné informace, které se mi podařilo najít (Imladis, 2017).

Tirachoidea cantori (Westwood, 1859)

Tato pakobylka pochází z Malajsie. Samice dorůstají délky 21 cm a samečkové 12,5 cm. Bohužel toto jsou jediné informace, které se mi podařilo najít (Imladis, 2017).



Obrázek 4: Detailní pohled na samičku druhu *Periphetes forcipatus* (foto autor, 2020)

5 Průtokový cytometr

5.1 Princip metody

Průtokový cytometr měří fluorescenční a optické vlastnosti protékající buňky detektorovým systémem. Jeho princip spočívá na detekci světelného či fluorescenčního signálu. Pro detekování tohoto signálu je třeba využít fluorescenčních barviv, tzv. fluorochromu, které se vážou přímo na DNA nebo fluorescenčně značených protilátek, které jsou specifické pro buněčný povrch markerů. Díky barvivu jsme schopni sledovat emitovanou fluorescenci dané buňky (Macey, 2007).

Samotný vzorek je zpracován a pomocí filtrace či odstředěním se odstraní větší shluky buněk, tkáně či pletiv. Výsledný vzorek je „obarven“ fluorescenčními barvivy. Poté je přidán do bezbuněčného pufrového roztoku, který se nazývá nosná kapalina neboli sheat fluid. Tato suspenze poté protéká speciální komorou, která se zužuje. Zúžení nutí buňky se seřadit a postupně protékat přes laser. Díky tomu dojde k osvětlení jediné buňky paprskem o určité vlnové délce. Ten zapříčiní emitaci fluorochromu a toto vyzařované světlo nyní již o jiné vlnové délce je detekováno fotodetektoem. Specializovaný software pak může graficky prezentovat výsledky v jedno-, dvou-, nebo trojrozměrných grafických formátech (Macey 2007). V těchto grafech je zanesena intenzita každého ze sledovaných znaků. Pro jejich zpracování se často využívá statistická analýza, která roztrídí jádra dle intenzity sledovaných znaků (Givan, 2011).

5.2 Výhody a nevýhody

Stejně jako každá metoda má průtoková cytometrie svoje výhody i nevýhody.

Výhody metody

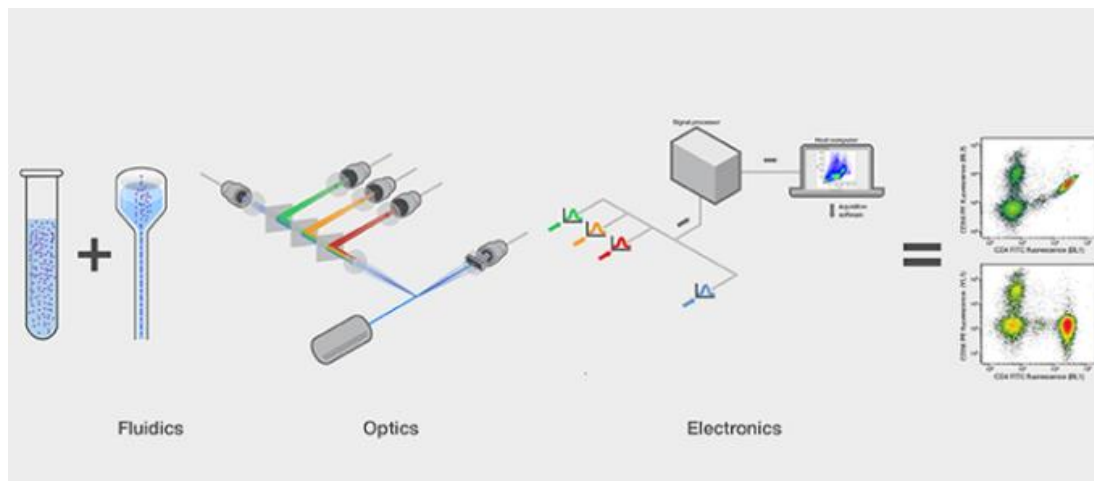
Přednost této metody spočívá hlavně ve vysoké rychlosti a nenáročnosti, ať už se jedná o přípravu vzorku či o samotnou analýzu. Přístroj je totiž schopný za sekundu změřit stovky až tisíce jader a samotná analýza trvá pouze několik minut. Díky tomu je přístroj schopný poskytnout velké množství informací o studovaném vzorku, nemluvě o zvládnutí velkého množství analyzovaného materiálu (Suda et al. 2007; Cournault, Aron, 2008). Za krátký časový úsek tak lze získat kvalitní výsledky o množství DNA, plodnosti či jiných zkoumaných vlastnostech. Tato metoda je také velmi vhodná pro zkoumání ohrožených či vymírajících druhů, a to právě díky potřebě jen velmi malého množství vzorku k analýze. Díky tomu nejsou jedinci kvůli výzkumu odsouzeni k záhubě (Ciudad et al. 2002; Suda, 2011).

Nevýhody metody

Ačkoliv se může zdát, že řada výhod průtokové cytometrie nepochybně převažuje, opak je pravdou. Mezi největší nevýhodu patří získávání vzorků živočichů, konkrétně pak vzorků hmyzu. U rostlin stačí pouze malé množství pletiv, zatímco u vzorku hmyzu je leckdy třeba celá hlava daného jedince, ovšem v mnoha případech si vystačíme i s jednou končetinou (Suda, 2011). Samotné vzorky k analýze je též nutno zachovat ve stavu nutném k měření (živé buňky), což značně ztěžuje získávání materiálu v terénních podmínkách (Doležel, Bartoš, 2005). Jako řešení se nabízí odchyt daného živočicha, leč takový exemplář je do laboratoře nutno přemístit a následně s ním pracovat v co možná nejkratším časovém rozmezí, jelikož vzorek by měl být čerstvý (Suda, 2005). Poslední nevýhodou je technická udržitelnost samotného přístroje. Přístroj je nutno udržovat a starat se o jeho kalibraci, aby byla zajištěna přesnost, a hlavně správnost samotného měření (Macey, 2007). Samotná obsluha přístroje a jeho konfigurace nepatří mezi jednoduchou záležitost, protože je nutné, aby ji vykonávala zkušená osoba (Suda, 2011).

5.3 Komponenty

Podle Šinkorové a Zárýbnické (2008) se průtokový cytometr skládá ze tří hlavních částí, které jsou navzájem propojené. Jsou jimi: Fluidní systém, který zajišťuje přesun buněk skrz snímanou oblast. Optický systém, kde nalezneme laser a sběrné optické dráhy používané ke sběru a pohybu světla. Jako poslední je součástí cytometru elektronika, která umožňuje nastavení parametrů a výpočtový systém, který zpracovává a interpretuje výsledky.



Obrázek 5: Jednotlivé komponenty cytometru (Převzato z <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/how-flow-cytometer-works.html>).

5.3.1 Fluidní systém

Účelem fluidního systému je zajištění rovnoměrného přesunu buněk po jednom přes snímanou oblast. Je důležité, aby každá buňka byla osvětlena stejným množstvím světla z laserů a odvedena do sběrné nádoby. Parametry fluidního systému jsou uživatelsky ovlivnitelné a uživatel může sám nastavit, pod jakým tlakem budou buňky přes laser proudit. Toto nastavení sebou však nese riziko horšího rozlišení a možnosti špatného měření. Může totiž dojít k rozdílu tlaku mezi vzorkem a unášející tekutinou. Při vysokém tlaku je proud vzorku široký a v plošném průřezu pak proteče více buněk. Platí tedy, že čím menší je tlak, tím lepší a přesnější je měření buněk (Cossarizza et al. 2017).

5.3.2 Optický systém

Podle Šinkorové a Zárybnické (2008) optický systém tvoří soustava filtrů, zrcadel, čoček a zdroj světla, kterým jsou například lasery, oblouková lampa či LED lampa. V dnešní době se především používají lasery. Ty produkují jedinou vlnovou délku světla na konkrétní frekvenci. Jsou k dispozici na různých vlnových délkách od ultrafialového po červenou, a mají proměnlivý rozsah úrovní výkonu (Cossarizza, et al., 2017). Samotný princip použití laseru spočívá v tom, že paprsek je zaměřován na požadovanou měřící celou prostřednictvím čočky (Marinov, 2008). Paprsek světla proudí do všech směrů, načež je shromažďován díky optice, jež jej nasměruje na několik filtrů a dichroických zrcadel, které vzápětí separují jednotlivá pásma vlnové délky (Brown a Wittwer, 2000).

Oproti tomu obloukové lampy k vyzaření určité vlnové délky potřebují optické filtry, což z nich činí méně používané zdroje světla (Šinkorová, Zárybnická, 2008). Zrcadla a filtry rozdělují emitované fotony podle vlnové délky na příslušné detektory, takzvané kanály. Co se filtrů týče, používají long pass filtry, short pass filtry, pásmové filtry a dichroické filtry. Každý z těchto filtrů propouští jiné vlnové délky (Cossarizza, et al. 2017).

Jakmile je vyzařena fluorescence jednotlivých fluorochromu, fluorescenční kanály s volitelnou vlnovou délkou analyzovaného signálu je detekují pomocí soustavy optických zrcadel a filtrů (Lochmanová et al., 2017). Díky rozptylu fotonů a fluorescence lze získat přehled o velikosti, tvaru a zrnitosti analyzovaných vzorků, v tomto případě buněk, jelikož jednotlivé směry rozptylu zachycují různé znaky buněk. Přímý směr paprsku zachycuje takzvaný forward scatter detector, přičemž samotný paprsek je úměrný velikosti buněk (Šinkorová a Zárybnická, 2008; Longin et al. 2017). Boční rozptyl paprsku pro změnu zachycuje takzvaný side scatter detector, který odráží vnitřní strukturu částic, jinými slovy, je to takový paprsek světla, jenž je rozptýlen pod devadesátistupňovým úhlem k dopadajícímu paprsku laseru. Samotný výsledek z tohoto detektoru závisí na struktuře povrchu buňky a jejímu počtu organel. Čím různorodější je povrch buňky a čím více organel se v ní nachází, tím vyšší je složitost zaznamenaná detektorem (Laguado, 2007).

Jak detektor přímého směru paprsku, tak detektor bočního rozptylu světla je složen z násobiče a fotonek, jejichž společná konstrukce dává tvar troj – či osmiúhelníku. Trojúhelník je složen z dvou fotonek, které mají násobič detekující záření o vlnové délce 635 nm. Oproti tomu je osmiúhelník složen až z pěti fotonek, které mají násobič detekující záření o vlnové délce 488 nm. Signály z obou druhů konstrukcí násobiče a fotonek jsou následně spektrálně rozděleny dichroickými zrcadly a filtry, které je usměrní na vrstvu příslušných detektorů. Zde se nachází rozhraní optického a elektronického systému, kde bude záření zpracováno (Shapiro, 2003; Marinov, 2008).

5.3.3 Elektronický systém

Jako poslední a z technického hlediska nejsložitější systém průtokového cytometru je elektronika. Tento systém převádí optické signály (fluorescenci a rozptyl) na signály elektronické, ty poté zesiluje, digitalizuje a zpracovává do srozumitelné formy. Formou je grafická prezentace jednotlivých buněk na monitoru řídicího počítače (Šinkorová, Zárubnická, 2008).

Jak již bylo řečeno, tak samotné signály jsou z optiky převedeny na elektrické impulsy, které jsou zpracovány počítačovým programem. Při zpracování je třeba odstranit tzv. konfliktní případy. Jde o případy, kdy byly měřeny dvě buňky najednou. Také je třeba provést kompenzaci přesvitu fluorochromu, tj. kompenzovat překrývání emisních spekter fluorochromu (Roederer, 2001).

Dále je možnost použít formu jednoparametrového histogramu nebo tzv. dvuparametrového dot-plotu. Výsledky měření jsou zobrazovány formou jednoparametrového histogramu, dvou či více parametrového dot-plotu či náročnějšího 3D-grafu (Doležel et al. 2007a). U jednoparametrového histogramu je na ose X vyobrazena intenzita fluorescence a na ose Y nalezneme počet buněk. U dot-plotu máme na ose X intenzitu jednoho signálu a na ose Y intenzitu druhého a jednotlivé částice, neboli impulsy jsou vyobrazené jako tečky (Lochmanová et al., 2017).

5.4 Standardy a barviva

5.4.1 Standardy

Standardy jsou vzorky, u nichž snadno poznáme velikost jejich genomu, protože se používají pro stanovení velikosti jadrového genomu. Hodnocení výsledků určitého genomu totiž není možné, aniž bychom jej neporovnali se standardem, tedy vzorkem, u něž velikost genomu a počet chromozomů již známe. Velikost genomu se totiž zjišťuje tak, že se jádro zkoumaného vzorku a jádro standardu odizolují a společně se na ně použije fluorescenční barvivo. Výsledek se následně vyhodnocuje dle poměru intenzity fluorescence standardu a zkoumaného vzorku (Doležel a Bartoš, 2005; Doležel et al. 2007a;).

Samotná standardizace se dělí na interní a externí. Při externí standardizaci probíhá příprava vzorku a standardu a jejich měření nezávisle na sobě, leč tento postup se příliš nedoporučuje (Doležel et al. 2007a; Suda, 2007). Při interní standardizaci, která je dnes doporučována, jsou vzorky smíchány ve vhodném poměru, přičemž se jejich příprava a měření odehrává souběžně (Doležel a Greilhuber, 2010). Samotná velikost zkoumaného genomu a genomu standardu by se měla podobat, ale ne tolik, aby se píky neboli vrcholy histogramů překrývaly (Johnson et al. 1999). Doporučeným minimálním rozdílem je dvacet procent, ideální je dvojnásobný rozdíl (Doležel et al. 2007b; Suda, 2011). Vhodné je vybrat si takový standard, který je lehký dostupný a v požadovaném množství, přičemž standard a vzorek by měly být podobné, včetně uspořádání chromatinu (Praca-Fontes et al. 2011).

U studií, které se provádějí na hmyzu, se používají standardy ať už z říše rostlin, tak z říše živočichů, např. octomilka obecná (*Drosophila melanogaster*, 1C= 175 Bennett et al. 2003) či šváb americký (*Periplaneta americana*, 1C= 3338 Mb, Hanrahan a Johnson, 2011). Potíž je ovšem v tom, že mezi jednotlivými studii nepanuje shoda v použití jednotlivých standardů, a mnohdy i v jejich C-hodnotách (Doležel et al. 1998; Johnson et al. 1999). Tato neshoda se ve výsledku jeví jako podstatná potíž, jež komplikuje porovnávání jednotlivých výsledků (Doležel a Bartoš, 2005).

Jak již bylo řečeno, standardy mohou být rostlinného i živočišného původu. Pro můj výzkum jsem zvolil rostlinné standardy. Jsou sice více prozkoumané a používají se více let než živočišné, ale ne všechny dosahují potřebné velikosti.

Námi použité standardy jsou:

1. *Solanum pseudocapsicum* (lilek višňový) 2C = 2.61pg
2. *Bellis perennis* (sedmikráska chudobka) 2C = 3.38 pg
3. *Pisum sativum* (hrách setý) 2C = 8.84pg

5.4.2 Barviva

V cytometrii se používají fluorescenční barviva, tzv. fluorochromy. To jsou taková barviva, která absorbují světlo o určité vlnové délce a následně je sama vyzařují o jiné vlnové délce. Některá barviva se tak kupříkladu navážou na specifickou buňkovou strukturu, čímž zvýší fluorescenci. Jedná se třeba o nukleové kyseliny, lipidy nebo proteiny. Samotná barviva musí splňovat několik základních podmínek, a sice rozpustnost ve vodě, fotostabilitu a nízkou toxicitu (Shapiro, 1995).

Samotné fluorochromy se váží na řetězce DNA daného vzorku, a to buďto neselektivně či k oblastem bohatým na A-T báze (popřípadě G-C báze) (Suda, 2011). Mezi neselektivní barviva patří kupříkladu propidium jodid či ethidium bromid. Vzhledem k tomu, že propidium jodid je méně toxický, je používám hojněji a ve větší míře, ostatně při zjišťování velikosti genomu hmyzu bývá nejčastější volbou. Tato barviva se ovšem mohou vázat i na řetězce RNA, pročež je potřeba, aby tato kyselina byla předem naštěpena pomocí ribonukleózy (Adan et al. 2016).

V případě, že požadujeme, aby se barvivo primárně vázalo na úseky bohaté na A-T, použijeme DIPI, DAPI nebo Hoechst barvení (Suda, 2011). Nejoblíbenějším barvivem je právě DAPI, jelikož jeho výsledné histogramy mají vysokou rozlišovací schopnost a jsou užitečné pro zjištění dalších podrobností ohledně struktury genomu (Doležel et al. 1998). Ovšem podle Johnson et al. (1999) toto barvivo není doporučeno pro stanovení množství DNA. Posledním typem barviva, které se používá zřejmě nejméně, jsou ta, co se vážou na úseky bohaté na G-C. Taková barviva jsou kupříkladu olivomycin či chromomycin (Suda, 2011).

5.5 Využití

Jak již bylo zmíněno v úvodu této práce, tato metoda se používá v mnoha oblastech vědy, kupříkladu v molekulární biologii, patologii, virologii (Zamora, Aguilar, 2018) a také v rostlinné a mořské biologii (Murphy et al. 1997). Pomocí této metody lze též odhalit kvasinky, bakterie a viry, které infikovaly buňky. Samotné virové antigeny podléhají detekci buďto na buněčném povrchu, anebo přímo uvnitř infikovaných buněk pomocí protilátek, které jsou schopny takové buňky identifikovat (Laffin et al. 1989; McSharry et al. 1990). Ke studiu hmyzu však není tato metoda doposud dostatečně využívaná a existuje jen malý počet studií, které se zabývají tématem velikosti genomu u vybraných skupin hmyzu, přestože tato metoda nabízí velkou přesnost měření (Suda, 2011).

5.5.1 Stanovení velikosti genomu

Velikost genomu je celkový počet párů bází DNA v jedné kopii haploidního genomu a je unikátní pro každý jednotlivý druh. Samotný obsah DNA v jádře lze vyjádřit buďto v pikogramech, anebo jako celkový počet nukleotidových párů bází (megapár bází), přičemž jeden pikogram se rovná 978 megapárů bází (Doležel et al. 2003). Nejčastěji se velikost genomu jakožto hodnota označuje C-hodnota či C-Value paradox (Gregory, 2005). Existuje mnoho vědeckých oborů, které využívají znalostí C-hodnot, kupříkladu ekologie, systematika či molekulární biologie (Bennett et al. 2000).

Dle slov Hanson et al. (2001), je velikost genomu klíčová hodnota biodiverzity a má velký význam pro studium evoluce. Slouží k: Odlišení druhů se stejným počtem odlišně velkých chromozomů. Určení hybridů, jejichž rodiče se neliší stupněm ploidie. Stanovení složení genomů u allopolyploidních typů, a v neposlední řadě slouží ke zjištění korelací mezi velikostí genomu a dalšími vlastnostmi, jako je chování jedince.

Velikost genomu koreluje s řadou měřitelných charakteristik na úrovni buněk a organismů, včetně velikosti buněk, rychlosti dělení buněk a v závislosti na taxonu, velikost těla, rychlosti metabolismu, rychlosti vývoje, složitosti orgánů, zeměpisného rozšíření nebo rizika vyhynutí (Bennett, Leitch, 2005; Gregory, 2005).

S nástupem různých molekulárních technik za posledních 50 let byly analyzovány velikosti genomu tisíců zástupců z řad **eukaryot**. Tato data jsou k dispozici v online databázích, jako je např. www.genomesize.com. Zde nalezneme jedince z řad hub, rostlin či živočichů (Gregory et al. 2007).

Velikost genomu se u různých druhů velmi liší. Bezobratlí živočichové mají většinou malé genomy, což také souvisí s malým počtem transponovatelných prvků. Ryby a obojživelníci mají středně velké genomy a ptáci mají relativně malé genomy (Zhou et al. 2020). Velikosti genomu se mezi eukaryotickými druhy enormně liší. U zvířat se pohybují v rozmezí více než 3300 pg a u suchozemských rostlin se liší asi o 1000 pg (Bennett, Leitch, 2005; Gregory, 2005).

6 Metodika

6.1 Získání hmyzího materiálu

Z důvodu ne příliš vhodných klimatických podmínek pro oba řády byli někteří jedinci dovezeni z jejich přirozeného prostředí (Řecko, Afrika, Asie, Madagaskar) či zakoupeni na teraristických burzách nebo od chovatelů (např. www.zivaexotika.cz; www.ifauna.cz).

Pro správné měření je nutné, aby byl živý hmyz dopraven do laboratoře. Je důležité, aby hmyz dorazil co možná v nejlepším stavu (bez poškození a živý). Tyto podmínky následně ovlivňují výsledky měření. Pokud víme, že měření nemůže proběhnout v blízké době a exemplář by mohl uhynout, musíme přikročit k co možná nejlepšímu zakonzervování vzorku. Vzorek (např. končetiny, tykadla apod.) je potřeba umístit do epruvety a na sucho zmrazit. Je třeba podotknout, že takto zakonzervované vzorky se projevily jako plně funkční a jsou nespornou výhodou při zpětném opakovaném měření (tkáně ihned neodumírají).

6.2 Příprava analyzovaných vzorků

Při přípravě materiálu jsem se řídil postupem, který uvádí Koutecký (2012) ve své publikaci o průtokové cytometrii v botanice.

Při přípravě hmyzího materiálu a následném měření průtokovým cytometrem byly využity živé i zmražené vzorky.

Hlavním záměrem při přípravě materiálu je získání suspenze z neporušených buněčných jader vzorku a standardu (Loureiro et al. 2006).

Jako první odizolujeme jádra standardu a hmyzího materiálu pomocí žiletky. Vezmeme menší kus rostlinného standardu (u kterého je známa velikost genomu) asi o velikosti 0.2 až 0.5 cm² a položíme ji do Petriho misky s jednou až dvěma končetinami námi studovaného hmyzu. Při získávání končetin u skupiny *Mantodea* si musíme dát pozor na jejich ostré loupeživé končetiny. Zde se vyplatí si daný vzorek nejdříve zmrazit v lednici, aby byl subjekt znehybněn. Velikost použitého standardu volíme menší než velikost vzorku. Volíme tak, aby se nám v histogramu ukázal větší pík sledovaného vzorku.



Obrázek 6: Izolace jader pomocí žiletky (foto autor, 2020)

Když máme standart i vzorek v Petriho misce, je nutné přidat pufer Otto I. o objemu 550 ml pomocí pipety. Nyní je třeba celý obsah Petriho misky rozsekat žiletkou na co nejmenší části. Pro každou suspenzi ze zkoumaného hmyzu máme připravené dvě zkumavky, a to z důvodu ověření výsledků analýzy. Vzniklou suspenzi je třeba pomocí pipety nasát a následně do připravené zkumavky přefiltrujeme suspenzi přes nylonové plátno. Je třeba dbát, aby nylonovým plátnem neprošly větší kusy, které by mohly ohrozit správnost měření. Po zkontrolování správnosti filtrování můžeme přistoupit k přidání fluorescenčního barviva.

6.3 Příprava barviva

Při přípravě fluorescenčního barviva jsem se řídil podle Doležela a kol. (2007).

Na fluorescenční roztok budeme potřebovat 25 ml pufru Otto II., který přidáme do připravené nádoby. Následně do ní přidáme 1 ml PI (propidium jodid) a RNA (Ribonukleová kyselina). Tyto dvě přísady se uschovávají v eppendorfkách, v mrazáku, a proto je potřeba počkat na jejich rozmrazení. Jako poslední přidáme do nádoby 44 μ l 2-mercapethanolu. Toto výsledné barvivo přidáme k již vytvořené suspenzi jader v objemu 1ml.

Příprava Otto I. (Otto 1990)

Příprava vyžaduje 0.1 M monohydrát kyseliny citronové (4,2 g), 0.5 % Tween 20 (1 ml). Tyto dvě složky se rozpustí v destilované vodě. Vzniklý roztok přelijeme do baňky a doplníme destilovanou vodou. Poté se filtruje přes filtr. Tento pufer se skladuje v lednici při teplotě přibližně 4°C. Hlavní látkou, kterou obsahuje pufer Otto I., je kyselina citronová. Tato kyselina slouží k fixaci izolovaných jader a zlepšuje prostupnost barviv ke chromatinu. Druhou látkou je zde Tween 20. Jde o polyoxoethylensorbitanmoholaurát. Tento detergent zapříčiní rozrušení cytoplazmy a uvolnění jader. Také snižuje shlukování zbytků cytoplazmy a jádra a rozptýluje chloroplasty (Doležel a kol. 2005).

Příprava Otto II. (Doležel a kol. 1995)

Příprava vyžaduje destilovanou vodu a 0,4 M dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného (28,65 g). Rozpuštěnou sůl přelijeme do baňky a dolejeme destilovanou vodou. Nakonec přefiltrujeme přes filtr a skladujeme v temném prostředí při pokojové teplotě. Pro udržení iontové síly se v pufru nacházejí ionty hydrogenfosforečnanu sodného (Doležal a kol. 2005).

6.4 Analýza dat

Samotná analýza průtokovým cytometrem Apogee A60 není nijak složitá. Pouze je třeba udělat několik věcí před zapnutím:

- 1) Zkontrolovat nádobu na destilovanou vodu (sheat fluid). Pokud v ní není dostatek vody, je třeba jí doplnit společně s 500 μ l ProClinu.
- 2) Zkontrolovat odpadovou nádobu, kam odtéká měřená suspenze. Pokud je plná, je nutné ji vyprázdnit.
- 3) Zkontrolovat, zda se sampleport nachází v poloze pro propláchnutí. Je důležité, aby mohlo dojít ihned po zapnutí k automatickému propláchnutí.

Když máme všechny potřebné věci zkontrolované, můžeme přistoupit k zapnutí ApogeeFlow FCM control. Nyní proběhne automatické propláchnutí a poté se nám spustí Apogee Histogram software

Ještě než se pustíme do finálního měření našeho vzorku, je třeba do softwaru nahrát data našeho standardu, se kterým je náš vzorek nasekán. Standard jsme zvolili dle přibližné znalosti velikosti genomu daného druhu nebo čeledi. Tyto údaje jsme mohli nalézt v databázi na portálu www.genomsize.com.

Po nahrání dat o našem standardu do programu Apogee vložíme zkumavku se vzorkem do sampleportu. Z toho si cytometr nasaje 150 μ l a změří asi 90 μ l. Po pár vteřinách se nám začnou objevovat první body na histogramech.

Soustředíme se pouze na dva histogramy, které jsou pro nás důležité. Jde o histogram 532 Grn (Area) vs. count a histogram 532 Grn vs. 532 LALS (area-peak).

Histogram 532 Grn vs. count zobrazuje fluorescenci na 1024 kanálech. V tomto histogramu se nám zobrazí tzv. peaky. Jde o Gaussovské křivky fluorescenčně měřených částic. Histogram 532 Grn vs. 532 LALS nám zobrazuje boční rozptyl (side scatter), který analyzuje rozptyl paprsku laseru. Díky tomuto histogramu dokážeme určit tvar našich měřených částic.

6.4.1 Nastavení parametrů

Nastavení parametrů je velice důležité pro správný výpočet velikosti genomu daného vzorku. Během samotné analýzy vidíme v histogramu různě neuspořádané částice. Tyto částice nám vytvářejí šum a analýza je díky nim méně přesná. V side-scatter můžeme nastavit oblast našeho zájmu. Této oblasti se jinak říká ROI neboli region of interest.

Po nahrání našeho standardu se však tato oblast automaticky nastaví na oblast našich dvou peaků (standard a vzorek), a není potřeba s ní manipulovat. Pokud bychom si přeci jen všimli šumu okolo peaku, není problém tuto oblast poupravit. Jednoduše změníme oblast ořezu, čímž se vyhneme zhoršenému zobrazení peaků, a tím pádem i kvality měření. Důležité je na začátku rozlišit, který peak patří standardu, a který zkoumanému vzorku hmyzu. Díky nahrání dat o standardu víme přibližnou pozici peaku standardu, a proto je pro nás jednodušší tyto pozice rozlišit.

Zásadním parametrem, který musíme během analýzy sledovat, je tzv. variační koeficient (CV). Tento parametr nám udává přesnost měření a vypočítáme ho jako podíl směrodatné odchylky a přímé pozice peaku. Pohybuje se v rozmezí od 1 až 10%, ale ideálně by se měl pohybovat kolem 3%. Bohužel často při analýze rostlin je velikost větší a tento parametr někdy není možné ovlivnit.

Dále je důležité nastavení rychlosti analyzované suspenze. Nejčastěji se vzorky analyzují při rychlosti 6-10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Problém nastává v případě, kdy se v suspenzi nachází velký či malý počet jader. Tehdy je potřeba rychlost snížit, eventuálně zvýšit. Je třeba ale mít na zřeteli, že při rychlejší sekvenci dochází ke snížení kvality měření. Samotné nastavení nalezneme v záložce Control-Sample $\mu\text{l}/\text{min}$.

Během analýzy je někdy potřeba hýbat s peaky na ose x. Tato osa nám zobrazuje fluorescenci. V záložce PMT můžeme upravit hodnotu 532 Grn a pohnout osou x směrem doprava či doleva. Toto nastavení uvítáme hlavně u vzorků s výrazně větší či menší velikostí, než je náš standard. Díky většímu počtu rostlinných standardů, u kterých je známa velikost genomu, tuto funkci nemusíme používat, ale radši můžeme vytvořit nový vzorek se silnějším či slabším standardem.

6.4.2 Vyhodnocení výsledků

Pro vyhodnocení výsledků je nutné výsledné měření uložit formou histogramu. Před uložením ale zkontrolujeme peak. Je nutné, aby byl symetrický, ve středu úseček, které ohraničují daný gate. Po uložení si otevřeme data v Excelu, kde s nimi budeme moci pracovat. V samotné tabulce se pak nacházejí údaje o standardu, vzorku hmyzu, který jsme zkoumali, variačním koeficientu (6-CV, 4-CV), fluorescenci vzorku (6-mean, 4-mean) a analyzovaných částicích (6-events, 4-events). Počet analyzovaných částic, tzv. events nám udává počet analyzovaných jader. Všechny tyto údaje jsou pro výsledné vyhodnocení velice důležité.

6.4.3 Výpočet velikosti genomu

Pro výpočet neznámé velikosti genomu podle Doležel a kol. (2007) budeme potřebovat informaci jak o fluorescenci vzorku, tak standardu. Tyto dva údaje dáme do poměru a vynásobíme je známou velikostí genomu standartu.

$$\mathbf{VG}_{\text{neznámý}} = \mathbf{VG}_{\text{standart}} \mathbf{X} (\mathbf{PI}_{\text{neznámý}} / \mathbf{PI}_{\text{standart}})$$

6.5 Statistické zpracování výsledků

Všechny mnou naměřené hodnoty byly statisticky zpracovány v programu RStudio (verze 3.6.1).

Pro zjištění signifikantního rozdílu mezi naměřenými hodnotami jsem používal Anova test. Pokud byla potvrzena hypotéza signifikantního rozdílu, zvolil jsem pro jeho konkrétní zobrazení Tukeyho HSD test. Ten nám zobrazil, které druhy se mezi sebou signifikantně liší a které ne. Pro výsledné zobrazení porovnání velikostí genomu jsem použil boxploty.

7 Výsledky

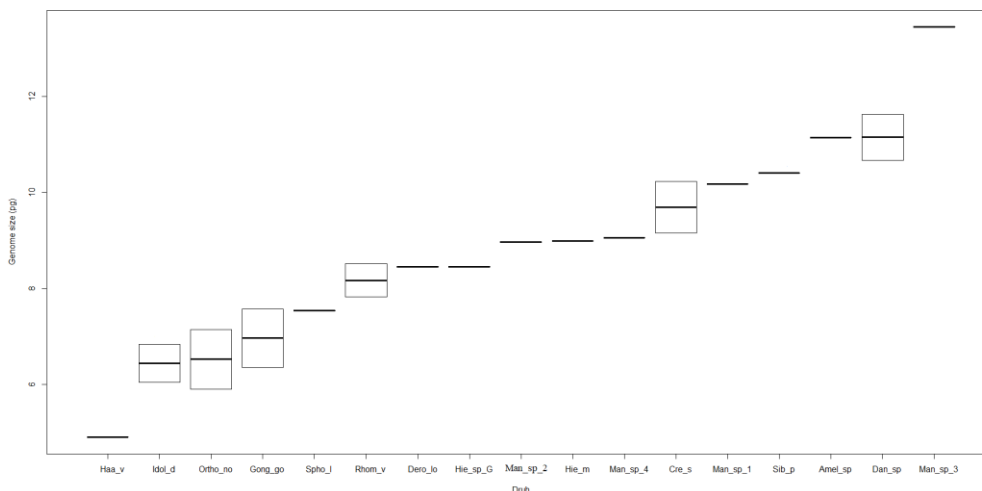
7.1 Řád Mantodea

Celkově bylo změřeno 23 jedinců ze čtyř čeledí. Pohlaví je známo u dvanácti jedinců. U zbylých jedinců se nepodařilo určit pohlaví z důvodu nedospělého stádia nymfy. Bohužel se také nepodařilo determinovat sedm jedinců ze dvou čeledí. Tyto jedinci nesou pouze název *Mantidae* sp. 1,2,3,4 a *Danuria* sp., *Creobroter*, u kterých je známo pohlaví.

Tabulka 1: Tabulka zobrazuje naměřené hodnoty velikosti genomu u všech námi změřených jedinců z řádu Mantodea. Hodnoty genomu jsou uváděny v pg (1pg=978 Mbp).

Čeď	Druh	Lat.zkr graf	Velikost genomu (pg)	Pohlaví	Čeď	Druh	Lat.zkr graf	Velikost genomu (pg)	Pohlaví
<i>Empusidae</i>	<i>Gongylus gongyloides</i>	Gong_co	6,35	Male	<i>Mantidae</i>	<i>Hierodula</i> sp. Golden	Hie_sp_G	8,45	-
<i>Empusidae</i>	<i>Gongylus gongyloides</i>	Gong_co	7,57	Female	<i>Mantidae</i>	<i>Mantidae</i> sp.1	sp_1	10,18	-
<i>Empusidae</i>	<i>Idolomantis diabolica</i>	Idol_d_sp	6,04	-	<i>Mantidae</i>	<i>Mantidae</i> sp.2	sp_2	8,97	-
<i>Empusidae</i>	<i>Idolomantis diabolica</i>	Idol_d	6,83	-	<i>Mantidae</i>	<i>Mantidae</i> sp.3	sp_3	13,45	-
<i>Hymenopodidae</i>	<i>Creobroter</i>	Cre_s	9,15	Male	<i>Mantidae</i>	<i>Mantidae</i> sp.4	sp_4	9,05	-
<i>Hymenopodidae</i>	<i>Creobroter</i>	Cre_s	10,23	Female	<i>Mantidae</i>	<i>Orthodera novaezealandiae</i>	Ortho_no	5,9	Male
<i>Hymenopodidae</i>	<i>Sibylla pretiosa</i>	Sib_p	10,41	Female	<i>Mantidae</i>	<i>Orthodera novaezealandiae</i>	Ortho_no	7,14	Female
<i>Mantidae</i>	<i>Ameles spallanzania</i>	Ame_l_sp	11,14	-	<i>Mantidae</i>	<i>Rhombodera valida</i>	Rhom_v	8,51	-
<i>Mantidae</i>	<i>Danuria</i> sp	Dan_sp	10,67	Male	<i>Mantidae</i>	<i>Rhombodera valida</i>	Rhom_v	7,82	Female
<i>Mantidae</i>	<i>Danuria</i> sp	Dan_sp	11,63	Female	<i>Mantidae</i>	<i>Sphodromantis lineola</i>	Spha_l	7,54	-
<i>Mantidae</i>	<i>Deroplatys lobata</i>	Dero_lo	8,45	Female	<i>Thespidae</i>	<i>Haania vitalisi</i>	Haa_v	4,89	Female
<i>Mantidae</i>	<i>Hierodula membranacea</i>	Hie_m	8,99	-					

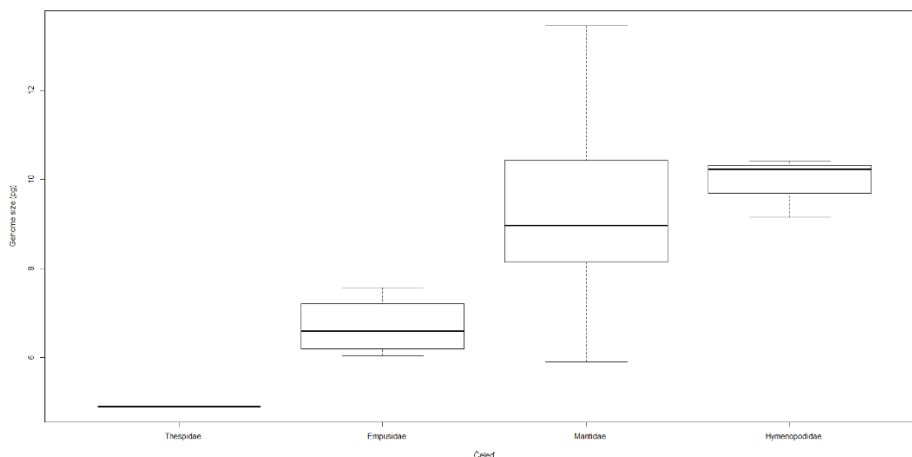
V tabulce č. 1 můžeme vidět všechny naměřené hodnoty velikosti genomu a pohlaví jedince, které jsou seřazeny dle čeledi. Hodnoty se pohybují od $2C= 4,89$ pg samičky druhu *Haania vitalisi* po $2C= 13,45$ pg mnou bohužel neurčeného jedince z čeledě *Mantidae*. Mezi daty můžeme vidět menší variabilitu. Pro zjištění signifikantního rozdílu jsem použil Anova test (viz příloha č. 1) který rozdíl potvrdil, a sice právě mezi dvěma druhy, které jsou uvedeny výše v textu. Tabulka také uvádí latinskou zkratku, která je použita níže v boxplotu (obr. č. 7), jenž zobrazuje srovnání velikosti genomu od nejmenší hodnoty po největší.



Obrázek 7: Porovnání námi všech změřených jedinců řádu Mantodea dle posloupnosti (nejmenší->největší)

Porovnání velikosti genomu mezi jednotlivými čeledi

Tabulka č. 1 nám také zobrazuje porovnání relativní velikosti genomu mezi všemi čeleděmi. Hodnoty velikosti genomu jednotlivých čeledí byly poté použity pro vytvoření boxplotu (obr. č. 8), který je seřazen dle průměru ze všech hodnot jednotlivých čeledí. Pro zjištění signifikantního rozdílu jsem opět použil Anova test (viz příloha č. 2), který rozdíl mezi čeleděmi potvrdil.



Obrázek 8: Porovnání velikosti genomu mezi jednotlivými čeledi řádu Mantodea.

Z čeledě Thespidae se mi podařilo bohužel změřit pouze samičku druhu *Haania vitalisi*. Velikost jejího genomu je $2C= 4,89$ pg.

Z čeledi Empusidae byly změřeny dva druhy a dohromady čtyři jedinci. Jedná se o samečka a samičku druhu *Gongylus gongylodes*. Samička má velikost genomu $2C= 7,57$ pg, kdežto u samečka byla zjištěna velikost genomu $2C= 6,35$ pg. Rozdíl mezi těmito pohlavími je 1,22 pg, což poukazuje na velmi signifikantní rozdíl mezi pohlavími. Dále jsem zjistil velikost genomu dvou jedinců druhu *Idolomantis diabolica*. Velikost jejich genomu je $2C= 6,04$ pg a $2C= 6,83$ pg. Výsledný rozdíl mezi hodnotami je 0,79 pg, což značí menší signifikantní rozdíl.

Největší rozptyl hodnot můžeme pozorovat u čeledi Mantidae. Tato čeleď je nejpočetnější měřenou skupinou. Změřených bylo 15 jedinců. Naměřené hodnoty velikosti genomu se pohybovaly od $2C= 5,9$ pg u samečka druhu *Orthodera novaezealandiae*, až po $2C= 13,45$ pg mnou bohužel neurčeného jedince z této čeledě nesoucí název *Mantidae* sp.3.

Z čeledi Hymenopodidae byli změřeni 3 jedinci, a to *Sibylla pretiosa* z rodu *Sibylla* a samec se samicí rodu *Creobroter*. U tohoto druhu bylo velmi obtížné definovat jeho druhové jméno, proto jsem použil pouze název rodu. Samička rodu *Creobroter* má velikost genomu $2C= 10,23$ pg a sameček $2C= 9,15$ pg. Rozdíl mezi pohlavími je 1,08 pg, což značí vysoce signifikantní rozdíl. Samičce druhu *Sibylla pretiosa* byla zjištěna velikost genomu $2C= 10,41$ pg, což je pouze o 0,18 pg více než u samice rodu *Creobroter*. Tento rozdíl mezi měřenými samicemi dvou odlišných rodů je neprůkazný.

Největší rozptyl hodnot tedy můžeme pozorovat pouze u čeledi Mantidae. Naopak mezi čeleděmi Empusidae, Hymenopodidae a Thespidae není tolik viditelný rozptyl hodnot. Je to z důvodu velmi podobného genomu u všech jedinců z dané čeledě či pouze jediným jedincem u čeledi Thespidae.

Porovnání velikosti genomu na základě ekologických vlastností jedince

V tabulce č. 2 můžeme vidět přehledně seřazené všechny známé informace měřených druhů. Tabulka je seřazena dle jednotlivých čeledí a vedle jednotlivých druhů můžeme vidět velikost jejich genomu uvedenou v pikogramech (1 pg = 978 Mbp), pohlaví, rozptyl velikosti jedince uvedený v cm, původní oblast výskytu druhu, délku života vyjádřenou v měsících a typ zbarvení jedinců. V této tabulce nejsou uvedeny 4 jedinci z čeledě Mantidae. Konkrétně se jedná o *Mantidae* sp.1,2,3,4. Důvod jejich nezařazení je již zmiňovaný problém s determinací. Výjimku tvoří rod *Danuria* a *Creobroter*, kde sice známe pohlaví jedinců, ale neznáme druhové jméno. Z toho důvodu bohužel známe pouze oblast výskytu druhu a typ zbarvení u rodu *Danuria*.

Tabulka 2: Tabulka znázorňuje ekologické vlastnosti všech měřených jedinců rodu Mantodea.

Čeď	Rod	Druh	Velikost genomu (pg)	Pohlaví	Rozptyl velikosti jedince (cm)		Oblast původu	Délka života (měsíce)		Zbarvení
					Female	Male		Female	Male	
Empusidae	Gongylus	Gongylus gongyloides	7,57	Female						
Empusidae	Gongylus	Gongylus gongyloides	6,35	Male	10	9	JV. Asie	15	6 až 7	Maskování
Empusidae	Idolomantis	Idolomantis diabolica	6,83	-						
Empusidae	Idolomantis	Idolomantis diabolica	6,04	-	13	10	Afrika	10 až 12	10 až 12	Výrazné
Hymenopodidae	Creobroter	Creobroter	10,23	Female	4 až 4,5	3,5 až 4	Vietnam	8 - 10	5	Výrazné
Hymenopodidae	Creobroter	Creobroter	9,15	Male						
Hymenopodidae	Sibylla	Sibylla pretiosa	10,41	Female	5 až 6	4 až 5	Afrika	9 až 11	8 až 9	Maskování
Mantidae	Ameles	Ameles spallanzania	11,14		1,8 až 4	1,8 až 4	Středomoří	-	-	Maskování
Mantidae	Danuria	Danuria sp	11,63	Female						
Mantidae	Danuria	Danuria sp	10,67	Male			Afrika			Maskování
Mantidae	Deroplatys	Deroplatys lobata	8,45	Female	9	4,5 až 5	Indonésie	8 až 10	3 až 3,5	Maskování
Mantidae	Hierodula	Hierodula membrane	8,99	-			JV. Asie			
Mantidae	Hierodula	Hierodula sp. Golden	8,45	-	8 až 9	7 až 8	Indonésie	10 až 12	6 až 7	Výrazné
Mantidae	Orthodera	Orthodera novaezealandiae	7,14	Female						
Mantidae	Orthodera	Orthodera novaezealandiae	5,9	Male	3,5 až 4	3,5 až 4	Nový Zéland			Maskování
Mantidae	Rhombodera	Rhombodera valida	8,51	-						
Mantidae	Rhombodera	Rhombodera valida	7,82	Female	10 až 11	9	Indie	20 až 24	15 až 18	Maskování
Mantidae	Sphodromantis	Sphodromantis lineola	7,54	-	8	6	Afrika	7 až 8	3	Maskování
Thespidae	Haania	Haania vitalisi	4,89	Female	cca 2	cca 2	JV. Asie			Maskování

Tabulka č. 2 zobrazuje jeden z cílů mé práce, a sice porovnání velikostí genomu a ekologických vlastností daného jedince řádu Mantodea. Kvůli problémům s určením pohlaví u 7 jedinců z důvodu nedospělého stádia nymfy nelze zcela určit, zda pohlaví a délka těla některých jedinců ovlivňuje i velikost genomu.

U zbylých 12 jedinců, ze kterých je 8 samic a 4 samci, rozdíl v jejich velikosti a velikosti genomu naznačuje, že s rostoucí délkou těla roste i genom. Největší rozdíl velikosti genomu mezi pohlavími je 1,24 pg u samice a samce druhu *Orthodera novaezealandiae*. Poté následuje samice a samec druhu *Gongylus gongyloides* s rozdílem 1,22 pg. Jako poslední s rozdílem 1,08 pg je pár rodu *Creobroter*. U všech pohlaví se jedná o signifikantní rozdíl. Největší velikost genomu mezi druhy se zjištěným pohlavím má samička druhu *Sibylla pretiosa*, 2C= 10,41 pg a samička rodu *Creobroter*, 2C= 10,23 pg.

Naopak nejmenší genom u jedinců se známým pohlavím nalezneme u samečka druhu *Orthodera novaezealandiae*, $2C= 5,9$ pg a samičky druhu *Haania vitalisi*, $2C= 4,89$ pg. Žádný jiný významnější rozdíl mezi pohlavími a velikostí genomu jedinců nenalezneme. Je ale zřejmé z mých měření, že samci z páru mají menší genom než samice.

Při bližším prozkoumání délky životního cyklu jedinců a velikosti genomu u řádu Mantodea se můžeme domnívat, že velikost genomu může být ovlivněna i délkou života. Toto tvrzení však naše data příliš nepotvrzují.

Z tabulky č. 2 se také můžeme dozvědět původní oblasti výskytu druhů. V našem případě pochází většina druhů z domácích chovů a pouze minimum je z volné přírody. Z tohoto důvodu nemůžeme posuzovat, zda má původní oblast výskytu druhu vliv na velikost genomu.

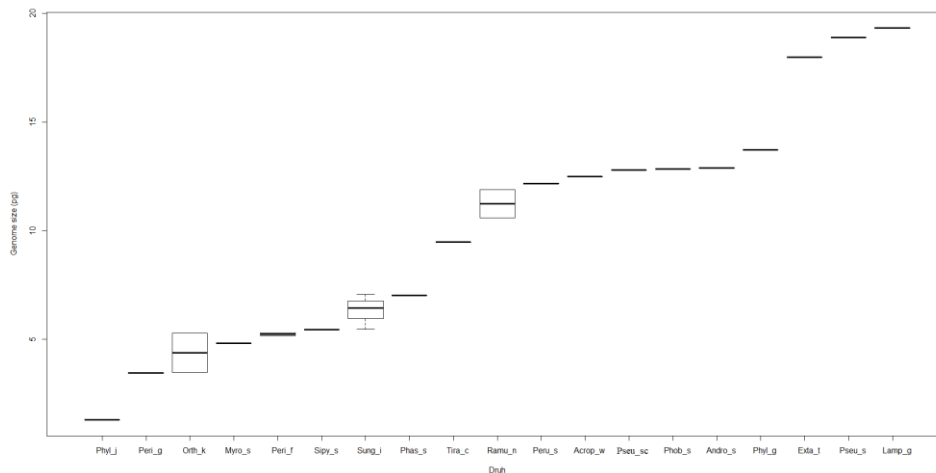
7.2 Řád Phasmatodea

Celkově bylo změřeno 24 jedinců z šesti čeledí. Pohlaví je známo u dvanácti jedinců. U zbylých jedinců se nepodařilo určit pohlaví z důvodu nedospělého stádia nymfy. Bohužel se také nepodařilo determinovat jednoho jedince z čeledi Phasmatida. Tento jedinec nese pouze název *Phasmatidae* sp.1.

Tabulka 3: Tabulka zobrazuje naměřené hodnoty velikosti genomu u všech námi změřených jedinců z řádu Phasmatodea. Hodnoty genomu jsou uváděny v pg (1pg=978 Mbp).

Čeď	Druh	Lat.zkr graf	Velikost genomu	Pohlaví	Čeď	Druh	Lat.zkr graf	Velikost genomu (pg)	Pohlaví
Aschiphasmatidae	<i>Orthomeria kangii benguet</i>	Orth_k	3,49	Male	Phasmatidae	<i>Periphetes forcipatus</i>	Peri_f	5,30	Female
Aschiphasmatidae	<i>Orthomeria kangii benguet</i>	Orth_k	5,29	Female	Phasmatidae	<i>Periphetes graniferum</i>	Peri_g	3,46	Male
Diapheromeridae	<i>Andropromachus scutatus</i>	Andro_s	12,88	-	Phasmatidae	<i>Phasmatidae</i> sp.1	Phas_s	7,02	-
Diapheromeridae	<i>Sipylloidea sipylus</i>	Sipy_s	5,45	Female	Phasmatidae	<i>Phobaeticus serratipes</i>	Phob_s	12,83	Male
Heteropterygidae	<i>Sungaya inexpectata</i>	Sung_j	5,46	Male	Phasmatidae	<i>Ramulus nematodes</i>	Ramu_n	10,59	-
Heteropterygidae	<i>Sungaya inexpectata</i>	Sung_i	6,45	Female	Phasmatidae	<i>Ramulus nematodes</i>	Ramu_n	11,90	Female
Heteropterygidae	<i>Sungaya inexpectata part.</i>	Sung_j	7,08	Female	Phasmatidae	<i>Tirachioidea cantori</i>	Tira_c	9,49	-
Phasmatidae	<i>Acrophylla wuelfingi</i>	Acrop_w	12,49	-	Phylliidae	<i>Phyllium giganteum</i>	Phyl_g	13,72	-
Phasmatidae	<i>Extatosoma tiaratum</i>	Extat_t	17,99	-	Phylliidae	<i>Phyllium jacobsoni</i>	Phyl_j	1,29	-
Phasmatidae	<i>Lamponius guerini</i>	Lamp_g	19,32	-	Pseudophasmatidae	<i>Peruphasma schultzei</i>	Peru_s	12,17	-
Phasmatidae	<i>Myronides sp peleng</i>	Myro_s	4,82	Female	Pseudophasmatidae	<i>Pseudophasma scabriusculum</i>	Pseu_sc	12,79	-
Phasmatidae	<i>Periphetes forcipatus</i>	Peri_f	5,18	Male	Pseudophasmatidae	<i>Pseudophasma subapterum</i>	Pseu_s	18,88	-

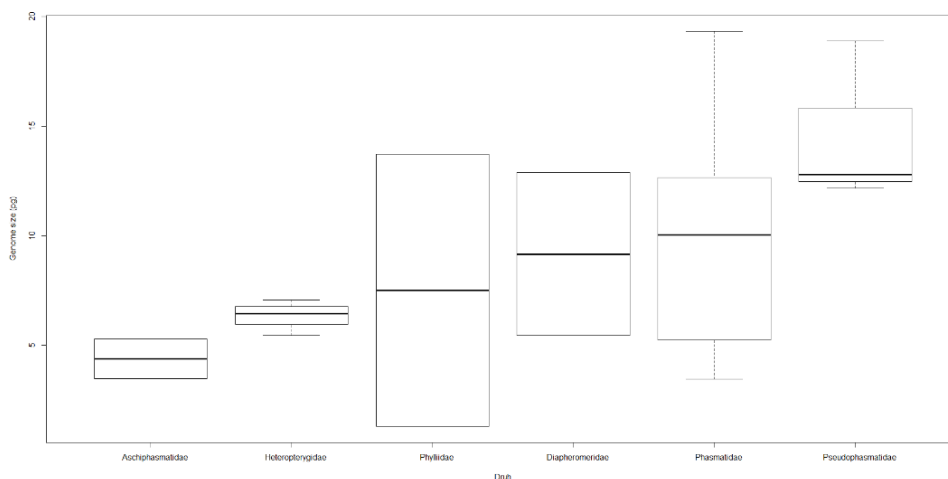
V tabulce č. 3 můžeme vidět všechny naměřené hodnoty velikosti genomu a pohlaví jedinců, které jsou seřazeny dle čeledi řádu Phasmatodea. Naměřené hodnoty velikosti genomu se pohybují od $2C= 1,29$ pg druhu *Phyllium jacobsoni* až po $2C= 19,32$ pg druhu *Lamponius guerini*. Mezi daty je patrná jistá variabilita. Tato variabilita je rozepsána níže při zkoumání každé čeledě zvlášť. Pro zjištění signifikantního rozdílu mezi druhy jsme použili Anova test (viz příloha č. 3), který rozdíl potvrdil, a sice mezi druhy *Phyllium jacobsoni*, *Ramulus nematodes* a *Lamponius guerini*. Tabulka také uvádí latinskou zkratku, která je použita níže v boxplotu (obr. č. 9), jenž zobrazuje srovnané velikosti genomu od nejmenší hodnoty po největší.



Obrázek 9: Porovnání námi všech změřených jedinců řádu Phasmatodea dle posloupnosti (nejmenší->největší)

Porovnání velikosti genomu mezi jednotlivými čeledi

Tabulka č. 3 nám také zobrazuje porovnání relativní velikosti genomu mezi všemi čeledmi. Hodnoty velikosti genomu jednotlivých čeledí byly poté použity pro vytvoření boxplotu (obr. č. 10), který je seřazen dle průměru ze všech hodnot jednotlivých čeledí. Pro zjištění signifikantního rozdílu jsme použili Anova test, který rozdíl mezi čeledmi nepotvrdil.



Obrázek 10: Porovnání velikosti genomu mezi jednotlivými čeledi řádu Mantodea.

Z čeledě Aschiphasmatidae byl změřen pouze jeden druh, a to strašilka *Orthomeria kangi benguet* z rodu *Orthomeria*. Jedná se o samce a samici. Samice má velikost genomu $2C = 5,29$ pg a samec $2C = 3,49$ pg. Rozdíl mezi pohlavími je 1,8 pg, což značí významný rozdíl.

Z čeledi *Heteropterygidae* známe velikost genomu 3 jedinců rodu *Sungaya*. Jde o dvě samičky a jednoho samečka, přičemž jedna ze samiček pochází z vajíčka od partenogeneticky se rozmnožující samičky. Sameček druhu *Sungaya inexpectata* má velikost genomu $2C= 5,46$ pg. Samička má velikost genomu $6,45$ pg. Rozdíl mezi těmito dvěma jedinci je $0,99$ pg. Samička pocházející z partenogenetického vajíčka má velikost genomu $7,08$ pg. Rozdíl mezi samičkami je $0,63$ pg. Bohužel z nedostatku vzorků nelze posoudit, zda je velikost samic pocházejících od partenogeneticky se rozmnožujících samiček větší než u samic rozmnožujících se pohlavně.

Z čeledi Phylliidae, do které spadají lupenitky, byly změřeny dva druhy, a sice *Phyllium giganteum*, u které byla velikost genomu $2C= 13,72$ pg, a *Phyllium jacobsoni*, u kterého jsme naměřili $2C= 1,29$ pg. Rozdíl mezi těmito druhy je $12,43$ pg, což je vysoce signifikantní rozdíl. Pohlaví se bohužel nepodařilo u těchto druhů určit.

Z čeledě *Diapheromeridae* byly změřeny druhy *Sipyloidea sipylus* a *Andropromachus scutatus*. Oba pochází z jiného rodu. Pohlaví je však známo pouze u *Sipyloidea sipylus*. Velikost genomu u *Andropromachus scutatus* z rodu *Andropromachus* je $2C= 12,88$ pg. Samička druhu *Sipyloidea sipylus* z rodu *Sipyloidea* má velikost genomu $2C= 5,45$ pg. Rozdíl mezi těmito druhy je $7,43$ pg, což značí vysoký signifikantní rozdíl velikosti genomu.

Největší rozptyl hodnot můžeme pozorovat u čeledi Phasmatidae. Tento velký rozptyl hodnot je způsoben velkým rozšířením druhů po světě. Díky tomu může na genom působit více faktorů. Naměřené hodnoty velikosti genomu se u této čeledě pohybovaly od $2C= 3,46$ pg u samce druhu *Periphetes graniferum*, po $2C= 19,32$ pg u jedince druhu *Lamponius guerini*. Naměřené hodnoty mají větší rozptyl, což nám umožňuje vidět rozdíl velikosti genomu mezi druhy. Výsledky jsme proto otestovali pomocí Anova testu (viz příloha č. 4), který nám potvrdil signifikantní rozdíl mezi výše zmíněnými druhy z této čeledě.

V čeledi Pseudophasmatidae byli změřeni 3 jedinci od 3 druhů strašilek. Nejmenší genom má druh *Peruphasma schultei*, a to $2C= 12,17$ pg. Velmi podobnou velikost genomu má *Pseudophasma scabriusculum panguana* $2C= 12,79$ pg. Největší genom z této skupiny má *Pseudophasma subapterum*, a sice $2C= 18,88$ pg. Z naměřených výsledků lze pozorovat významný rozdíl v rodě *Pseudophasma*. Rod *Peruphasma* se tolik významně neliší v porovnání s *Pseudophasma scabriusculum panguana*.

Největší rozptyl hodnot tedy můžeme pozorovat pouze u čeledi Phasmatidae. Další výrazné rozdíly můžeme pozorovat u čeledi Diapheromeridae, Phylliidae a Pseudophasmatidae. Naopak mezi čeleděmi Aschiphasmatidae a Heteropterygidae není tolik viditelný rozptyl hodnot. Je to z důvodu velmi podobné hodnoty genomu u všech jedinců z dané čeledě.

Porovnání velikosti genomu na základě ekologických vlastností jedince

V tabulce č. 4 můžeme vidět první část přehledně seřazených informací týkajících se měřených druhů řádu Phasmatodea. Tabulka je seřazena dle jednotlivých čeledí a vedle jednotlivých druhů můžeme vidět velikost jejich genomu uvedenou v pikogramech (1 pg = 978 Mbp), pohlaví, rozptýl velikosti jedince uvedený v cm, původní oblast výskytu druhu, délku života vyjádřenou v měsících. V této tabulce není uveden jeden jedinec z čeledě Phasmatidae. Konkrétně se jedná o *Phasmatidae sp.1*. Důvod jeho nezařazení je již zmiňovaný problém s determinací.

Tabulka 4: První část ekologických vlastností všech měřených jedinců rodu Phasmatodea.

Čeď	Rod	Druh	Velikost genomu (pg)	Pohlaví	Rozptýl velikosti jedince (cm)		Oblast původu	Délka života (měsíce)	
					Female	Male		Female	Male
Aschiphasmataidae	Orthomeria	<i>Orthomeria kangii benguet</i>	5,29	Female			Filipíny	4	1,5
Aschiphasmataidae	Orthomeria	<i>Orthomeria kangii benguet</i>	3,49	Male	5,5	4,5			
Diapheromeridae	Andropromachus	<i>Andropromachus scutatus</i>	12,88	-	6 - 7	4,5 - 5	Vietnam	-	-
Diapheromeridae	Sipylodea	<i>Sipylodea sipylus</i>	5,45	Female	10	6 - 7	Vietnam	10 - 12	10 - 12
Heteropterygidae	Sungaya	<i>Sungaya inexpectata</i>	6,45	Female					
Heteropterygidae	Sungaya	<i>Sungaya inexpectata</i>	5,46	Male	8 - 9	5 - 6	Filipíny	11 - 12	11 - 12
Heteropterygidae	Sungaya	<i>Sungaya inexpectata parteng</i>	7,08	Female					
Phasmatidae	Acrophylla	<i>Acrophylla wueffingi</i>	12,49	-	13,5	4,5	Austrálie	8	-
Phasmatidae	Extatosoma	<i>Extatosoma tiaratum</i>	17,99	-	16	10	Austrálie	10-11	10-11
Phasmatidae	Lamponius	<i>Lamponius guerini</i>	19,32	-	10	8	Guadeloupe	10-12	10
Phasmatidae	Myronides	<i>Myronides sp. peleng</i>	4,82	Female	9 - 10	8	Vietnam	12	12
Phasmatidae	Periphetes	<i>Periphetes forcipatus</i>	5,30	Female	8 - 10	7 - 8	Indonésie	9	9
Phasmatidae	Periphetes	<i>Periphetes forcipatus</i>	5,18	Male					
Phasmatidae	Periphetes	<i>Periphetes graniferum</i>	3,46	Male	7,5	6,5	Filipíny	12	12
Phasmatidae	Phobaeticus	<i>Phobaeticus serratipes</i>	12,83	Male	23-25	15 - 17	Malajsie	5-10	4-5
Phasmatidae	Ramulus	<i>Ramulus nematodes</i>	11,90	Female					
Phasmatidae	Ramulus	<i>Ramulus nematodes</i>	10,59	-	15	10	Malajsie	5 - 7	5 - 7
Phasmatidae	Tirachoida	<i>Tirachoida cantori</i>	9,49	-	21	12,5	Malajsie	-	-
Phylliidae	Phyllium	<i>Phyllium giganteum</i>	13,72	-	13	8	Malajsie	6 - 9	3 - 4
Phylliidae	Phyllium	<i>Phyllium jacobsoni</i>	1,29	-	7 - 8	5	Indonésie	6	3
Pseudophasmatidae	Pseudophasma	<i>Pseudophasma scabriusculum pang.</i>	12,79	-	12 - 14	11 - 13	Jižní Amerika	-	-
Pseudophasmatidae	Pseudophasma	<i>Pseudophasma subapterum</i>	18,88	-	6	4-5	Jižní Amerika	-	-
Pseudophasmatidae	Peruphasma	<i>Peruphasma schultzei</i>	12,17	-	5 - 7	4 - 5	Jižní Amerika	6	6

Tabulka č. 4 zobrazuje jeden z cílů mé práce, a sice porovnání velikostí genomu a ekologických vlastností daného jedince řádu Phasmatodea. Stejně jako u řádu Mantodea ani u řádu Phasmatodea nelze zcela určit, zda pohlaví a délka těla některých měřených jedinců ovlivňuje i velikost jejich genomu. U zbylých 12 jedinců, ze kterých je 7 samic a 5 samečků, rozdíl v jejich velikosti a velikosti genomu naznačuje, že s rostoucí délkou těla roste i velikost genomu. Největší rozdíl velikosti genomu mezi pohlavími je 1,81 pg, a to mezi samcem a samicí druhu *Orthomeria kangii benguet*. Poté následuje rozdíl 1 pg u samice a samce druhu *Sungaya inexpectata*. Také je zajímavé, že oba druhy s větším rozdílem genomu mezi pohlavími pochází z ostrova Luzon, který je součástí souostroví Filipín. Nejmenší rozdíl velikosti genomu mezi pohlavími má sameček a samička druhu *Periphetes forcipatus*. Rozdíl mezi pohlavími je 0,12 pg.

Největší velikost genomu mezi druhy se zjištěným pohlavím má sameček druhu *Phobaeticus serratipes*, $2C = 12,83$ pg a samička druhu *Ramulus nematodes* $2C = 11,90$ pg. Oba tyto druhy pochází z Malajsie. Naopak nejmenší genom u jedinců se známým pohlavím naleznem u samičky a samečka druhu *Orthomeria kangii benguet*. Samičce byla zjištěna velikost genomu $2C = 5,29$ pg a samečkovi $2C = 3,49$ pg. Jejich původ je zmíněn o pár řádků výše. Žádný jiný významnější rozdíl mezi pohlavími a velikostí genomu jedinců nenalezneme. Je ale zřejmé z mých měření, že samci z páru mají menší genom než samice.

Při bližším prozkoumání délky života jedinců a naměřené velikosti genomu zjistíme zajímavou provázanost dat u 13 jedinců. Zdá se, že čím kratší délka života, tím větší je velikost genomu a naopak. Kratší délku života a větší genom můžeme pozorovat u 4 druhů. Jsou jimi *Peruphasma schultei*, *Phyllium giganteum*, *Ramulus nematodes*, *Phobaeticus serratipes*. Naopak delší život a menší velikost genomu lze pozorovat u 5 druhů. Jsou jimi *Periphetes graniferum*, *Periphetes forcipatus*, *Myronides sp. peleng*, *Sungaya inexpectata*, *Sipylloidea sipylus*. U druhů *Orthomeria kangii benguet*, *Extatosoma tiaratum*, *Lamponius guerini* a *Phyllium jacobsoni* se toto tvrzení ovšem nepotvrdilo. Jejich délka života je buďto krátká s malým genomem nebo delší s větší velikostí genomu.

Součástí tabulky č. 4 je stejně jako u řádu Mantodea i původní oblast výskytu měřených jedinců. Bohužel ze stejného důvodu ani zde nemůžeme posuzovat, zda má původní oblast výskytu druhu vliv na velikost genomu, jelikož velká část jedinců pocházela opět z domácích chovů.

Tabulka 5 : Druhá část ekologických vlastností všech měřených jedinců rodu Phasmatodea.

Čeleď	Rod	Druh	Velikost genomu (pg)	Pohlaví	Obrana	Zbarvení	Rozmnožování
Aschiphasmataidae	Orthomeria	<i>Orthomeria kangii benguet</i>	5,29	Female	Sekret	Výrazné	Parteng.
Aschiphasmataidae	Orthomeria	<i>Orthomeria kangii benguet</i>	3,49	Male			
Diapheromeridae	Andropromachus	<i>Andropromachus scutatus</i>	12,88	-	Trny	Maskování	Obojí
Diapheromeridae	Sipylloidea	<i>Sipylloidea sipylus</i>	5,45	Female	Křídla	Maskování	Obojí
Heteropterygidae	Sungaya	<i>Sungaya inexpectata</i>	6,45	Female	Trny	Maskování	Parteng.
Heteropterygidae	Sungaya	<i>Sungaya inexpectata</i>	5,46	Male			
Heteropterygidae	Sungaya	<i>Sungaya inexpectata parteng</i>	7,08	Female			
Phasmataidae	Acrophylla	<i>Acrophylla wuelfingi</i>	12,49	-	Trny	Maskování	Parteng.
Phasmataidae	Extatosoma	<i>Extatosoma tiaratum</i>	17,99	-	Trny	Maskování	Obojí
Phasmataidae	Lamponius	<i>Lamponius guerini</i>	19,32	-	Drobné trny	Maskování	Pohlavně
Phasmataidae	Myronides	<i>Myronides sp. peleng</i>	4,82	Female	Útěk	Výrazné	Obojí
Phasmataidae	Periphetes	<i>Periphetes forcipatus</i>	5,30	Female	Útěk	Výrazné	Obojí
Phasmataidae	Periphetes	<i>Periphetes forcipatus</i>	5,18	Male			
Phasmataidae	Periphetes	<i>Periphetes graniferum</i>	3,46	Male	Útěk	Výrazné	Pohlavně
Phasmataidae	Phobaeticus	<i>Phobaeticus serratipes</i>	12,83	Male	Zbav. končet	Maskování	Obojí
Phasmataidae	Ramulus	<i>Ramulus nematodes</i>	11,90	Female	Útěk	Výrazné	Obojí
Phasmataidae	Ramulus	<i>Ramulus nematodes</i>	10,59	-			
Phasmataidae	Tirachidea	<i>Tirachidea cantori</i>	9,49	-	Trny	Maskování	Obojí
Phylliidae	Phyllium	<i>Phyllium giganteum</i>	13,72	-	Mimentismus	Maskování	Parteng.
Phylliidae	Phyllium	<i>Phyllium jacobsoni</i>	1,29	-	Mimentismus	Maskování	Parteng.
Pseudophasmatidae	Pseudophasma	<i>Pseudophasma scabriusculum pang.</i>	12,79	-	Maskování	Maskování	Obojí
Pseudophasmatidae	Pseudophasma	<i>Pseudophasma subapterum</i>	18,88	-	Sekret	Maskování	Pohlavně
Pseudophasmatidae	Peruphasma	<i>Peruphasma schultei</i>	12,17	-	Sekret	Výrazné	Pohlavně

V tabulce č. 5 můžeme vidět druhou část přehledně seřazených informací týkajících se měřených druhů řádu Phasmatodea. Tabulka je seřazena dle jednotlivých čeledí a vedle jednotlivých druhů můžeme vidět velikost jejich genomu uvedenou v pikogramech (1 pg = 978 Mbp), způsob obrany před predátory, typ zbarvení a upřednostňovaný způsob rozmnožování.

Mezi velikostí genomu a formou obrany si v tabulce č. 5 bohužel nevšimneme žádného patrného rozdílu. U formy zbarvení jedinců je to už odlišné. Většina strašilek se snaží ve svém přirozeném prostředí maskovat. Najdou se ale druhy, které jsou velice pestře zbarvené. V naší tabulce najdeme celkem 6 druhů s výrazným maskováním. U čtyř druhů si můžeme všimnout menšího genomu. Jsou to konkrétně druhy *Periphetes forcipatus*, *Myronides sp. peleng*, *Periphetes graniferum*, *Orthomeria kangii benguet*. Naopak u 8 druhů, které spoléhají na maskování, si můžeme všimnout většího genomu. Jsou to například *Extatosoma tiaratum*, *Pseudophasma subapterum* či *Andropromachus scutatus*. Ovšem stejně jako u životnosti se najdou druhy, kde se tato provázanost nepotvrzuje.

Druhy, které se maskují a mají menší genomy, jsou *Sungaya inexpectata*, *Sipylloidea sipylus* a *Phyllium jacobsoni*. Naopak druhy, které jsou výrazně zbarvené a mají větší velikost genomu, jsou *Ramulus nematodes* a *Peruphasma schultei*. V posledním sloupečku tabulky č. 5 je zaznamenán typ rozmnožování. Ani zde nevidíme žádný markantní rozdíl. Některé námi měřené druhy se sice rozmnožují převážně pohlavně, ale zvládají i partenogenetické rozmnožování.

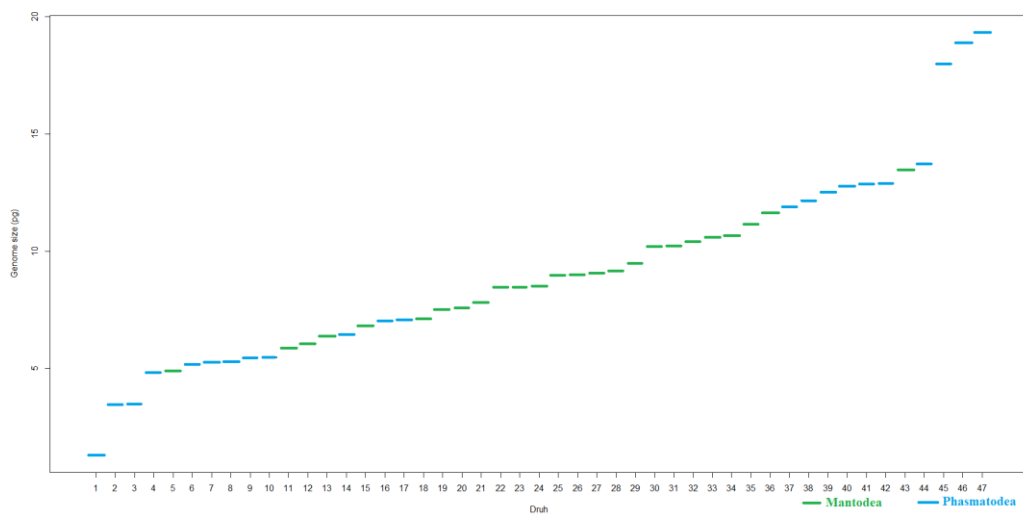
7.3 Porovnání obou řádů

V tabulce č. 6 můžeme vidět naměřené hodnoty všech jedinců z obou řádů. Tabulka je proto seřazena od nejmenšího genomu po největší nezávisle na řádu. Vedle sloupečku pohlaví nalezneme číselnou zkratku, která slouží pro přehlednější orientaci v boxplotu, jenž se nalézá níže pod tabulkou.

Tabulka 6: Tabulka znázorňuje naměřené hodnoty velikosti genomu všech námi měřených druhů z řádů Mantodea a Phasmatodea.

Řád	Druh	Velikost genomu (pg)	Pohlaví	Číselná zkr. graf	Řád	Druh	Velikost genomu (pg)	Pohlaví	Číselná zkr. graf
Phasmatodea	<i>Phyllium jacobsoni</i>	1,29	-	1	Mantodea	<i>Mantidae sp.2</i>	8,97	-	25
Phasmatodea	<i>Periphetes graniferum</i>	3,46	Male	2	Mantodea	<i>Hierodula membrance</i>	8,99	-	26
Phasmatodea	<i>Orthomeria kangi benguet</i>	3,49	Male	3	Mantodea	<i>Mantidae sp.4</i>	9,05	-	27
Phasmatodea	<i>Myronides sp. peleng</i>	4,82	Female	4	Mantodea	<i>Creobroter</i>	9,15	Male	28
Mantodea	<i>Haania vitalisi</i>	4,89	Female	5	Mantodea	<i>Tirachoida cantori</i>	9,49	-	29
Phasmatodea	<i>Periphetes forcipatus</i>	5,18	Male	6	Mantodea	<i>Mantidae sp.1</i>	10,18	-	30
Phasmatodea	<i>Orthomeria kangi benguet</i>	5,29	Female	7	Mantodea	<i>Creobroter</i>	10,23	Female	31
Phasmatodea	<i>Periphetes forcipatus</i>	5,30	Female	8	Mantodea	<i>Sibylla pretiosa</i>	10,41	Female	32
Phasmatodea	<i>Sipylloidea sipylus</i>	5,45	Female	9	Mantodea	<i>Ramulus nematodes</i>	10,59	-	33
Phasmatodea	<i>Sungaya inexpectata</i>	5,46	Male	10	Mantodea	<i>Danuria sp</i>	10,67	Male	34
Mantodea	<i>Orthodera novaesealandiae</i>	5,9	Male	11	Mantodea	<i>Ameles spallanzania</i>	11,14	-	35
Mantodea	<i>Idolomantis diabolica</i>	6,04	-	12	Mantodea	<i>Danuria sp</i>	11,63	Female	36
Mantodea	<i>Gongylus gongyloides</i>	6,35	Male	13	Phasmatodea	<i>Ramulus nematodes</i>	11,90	Female	37
Phasmatodea	<i>Sungaya inexpectata</i>	6,45	Female	14	Phasmatodea	<i>Peruphasma schultei</i>	12,17	-	38
Mantodea	<i>Idolomantis diabolica</i>	6,83	-	15	Phasmatodea	<i>Acrophylla wuelfingi</i>	12,49	-	39
Phasmatodea	<i>Phasmatidae sp.1</i>	7,02	-	16	Phasmatodea	<i>Pseudophasma scabriusculum pan.</i>	12,79	-	40
Phasmatodea	<i>Sungaya inexpectata part.</i>	7,08	Female	17	Phasmatodea	<i>Phobaeticus serratipes</i>	12,83	Male	41
Mantodea	<i>Orthodera novaesealandiae</i>	7,14	Female	18	Phasmatodea	<i>Andropromachus scutatus</i>	12,88	-	42
Mantodea	<i>Sphodromantis lineola</i>	7,54	-	19	Mantodea	<i>Mantidae sp.3</i>	13,45	-	43
Mantodea	<i>Gongylus gongyloides</i>	7,57	Female	20	Phasmatodea	<i>Phyllium giganteum</i>	13,72	-	44
Mantodea	<i>Rhombodera valida</i>	7,82	Female	21	Phasmatodea	<i>Extatosoma tiaratum</i>	17,99	-	45
Mantodea	<i>Deroplatys lobata</i>	8,45	Female	22	Phasmatodea	<i>Pseudophasma subapterum</i>	18,88	-	46
Mantodea	<i>Hierodula sp. Golden</i>	8,45	-	23	Phasmatodea	<i>Lamponius guerini</i>	19,32	-	47
Mantodea	<i>Rhombodera valida</i>	8,51	-	24					

Celkově jsme změřili 47 jedinců z obou zkoumaných řádů. Konkrétně z řádu Phasmatodea jsme změřili 24 jedinců z šesti čeledí, a pohlaví je známo u dvanácti jedinců. Z řádu Mantodea jsme celkem změřili 23 jedinců ze čtyř čeledí, a pohlaví je též známo u dvanácti jedinců. Hodnoty velikosti genomu všech jedinců se pohybují od $2C = 1,29$ pg u lupenitky druhu *Phyllium jacobsoni* z řádu Phasmatodea až po $2C = 19,32$ pg strašilky druhu *Lamponius guerini* z řádu Phasmatodea. Všechny naměřené hodnoty jsou rozprostřeny v celé délce, jak si můžeme všimnout níže u obrázku č. 11.



Obrázek 11: Porovnání velikosti genomu všech námi měřených jedinců z řádů Phasmatodea a Mantodea.

Z obrázku č. 11 je patrné, že mezi velikostí genomu u všech měřených jedinců je minimální rozdíl. Rod Mantodea je zde vyobrazen zelenou barvou. Rod Phasmatodea je naopak vyobrazen modrou barvou. Zástupci obou měřených řádů dosahují nízkých i vysokých hodnot velikosti genomu, což může být vysvětleno stejným postembryonálním vývojem. Oba řády totiž mají stejný typ vývoje, a sice hemimetabolní. Podobnost velikosti genomu souhrnně jen u řádů pak vychází pomocí Anova testu neprůkazně.

8 Diskuse

Jak jsem již zmiňoval ve své práci, tak právě metoda průtokové cytometrie nám pomohla určit velikost genomu u vybraných druhů z řádů Phasmatodea a Mantodea. Tato metoda je přesná, rychlá a dokáže i z minima vzorku zjistit obrovské množství informací. Žádná metoda není úplně dokonalá a také průtoková cytometrie má své slabé stránky, se kterými jsem se při měření našich vzorků setkal.

Dle Doležel a Bartoš (2005) je nevýhodou průtokové cytometrie nutnost uchování materiálu ve stavu přijatelném k měření. Toto tvrzení se při mém měření potvrdilo. Zkoumané vzorky pocházely z rozličných prostředí. Některé byly z domácích chovů a burz, zatímco jiné byly dovezeny z cizích zemí. Udržet vzorky ve stavu přijatelném k měření bylo občas velmi obtížné.

Při mé přípravě suspenze jader jsem také přišel o velkou výhodu botaniků, kteří měří velikost genomu většinou daleko ohleduplněji. Při získání potřebné části např. listu je výsledné poškození u rostlin minimální. U živočichů to už tolik ohleduplněji bohužel nejde. Manipulace se hmyzem je často složitá a musíme pamatovat na zachování čerstvosti vzorku. Samotná část jedince je pak například článek nohy, ovšem studovanému vzorku se ne vždy chce část jeho těla poskytnout, a právě u kudlanek jsem často tento jev pozoroval. Proto je dobré dát jedince do mrazáku, čímž snížíme jeho pohyblivost, sebe uchráníme před poraněním a získáme tak lepší podmínky pro získání vzorku končetiny či jiné části těla. Bohužel ne vždy jsou námi studované exempláře z živočišné říše tak velké, abychom mohli použít jen část jejich nohy. U některých druhů musíme použít celé tělo či hlavu. Tato nutnost stojí jedince život.

Při měření jsem také narazil na problém, o kterém se zmiňuje Johnston et al. 1999. U několika druhů se mi standard i vzorek překrývaly, i když zde měl být rozdíl. Což vedlo k opakovanému zraňování jedince kvůli získání nového vzorku. Dle Johnston et al. (1999) by právě velikost genomu použitého standardu a zkoumaného vzorku měla být podobná, ovšem ne natolik, aby se nám hodnoty překrývaly. Tento problém poté vede ke komplikovanému porovnávání výsledků (Doležel a Bartoš, 2005). Rostlinný genom je sice považován za celkem stabilní a jeho dostupnost je také mnohem větší. Ovšem pro nejefektivnější měření velikosti genomu živočicha by bylo lepší volit živočišné standardy. Existuje spousta rostlin s větším genomem, ale nemusí být vždy zrovna podobné živočišné velikosti genomu. Mezi jednotlivými studii bohužel ne vždy najdeme totiž shodu v použití standardů a často se také můžeme setkat s neshodou v jejich C-hodnotách (Johnston et al. 1999).

Pro uchování informací o genomu se dnes používá spousta databází. Jednou z nejznámějších je celosvětová databáze www.genomsize.com. Aktuálně zde nalezneme 1345 záznamů velikosti genomu z třídy hmyzu. Bohužel zde naleznem pouze 11 záznamů z řádu Phasmatodea a 5 záznamů z řádu Mantodea. Tato nízká čísla poukazují na dva problémy, a sice možnou neaktualizovanou databázi a nemožnost ověření měřených výsledků. Bez znalosti velikosti genomu podobného druhu není možné napoprvé určit správný standart což opět vede k opakovanému měření.

Měřenou velikost genomu u jednotlivých druhů může také ovlivnit mnoho faktorů. U spousty druhů můžeme například pozorovat rozlišnou velikost genomu mezi pohlavími. Dle Picard et al. (2012), rozdílné velikosti genomu mezi pohlavími mohou být užitečné právě při určování pohlaví. Často nám pouze morfologické znaky nestačí a znalost velikosti genomu u každého pohlaví může proces určování ulehčit. Z mých výsledků u několika druhů kde je známo pohlaví obou jedinců stejného druhu je patrné že samci mají menší genom.

Ellis et al. (2014) ve své práci uvádí, že k variabilitě ve velikosti genomu může docházet v rámci jak chovaných druhů, tak i u druhů z přírodních linií. Právě ve své práci jsem se také zabýval otázkou, zda životní podmínky jedince ovlivňují velikost jeho genomu. Mnou měření jedinci pocházeli převážně z domácích chovů, kde na rozdíl od přírody panují rozličné podmínky. Druhy nejsou pod tlakem predátorů, mají dostatek potravy. Tudiž tyto a další jiné faktory mohou ovlivnit velikost genomu.

Při získávání jedinců z řádu Mantodea jsem se často musel obracet na chovatele. Jednou z chovatelek je i Veronica Uhrincatová. Právě s ní jsem konzultoval možné změny jedinců pocházejících z domácích chovů. Ukázalo se, že ne vždy jedinci odpovídají již známým faktům. Často se prý v chovaných populacích objevují velikostní či pohlavní anomálie. Jedinci jsou často větší, robustnější, agresivnější a v případě samic jsou schopni se i víckrát rozmnožovat. Čím jsou tyto anomálie způsobené je však záhadou. Má tento jev původ u velikosti genomu? Můžeme se jen domnívat.

Mantodea

Celkově bylo v mé práci změřeno 23 jedinců ze čtyř čeledí řádu Mantodea. Z těchto čtyř čeledí se na již zmiňované celosvětové databázi www.genomsize.com nachází pouze dvě z nich. Jedná se o čeleď Hymenopodidae, kde byla zjištěna velikost genomu u jediného jedince druhu *Acromantis japonica*, a dále se jedná o čeleď Mantidae, kde byl zjištěn genom u dalších čtyř jedinců. Avšak metodou průtokové cytometrie byl genom zjištěn pouze u dvou jedinců, a sice u *Stagmomantis carolina* a *Litaneutria* sp., které nemám ve své práci zahrnuty.

Doposud tedy nebyl na [genomsize](http://www.genomsize.com) popsán žádný druh z čeledi Thespidae a Empusidae, které byly součástí mého výzkumu. Z čeledi Thespidae tak mohou představit svého jediného zástupce, a sice samičku druhu *Haania vitalisi* s velikostí genomu $2C = 4,89$ pg. Z čeledi Empusidae jsem změřil velikost genomu dvou druhů. Jednalo se o kudlanky druhu *Gongylus gongylodes* a *Idolomantis diabolica*. Oba tyto druhy byly měřeny v páru, ale pohlaví bylo zjištěno pouze u *Gongylus gongylodes*.

Moji nejpočetnější skupinou byla čeleď Mantidae. Změřil jsem zde 11 jedinců, přičemž čtyři z nich byly samice a dva samci. Největší velikost genomu $2C = 11,63$ pg patřila samičce rodu *Danuria*, kterou se nám bohužel nepodařilo determinovat. Nejmenší velikost genomu $2C = 5,9$ pg patřila samečkovi druhu *Orthodera novaezealandiae*.

Ve své práci se zaměřuji krom stanovení velikosti genomu také na jeho případnou ovlivnitelnost zapříčiněnou okolními podmínkami. Bohužel kvůli menší variabilitě vzorků a zhoršeným podmínkám získání živých jedinců jsem schopen pouze poukázat na možnost ovlivnění velikosti genomu.

Při bližším prozkoumání délky životního cyklu jedinců a velikosti genomu u řádu Mantodea se můžeme domnívat, že velikost genomu může být ovlivněna i délkou života. Je ale třeba zajímavé, že jedinci druhu *Rhombodera valida*, u kterých se samice dožívají až dva roky a samci roku a půl, mají menší genom než například samička druhu *Sibylla preciosa*, která se může dožít až 11 měsíců. Rozdíl mezi samicemi skrz velikost genomu je 2,59 pg. Podobně jako u délky životního cyklu, ani u zbarvení nemůžeme s jistotou říci, zda ovlivňuje velikost genomu. Neměl jsem bohužel dostatek dat abych mohl ovlivnitelnost genomu prokázat.

Phasmatodea

Z tohoto řádu jsem ve své práci popsal velikost genomu u celkem 24 jedinců z šesti čeledí. Z těchto šesti čeledí se na www.genomsize.com nachází pouze dvě, a sice čeleď Phasmatidae a Heteronemiidae. Celkově je na tomto portálu popsána velikost genomu pouze 11 jedinců, z čehož dva nebyli ani měřeni pomocí průtokové cytometrie.

I v tomto řádu neexistují popsané čeledě či jedinci, které jsem měřil. Doposud tedy nebyla popsána žádná velikost genomu druhu z čeledi Aschiphasmatidae, Diapheromeridae, Heteropterygidae, Phylliidae či Pseudophasmatidae. Z čeledi Aschiphasmatidae jsem zjistil velikost genomu páru druhu *Orthomeria kangii benguet*. U samce byla zjištěna velikost genomu $2C = 3,49$ pg a u samice $2C = 5,29$ pg. Výsledný signifikantní rozdíl 1,8 pg poukazuje v mém měření na větší velikost genomu samic. Z čeledě Diapheromeridae jsme zjistili velikost genomu *Andropromachus scutatus*, která dosahuje až $2C = 12,88$ pg.

U čeledě Heteropterygidae jsme měli možnost porovnat samce a dvě samice, které praktikují rozličné formy rozmnožování. Jde o partenogenetické a pohlavní rozmnožování. Samice, která se rozmnožovala partenogeneticky, měla velikost genomu $2C = 7,08$ pg, kdežto druhá samice měla velikost genomu o trošku menší. Byla u ní zjištěna velikost genomu $2C = 6,45$ pg. Jde tedy sice o rozdíl 0,63 pg, ale při větším množství samic by mohla velikost genomu poukázat na určitý trend u partenogeneticky se množících samic.

Z čeledi Phylliidae jsem zjistil velikost genomu u dvou lupenitek. Jednalo se o druhy *Phyllium giganteum* s velikostí genomu $2C = 13,72$ pg a *Phyllium jacobsoni* s velikostí genomu $2C = 1,29$ pg, což byl mimochodem nejmenší genom ze všech měřených jedinců. Rozdíl mezi těmito dvěma druhy je obrovský a dosahuje 12,43 pg, což je pomalu stejná velikost, jakou dosahuje genom druhu *Andropromachus scutatus*. Z čeledě Pseudophasmatidae jsem zjistil druhou největší velikost genomu u mnou měřených strašilek, a sice u druhu *Pseudophasma subapterum*. Tento druh má velikost genomu $2C = 18,88$ pg.

Při bližším prozkoumání délky života jedinců a naměřené velikosti genomu jsem také zjistil zajímavou provázanost dat u 13 jedinců. Zdá se, že čím kratší délka života, tím větší je velikost genomu a naopak. Bohužel neměl jsem opět dostatek dat abych, tuto hypotézu mohl potvrdit či vyvrátit. A proto i zde u tohoto řádu můžu jen poukázat na menší rozdíly velikosti genomu u zbarvení či velikosti a délce života.

Ve své práci se také zmiňuji o původu druhů z obou řádů. Bohužel kvůli měření druhů, které pocházejí převážně od chovatelů, jsem nebyl schopen dokázat jakoukoliv souvislost. Dle mého skromného úsudku má i lokalita původu svůj podíl na velikosti genomu, a to hlavně kvůli rozličným podmínkám prostředí, což ve své práci zmiňuje i Ellis et al. (2014).

9 Závěr

Má bakalářská práce zahrnuje výzkum jádra buněk u vybraných zástupců z řádu *Mantodea* a *Phasmatodea* pomocí průtokové cytometrie. Tato metoda je převážně známá pro svoji rychlost a kvalitní přesnost měření.

Celkově byla pomocí práce zjištěna velikost genomu u 47 jedinců z obou zkoumaných řádů. Naměřené hodnoty velikosti genomu sahaly od $2C = 1,29$ pg u *Phyllium jacobsoni* z řádu *Phasmatodea* až po největší mnou naměřený genom $2C = 19,32$ pg u druhu *Lamponius guerini* také z řádu *Phasmatodea*.

V práci jsem se také zaměřoval na porovnání velikosti genomu s přihlédnutím na odlišné ekologické vlastnosti a nároky zkoumaných skupin, a to ať už mezidruhově či mezi jednotlivými čeleděmi.

Veškeré cíle mé práce byly splněny, výsledky naznačují možné trendy ve vývoji a ovlivnění velikosti genomu u těchto dvou skupin.

V rámci své diplomové práce bych se velmi rád věnoval rozšíření databáze naměřených velikostí genomu s přihlédnutím k výzkumu druhových ekologických vlastností. Velmi rád bych také rozšířil mnou měřené řády o další údaje a pokusil se potvrdit možné faktory ovlivňující velikost genomu daných řádů.

10 Použitá literatura

- ADAN**, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. In *Critical Reviews in Biotechnology* (Vol. 37, Issue 2). <https://doi.org/10.3109/07388551.2015.1128876>
- BAKER**, E. Phasmids: An Introduction to the Stick Insects and Leaf Insects. UK: Phasmid Study Group Newsletter, 2007. ISBN 0966-0011.
- BARRY**, Katherine L; Gregory I. Holwell; Marie E. Herberstein (2008). "Female praying mantis use sexual cannibalism as a foraging strategy to increase fecundity". *Behavioral Ecology*. **19** (8): 710–715.
- BÁRTOVÁ**, Eva, KLIMEŠ, Jiří a Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat. *Zoologie pro veterinární mediky*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2004. s. 77. ISBN 80-7305-489-2.
- BATTISTON R.**, Picciau L., Fontana P. & Marshall J., 2010 –The Mantids of the Euro Mediterranean Area. World Biodiversity association, Verona ISBN: 978-88-90332-31-9
- BENNET**, M.D., Leitch, I.J., Price, H.J., a Johnston, J.S. (2003). Comparisons with *Caenorhabditis* (approximately 100 Mb) and *Drosophila* (approximately 175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be approximately 157 Mb and thus approximately 25% larger than the *Arabidopsis* genome initiative estimate. *Ann. Bot.* 5, 547–557.
- BENNET**, M. D., & Leitch, I. J. (2005). Plant genome size research: A field in focus. *Annals of Botany*, 95(1). <https://doi.org/10.1093/aob/mci001>
- BIRKHEAD**, T. R., Lee, K. E., & Young, P. (1988). Sexual Cannibalism in the Praying Mantis *Hierodula Membranacea*. *Behaviour*, 106(1–2). <https://doi.org/10.1163/156853988X00115>
- BRAGG**, Phil E. & Chan, C. L. 2001, Phasmids of Borneo / Philip E. Bragg ; with illustrations by the author and C.L. Chan ; foreword by Datuk Tham Nyip Shen Natural History Publications (Borneo) Kota Kinabalu [Malaysia]
- BROCK**, Paul D. "Phasmida Species File Online. Version 5.0". Retrieved 2 October 2020.
- BROWN**, M., & Wittwer, C. (2000). Flow cytometry: Principles and clinical applications in hematology. *Clinical Chemistry*, 46(8 II). <https://doi.org/10.1093/clinchem/46.8.1221>
- CIUDAD**, J., Cid, E., Velasco, A., Lara, J. M., Aijón, J., & Orfao, A. (2002). Flow cytometry measurement of the DNA contents of G0/G1 diploid cells from three different teleost fish species. *Cytometry*, 48(1). <https://doi.org/10.1002/cyto.10100>
- COSSARIZZA**, A., Chang, H. D., Radbruch, A., Akdis, M., Andrä, I., Annunziato, F., Bacher, P., Barnaba, V., Battistini, L., Bauer, W. M., Baumgart, S., Becher, B., Beisker, W., Berek, C., Blanco, A., Borsellino, G., Boulais, P. E., Brinkman, R. R., Büscher, M., ... Zimmermann, J. (2017). Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *European Journal of Immunology*, 47(10). <https://doi.org/10.1002/eji.201646632>

- COURNAULT**, L., & Aron, S. (2008). Rapid determination of sperm number in ant queens by flow cytometry. *Insectes Sociaux*, 55(3). <https://doi.org/10.1007/s00040-008-1003-8>
- DOLEŽEL**, J., Greilhuber, J., Lucretti, S., Meister, A., Lysák, M. A., Nardi, L., & Obermayer, R. (1998). Plant genome size estimation by flow cytometry: Inter-laboratory comparison. *Annals of Botany*, 82(SUPPL. A). <https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0730>
- DOLEŽEL**, Jaroslav, & Bartoš, J. (2005). Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany*, 95(1). <https://doi.org/10.1093/aob/mci005>
- DOLEŽEL**, Jaroslav, & Göhde, W. (1995). Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry. *Cytometry*, 19(2). <https://doi.org/10.1002/cyto.990190203>
- DOLEŽEL**, Jaroslav, & Greilhuber, J. (2010). Nuclear genome size: Are we getting closer? In *Cytometry Part A* (Vol. 77, Issue 7). <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20915>
- DOLEŽEL**, Jaroslav, Greilhuber, J., & Suda, J. (2007a). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*, 2(9). <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.310>
- DOLEŽEL**, Jaroslav, Greilhuber, J., & Suda, J. (2007b). Flow Cytometry with Plant Cells: Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes. In *Flow Cytometry with Plant Cells: Analysis of Genes, Chromosomes and Genomes*. <https://doi.org/10.1002/9783527610921>
- DOLLINGERS**, Peter. Zootier-Lexikon [online]. 2021 [cit. 2021-03-12]. Dostupné z <https://www.zootier-lexikon.org/>
- DOSSEY**, A. T. (2010). Insects and their chemical weaponry: New potential for drug discovery. In *Natural Product Reports* (Vol. 27, Issue 12). <https://doi.org/10.1039/c005319h>
- EHRMANN**, R. 2002. Mantodea: Gottesanbeterinnen der Welt. Natur und TierVerlag GmbH (NTV), Munster, Germany. 519 p.
- ELLIS**, L. L., Huang, W., Quinn, A. M., Ahuja, A., Alfrejd, B., Gomez, F. E., Hjelman, C. E., Moore, K. L., Mackay, T. F. C., Johnston, J. S., & Tarone, A. M. (2014). Intrapopulation Genome Size Variation in *D. melanogaster* Reflects Life History Variation and Plasticity. *PLoS Genetics*, 10(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004522>
- FRIEDEMANN**, K., Wipfler, B., Bradler, S., & Beutel, R. G. (2012). On the head morphology of Phyllium and the phylogenetic relationships of Phasmatodea (Insecta). *Acta Zoologica*, 93(2). <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2010.00497.x>
- GIVAN**, Alice L. (2001). Flow Cytometry: First Principles. In *Flow Cytometry: First Principles*. <https://doi.org/10.1002/0471223948>
- GIVAN**, Alice L. (2011). Flow cytometry: an introduction. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* (Vol. 699). https://doi.org/10.1007/978-1-61737-950-5_1
- GREGORY**, T. R. (2005). The C-value enigma in plants and animals: A review of parallels and an appeal for partnership. *Annals of Botany*, 95(1). <https://doi.org/10.1093/aob/mci009>

- GREGORY**, T. R., Nicol, J. A., Tamm, H., Kullman, B., Kullman, K., Leitch, I. J., Murray, B. G., Kapraun, D. F., Greilhuber, J., & Bennett, M. D. (2007). Eukaryotic genome size databases. *Nucleic Acids Research*, 35(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkl828>
- HALE**, Tom (14 August 2017). "World's New Longest Insect Is The Length Of Your Arm". IFLScience. Retrieved 27 March 2020.
- HANRAHAN**, S. J., & Johnston, J. S. (2011). New genome size estimates of 134 species of arthropods. *Chromosome Research*, 19(6). <https://doi.org/10.1007/s10577-011-9231-6>
- HANSON**, L., M C Mahon, K. A., Johnson, M. A. T., & Bennett, M. D. (2001). First nuclear DNA C-values for another 25 angiosperm families. *Annals of Botany*, 88(5). <https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1528>
- HANZÁK**, Jan, ZAHRADNÍK, Jiří, MOUCHA, Josef a POSPÍŠIL, Antonín. *Světém zvířat, 5. díl. 2. část: Bezobratlí*. Praha: Albatros, 1973. sv. 5. díl. 2. část s. 73.
- HEADS**, Sam & Martill, David & Loveridge, Robert. (2008). Palaeontomological paradise: the Cretaceous Crato Formation of Brazil. *Antenna*. 32. 19-98.
- HESLER** Claudia, Ingrid und Rudolf Bischoff: Mantiden – Faszinierende Lauerjäger. 2. korrigierte und erweiterte Auflage. Edition Chimaira, Frankfurt am Main 2008, ISBN 978-3-930612-45-1, S. 163–167
- HOELL**, H.V.; Doyen, J.T.; Purcell, A.H. (1998). *Introduction to Insect Biology and Diversity* (2nd ed.). Oxford University Press. pp. 398–399. ISBN 978-0-19-510033-4.
- HURD**, IE (1999). "Ekologie kudlanek". V Prete, Fredrick R .; Wells, Harrington; Wells, Patrick H .; Hurd, Lawrence E. (eds.). Johns Hopkins University Press. 43–49. ISBN 978-0-8018-6174-1.
- IMLADIS**, STRAŠILKY, PAKOBYLKY, ŠNECI. [online] 2017, [cit. 2021-02-23]. Dostupné z <https://imladis.webnode.cz/>
- JANŠTA P.**, VRABEC V., STRÁNSKÝ J., MIKÁT M. & MOCEK B. (2008): The occurrence of the praying mantis (*Mantis religiosa*) (Mantodea: Mantidae) in central Bohemia and its distribution in the Czech Republic. *Výskyt kudlanky nábožné (*Mantis religiosa*) (Mantodea: Mantidae) ve středních Čechách a její rozšíření v České republice. – Klapalekiana*, 44: 21-25.
- JOHNSTON**, J. S., Bennett, M. D., Rayburn, A. L., Galbraith, D. W., & Price, H. J. (1999). Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei. *American Journal of Botany*, 86(5). <https://doi.org/10.2307/2656569>
- KEMPER**, William T. "Insect Order ID: Mantodea (Praying Mantises, Mantids)" (PDF). Missouri Botanical Garden. Retrieved 21 September 2020. Dostupné z <http://www.missouribotanicalgarden.org/Portals/0/Gardening/Gardening%20Help/Insect%20Orders/Mantodea.pdf>
- KOVAŘÍK**, F. a kol. (2000) Hmyz: Chov, morfologie. 1. vyd. Jihlava: Madagaskar, 2000, 295 s. ISBN 80-86068-24-2.

- KŮRKA**, Antonín. Hmyz. Praha: Svojtka & Co., 1999. s. [1a]. ISBN 80-7237-198-3. Dostupné také z: <https://dnnt.mzk.cz/uuid/uuid:6a20e7d0-214c-11e4-8413-5ef3fc9ae867>
- LAFFIN**, J., Fogleman, D., & Lehman, J. M. (1989). Correlation of DNA content, p53, T antigen, and V antigen in simian virus 40-infected human diploid cells. *Cytometry*, 10(2). <https://doi.org/10.1002/cyto.990100212>
- LAGUADO**, J. (2007). APLICACIONES DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN MICROBIOLOGÍA, VETERINARIA Y AGRICULTURA APPLICATIONS OF FLOW CYTOMETRY IN MICROBIOLOGY VETERINARY SCIENCE AND AGRICULTURE. In *REVISIÓN LITERATURA Rev.MVZ Córdoba* (Vol. 12, Issue 2).
- LOCHMANOVÁ**, A., Chmelař, D., Beran, V., & Hájek, M. (2017). Průtoková cytometrie v mikrobiologii. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie*, 66(4).
- LONGIN**, C., Petitgonnet, C., Guilloux-Benatier, M., Rousseaux, S., & Alexandre, H. (2017). Application of flow cytometry to wine microorganisms. In *Food Microbiology* (Vol. 62). <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.10.023>
- LOUREIRO**, J., Rodriguez, E., Doležel, J., & Santos, C. (2006). Comparison of four nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry. *Annals of Botany*, 98(3). <https://doi.org/10.1093/aob/mcl141>
- LYNNE – MAGINNIS**, T. (2008). Autotomy in a stick insect (Insecta: Phasmida): Predation versus molting. *Florida Entomologist*, 91(1). [https://doi.org/10.1653/0015-4040\(2008\)091\[0126:AIASII\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1653/0015-4040(2008)091[0126:AIASII]2.0.CO;2)
- MACEK**, J. Bezobratlí. (2), Hmyz. 1. vyd. Praha: Albatros, 2001. 170 s. Svět zvířat; sv. 11. ISBN 80-00-00918-8.
- MACEY**, M.G. (2007). Flow Cytometry – Principles and Applications (Totowa, N.J.: Humana Press). ISBN 978-1-61737-720-4.
- MARINOV**, I. Průtoková cytometrie v klinické hematologii. 2., přeprac. a rozš. vyd. Praha: Triton, 2008, 148 s. ISBN 978-80-7387-143-7.
- MARTILL**, D. M., Bechly, G., & Loveridge, R. F. (2007). The crato fossil beds of Brazil: Window into an ancient world. In *The Crato Fossil Beds of Brazil: Window into an Ancient World*. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511535512>
- McSHARRY**, J. J., Constantino, R., Robbiano, E., Echols, R., Stevens, R., & Lehman, J. M. (1990). Detection and quantitation of human immunodeficiency virus-infected peripheral blood mononuclear cells by flow cytometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 28(4). <https://doi.org/10.1128/jcm.28.4.724-733.1990>
- MORGAN-RICHARDS**, M., & Trewick, S. A. (2005). Hybrid origin of a parthenogenetic genus? *Molecular Ecology*, 14(7). <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02575.x>
- MOTYČKOVÁ**, Hana a Vladimír MOTYČKA. *Strašilky*. Rudná u Prahy: Robimaus, 2012. Abeceda teraristy. ISBN 978-80-87293-26-3.
- MURPHY** RW, Lowcock LA, Smith C, Darevsky IS, Orlov N, MacCulloch RD, Upton DE (1997). "Flow cytometry in biodiversity surveys: methods, utility and constraints". *Amphibia-Reptilia*. 18: 1–13.

- OBENBERGER**, Jan. *Entomologie*, 2, 1: *Systematická část. 1. podtřída Apterygota, 2. podtřída Pterygota A. Heterometabola: 5. řád Grylloblattodea - 16. řád Zoraptera*. Praha: ČSAV, 1955. Dostupné také z: <https://dnnt.mzk.cz/uuid/uuid:f5534d20-1e6a-11e2-bec6-005056827e51>
- OTTO**, F. (1990). DAPI Staining of Fixed Cells for High-Resolution Flow Cytometry of Nuclear DNA. *Methods in Cell Biology*, 33(C). [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60516-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60516-6)
- OTTE**, Daniel, Lauren Spearman a Martin BD Stiewe. Soubor druhů Mantodea online . Verze 5.0 / 5.0 . [20.1.2021]. <<http://Mantodea.SpeciesFile.org>>
- PECINA**, Pavel. *Hmyz: druhy pro začínající chovatele – strašilky, pakobylky a saranče: průvodce Pavla Peciny pro mladé chovatele* . Havlíčkův Brod: Fragment, 1999. s. 16. ISBN 80-7200-306-2.
- PICARD** CJ, Johnston JS, Tarone AM. 2012. Genome sizes of forensically relevant Diptera, *Journal of Medical Entomology* , svazek 49, číslo 1, 1. ledna 2012, strany 192–197
- PICKER**, Mike; et al. (2004). *Field Guide to Insects of South Africa*. Cape Town: Struik Publishers. p. 66. ISBN 978-1-77007-061-5.
- PICOT** J, Guerin CL, Le Van Kim C, Boulanger CM. (2012) Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation. *Cytotechnology*. 2012 Mar;64(2):109-130. DOI: 10.1007/s10616-011-9415-0.
- PRACA-FONTES**, M. M., Carvalho, C. R., Clarindo, W. R., & Cruz, C. D. (2011). Revisiting the DNA C-values of the genome size-standards used in plant flow cytometry to choose the “best primary standards.” *Plant Cell Reports*, 30(7). <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1026-x>
- PREFFER**, F., & **Dombkowski**, D. (2009). Advances in complex multiparameter flow cytometry technology: Applications in stem cell research. In *Cytometry Part B – Clinical Cytometry* (Vol. 76, Issue 5). <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20480>
- RAMSEY**, G. W. 1990. Mantodea (Insecta) with a review of aspects of functional morphology and biology. *Fauna of New Zealand* 19, 96 pages. ISBN 0-477-02581-1. Published 13 June 1990.
- ROEDERER**, M. (2001). Spectral compensation for flow cytometry: Visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry*, 45(3). [https://doi.org/10.1002/1097-0320\(20011101\)45:3<194::AID-CYTO1163>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1097-0320(20011101)45:3<194::AID-CYTO1163>3.0.CO;2-C)
- ROUBALOVÁ**, L. Průtoková cytometrie [online]. [cit. 2020-28-12]. Dostupné z <<http://web2.stapro.cz/bullfons/22012/labo1.pdf>>.
- ROSSEL**, S. (1989). Polarization Sensitivity in Compound Eyes. In *Facets of Vision*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-74082-4_15
- ROY, ROGER** (1999). "Morphology and Taxonomy". In Prete, Fredrick R.; Wells, Harrington; Wells, Patrick H.; Hurd, Lawrence E. (eds.). *The Praying Mantids*. Johns Hopkins University Press. pp. 21–33. ISBN 978-0-8018-6174-1.
- ROY, ROGER**. (2010). Mantids of the Euro-Mediterranean. *Bulletin de La Société Entomologique de France*, 115(3).

- RUGGIERO**, M. A., Gordon, D. P., Orrell, T. M., Bailly, N., Bourgoïn, T., Brusca, R. C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M. D., & Kirk, P. M. (2015). A higher level classification of all living organisms. *PLoS ONE*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119248>
- RYALL**, Julian (25 April 2008). "Ancient Praying Mantis Found in Amber". National Geographic Society. Retrieved 30 July 2020.
- SHAPIRO**, H. M. (1995). Practical flow cytometry. 3rd ed. New York (N.Y.): Wiley-Liss.
- SHAPIRO**, H. M. (2003): Practical flow cytometry 4th ed. John Wiley and sons. ISBN: 9780471411253
- SCHWARZ** CJ, Roy R (2019). The systematics of Mantodea revisited: an updated classification incorporating multiple data sources (Insecta: Dictyoptera). *Annales-Societe Entomologique de France*. 55. 101-196. 10.1080/00379271.2018.1556567.
- STEARNS**, William Thomas (1983). *Botanical Latin*. 275. David & Charles. ISBN 978-0-7153-8548-7.
- SUDA**, J., Kron, P., Husband, B.C. and Trávníček, P. (2007). Flow Cytometry and Ploidy: Applications in Plant Systematics, Ecology and Evolutionary Biology. In *Flow Cytometry with Plant Cells* (eds J. Doležel, J. Greilhuber and J. Suda)
- SUDA**, J. (2011). Průtoková cytometrie a její využití v botanice. *Zprávy České Bot. Společnosti* 21–42. Dostupné z <http://www.ibot.cas.cz/fcm/suda/presentation/ziva.pdf>
- ŠINKOROVÁ** Z., Zárybnická L. (2008): Průtoková cytometrie jako analytická a selekční metoda I. část. *Vojenské zdravotnické listy*. 3: 98–103.
- VOLFOVÁ**, Eva. *Kudlanky*. Rudná u Prahy: Robimaus – Magdaléna Javorská, Robert Javorský, 2019. Abeceda teraristy. ISBN 978-80-87293-34-8.
- VALLOTTO**, D., Bresseel, J., Heitzmann, T., & Gottardo, M. (2016). A black-and-red stick insect from the Philippines – observations on the external anatomy and natural history of a new species of *Orthomeria*. *ZooKeys*, 2016(559). <https://doi.org/10.3897/zookeys.559.6281>
- VOKJŮVKA**, Kudlanky, [Online]. 2010-2015 (cit. 2021-01-30). Dostupné z <http://www.kudlanky.com/druhy.htm>
- WEDMANN**, S., Bradler, S., & Rust, J. (2007). The first fossil leaf insect: 47 Million years of specialized cryptic morphology and behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(2). <https://doi.org/10.1073/pnas.0606937104>
- WILLING**, Michael R.; Rosser W. Garrison; Arlene J. Bauman (1986). "Population dynamics and natural history of a neotropical walking stick, *Lamponius Portoricensis* Rehn (Phasmatodea: Phasmatidae)". *The Texas Journal of Science*. 38.
- ZAJÍČEK**, J., NOHEJL M. HARPAGON Software s.r.o. Strašilky [online]. 2001–2013 [cit. 2021-02-16]. Dostupné z: <http://www.strasilky.cz/>
- ZAMORA**, J. L. R., & Aguilar, H. C. (2018). Flow virometry as a tool to study viruses. In *Methods* (Vols. 134–135). <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2017.12.011>

ZHOUE, W., Liang, G., Molloy, P. L., & Jones, P. A. (2020). DNA methylation enables transposable element-driven genome expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(32). <https://doi.org/10.1073/pnas.1921719117>

Seznam obrázků

Obrázek 12: Detailní pohled na hlavu kudlanky (foto autor, 2020)

Obrázek 13: Detailní pohled na samici druhu *Deroplatys lobata* (foto autor, 2020)

Obrázek 14: Detailní pohled na hlavu strašilky (foto autor, 2020)

Obrázek 15: Detailní pohled na samičku druhu *Periphletes forcipatus* (foto autor, 2020)

Obrázek 16: Jednotlivé komponenty cytometru (Převzato z <https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/how-flow-cytometer-works.html>).

Obrázek 17: Izolace jader pomocí žiletky (foto autor, 2020)

Obrázek 18: Porovnání námi všech změřených jedinců řádu Mantodea dle posloupnosti (nejmenší->největší)

Obrázek 19: Porovnání velikosti genomu mezi jednotlivými čeledi řádu Mantodea.

Obrázek 20: Porovnání námi všech změřených jedinců řádu Phasmatodea dle posloupnosti (nejmenší->největší)

Obrázek 21: Porovnání velikosti genomu mezi jednotlivými čeledi řádu Mantodea.

Obrázek 22: Porovnání velikosti genomu všech námi měřených jedinců z řádů Phasmatodea a Mantodea.

Seznam tabulek

Tabulka 7: Tabulka zobrazuje naměřené hodnoty velikosti genomu u všech námi změřených jedinců z řádu Mantodea. Hodnoty genomu jsou uváděny v pg (1pg=978 Mbp).

Tabulka 2: Tabulka znázorňuje ekologické vlastnosti všech měřených jedinců rodu Mantodea.

Tabulka 8: Tabulka zobrazuje naměřené hodnoty velikosti genomu u všech námi změřených jedinců z řádu Phasmatodea. Hodnoty genomu jsou uváděny v pg (1pg=978 Mbp).

Tabulka 9: První část ekologických vlastností všech měřených jedinců rodu Phasmatodea.

Tabulka 10 : Druhá část ekologických vlastností všech měřených jedinců rodu Phasmatodea.

Tabulka 11: Tabulka znázorňuje naměřené hodnoty velikosti genomu všech námi měřených druhů z řádů Mantodea a Phasmatodea.

11 Přílohy

	Df	Sum.sq	Mean.Sq	F-value	Pr(>F)
Druh	16	90.23	5.639	X.89	0.00371**
Residuals	6	03.XI	5.518		

Příloha č. 1: V tabulce vidíme výsledky Anova testu z programu RStudio (verze 3.6.1) pro celkový řád Mantodea.

	Df	Sum.sq	Mean.Sq	F-value	Pr(>F)
Čeledě	3	38.71	12.904	4.488	0.0153*
Residuals	3	54.63	2.875		

Příloha č. 2: V tabulce vidíme výsledky Anova testu z programu RStudio (verze 3.6.1) pro všechny čeledě řádu Mantodea.

	Df	Sum.sq	Mean.Sq	F-value	Pr(>F)
Druh	18	596.5	33.14	43.39	0.000276***
Residuals	5	3.8	0.76		

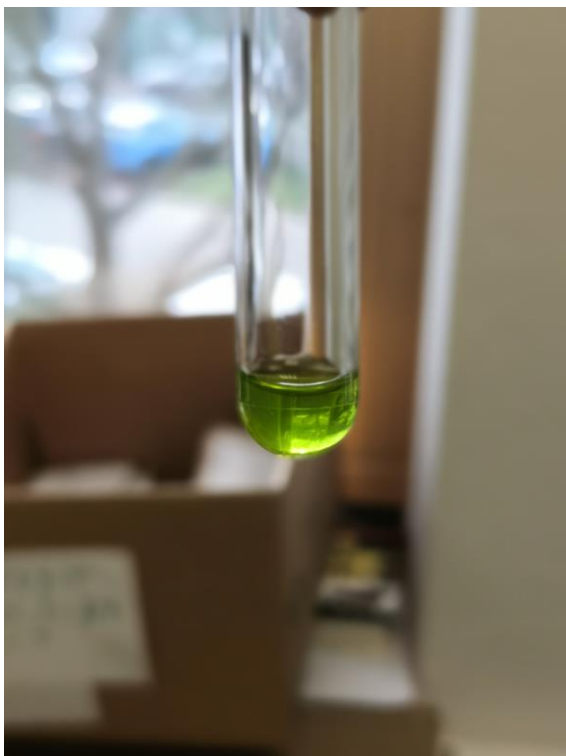
Příloha č. 3: V tabulce vidíme výsledky Anova testu z programu RStudio (verze 3.6.1) pro všechny celkový řád Phasmatodea.

	Df	Sum.sq	Mean.Sq	F-value	Pr(>F)
Druh	9	292.06	32.45	75.01	0.0132*
Residuals	2	0.87	0.43		

Příloha č. 4 V tabulce vidíme výsledky Anova testu z programu RStudio (verze 3.6.1) pro čeled' řádu Phasmatodea.



Příloha č. 5: Potřebné nástroje pro přípravu vzorků (foto autor, 2020)



Příloha č. 6: Izolovaná suspenze jader (foto autor, 2020)



Příloha č. 7: Detailní pohled na průtokový cytometr (foto autor, 2020).