

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**

**FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ**

**KATEDRA EKOLOGIE**



**Analýza velikosti genómu u zástupců rádu  
škorpióny (Chelicerata: Scorpionida) s odlišným  
typem chromozómů**

Genome size of selected groups in scorpions (Chelicerata:  
Scorpionida) with different type of chromosomes

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor práce: Viktória Koval'ová

Vedúci diplomovej práce: Ing. Hana Šípková, Ph.D.

Konzultant: RNDr. František Štáhlavský, Ph.D.

2022

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Viktória Kovaľová

Inženýrská ekologie  
Ochrana přírody

### Název práce

Analýza velikosti genomu u zástupců řádu štírů (Chelicerata: Scorpionida) s odlišným typem chromozomů

### Název anglicky

Genome size of selected groups in scorpions (Chelicerata: Scorpionida) with different type of chromosomes

---

### Cíle práce

Cílem práce bude analýza absolutní velikosti genomu u vybraných zástupců řádu štírů (Scorpionida) s přihlédnutím k jejich odlišným ekologickým vlastnostem, fylogenetické pozici, druhové rozmanitosti a typu chromozomů.

Součástí práce bude i literární přehled dosud publikovaných prací zabývajících se problematikou ekologických vlastností této skupiny a velikosti genomu jako druhově specifického parametru.

### Metodika

Diplomová práce navazuje pouze metodicky na práci bakalářskou a studentka využije své zkušenosti nabyté při analýzách na průtokovém cytometru.

Práce se bude zabývat řádem Scorpionida, u vybraných jedinců budou exempláře podrobeny analýze průtokové cytometrie a zjištěna absolutní velikost genomu. Zástupci čeledi Butidae mají holocentrické chromozomy i odlišné fylogenetické postavení v rámci celého řádu štírů. U ostatních čeledí štírů převažuje výskyt monocentrických chromozomů.

Jedna z otázek, které si lze položit: je velikosti genomu u štírů korelována s výskytem odlišného typu chromozomů (holocentrické, monocentrické) nebo s životní strategií (toxicitou) či fylogenezí?

Analýzy budou prováděny dvoustupňovou metodikou dle Otto 1990 (Doležel et al. 2007) s využitím průtokové cytometrie a propidium iodidu jako fluorescenčního barviva.

Získaná data autorka statisticky zpracuje (zhodnocení mezidruhových rozdílů pomocí ANOVy, Tukyho testu, boxplotů s přihlédnutím k ekologickým vlastnostem) a vhodnou diskuzí zhodnotí výsledky s ohledem na již publikované práce.

Doporučený rozsah práce

cca 40 stran

Klíčová slova

flow cytometry (FCM), scorpionida, absolute genome size, chromosomes

---

Doporučené zdroje informací

Doležel, J., Greilhuber, J., a Suda, J., 2007a: Flow Cytometry with Plant Cells (Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH).

Doležel, J., Greilhuber, J., a Suda, J., 2007b: Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nat. Protoc.* 2, 2233–2244.

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

He K., Lin K., Wang G. and Li F., 2016: Genome Sizes of Nine Insect Species Determined by Flow Cytometry and k-mer Analysis. *Front. Physiol.* 7:569.

Klessner R., Husemann M., Schmitt T., Sousa P., Moussi A. and Habel J.Ch, 2021: Molecular biogeography of the Mediterranean *Buthus* species complex (Scorpiones: Buthidae) at its southern Palearctic margin. *Biological Journal of the Linnean Society.* 133: 166-178.

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

Sadilek D., Urfus T. and Vilimová J.: 2019: Genome Size and Sex Chromosome Variability of Bed Bugs Feeding on Animal Hosts Compared to *Cimex lectularius* Parasitizing Human (Heteroptera: Cimicidae). *Cytometry Part A*, 95A: 1158–1166.

Šťáhlavský F., Nguyen P., Sadilek D., Štundlová J., Just P., Haddad CH., Koc H., Ranawana K., Stockmann M., Yagmur E.A. and Kovařík F., 2020: Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of buthid scorpions (Chelicerata: Arachnida). *Biological Journal of the Linnean Society.* 131: 547-565.

---

Předběžný termín obhajoby

2021/22 LS – FZP

Vedoucí práce

Ing. Hana Šípková, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie

Elektronicky schváleno dne 24. 2. 2022

prof. Mgr. Bohumil Mandák, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 25. 2. 2022

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 13. 03. 2022

---

**Prehlásenie:**

Prehlasujem, že som diplomovú prácu na tému: Analýza veľkosti genómu u zástupcov rádu škorpióny (Chelicerata: Scorpionida) s odlišným typom chromozómov vypracovala samostatne a citovala som všetky informačné zdroje, ktoré som v práci použila a ktoré som taktiež uviedla na konci práce v zozname použitých informačných zdrojov. Som si vedomá, že na moju diplomovú prácu sa plne vzťahuje zákon č. 121/2000 Sb., o práve autorskom, o právach súvisiacich s právom autorským a o zmene niektorých zákonov, v znení neskorších predpisov, predovšetkým ustanovenia § 35 odst. 3 tohoto zákona, tj. o užití tohoto diela. Som si vedomá, že odovzdaním diplomovej práce súhlasím s jej zverejnením podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o zmene a doplnení ďalších zákonov, v znení neskorších predpisov, a to i bez ohľadu na výsledok jej obhajoby. Svojím podpisom taktiež prehlasujem, že elektronická verzia práce je totožná s verziou tlačenou a že s údajmi uvedenými v práci bolo nakladané v súvislosti s GDPR.

V Prahe

Podpis

## PodĀkovanie

V prvom rade chcem poĀakovať svojej školiteľke Hanke Šípkovej za trpezlivosť, cenné rady a všetok čas, ktorý mi v priebehu písania tejto práce a celého magisterského štúdia venovala. Taktiež Āakujem za pomoc pri analýzach v cytometrickom laboratóriu a hodiny strávené pri nastavovaní cytometru, ktorý nie vždy spolupracoval.

Veľké Āakujem patrí aj Františkovi Šťáhlavskému za poskytnutie materiálu pre moju prácu a pripomienky k textu. Āakujem aj za cenné rady, bez ktorých by táto práca nemohla vzniknúť.

Āalej by som chcela poĀakovať svojej rodine, blízkym a spoluĀiakom za psychickú podporu počas celého štúdia. Āakujem za všetky priateľstvá a vzťahy ktoré počas štúdia vznikli, vĀaka ktorým boli všetky hodiny a terénne cvičenia príjemnejšie. Osobitne by som chcela poĀakovať spoluĀiakovi PĀemkovi Královi za pomoc pri štatistických analýzach, ktoré nám všetkým dali zabráť.

**Abstrakt:**

Na stanovenie veľkosti genómu existuje v súčasnosti viacero metód a jednou z nich je prietoková cytometria. Touto metódou sme stanovovali veľkosť genómu u rádu škorpióny, starobylej skupiny pavúkovcov známej svojou dlhou evolučnou históriou a ekologickou rozmanitosťou. Zaujímavou vlastnosťou, ktorá bola potvrdená u čeľade Buthidae, je prítomnosť holocentrických chromozómov, pričom u zvyšných čeľadí ktoré boli preskúmané, boli potvrdené monocentrické chromozómy. Z nášho merania vykazovala čeľaď s holocentrickými chromozómami priemerne podstatne menšie veľkosti genómu ( $2C = 2,5$  pg) ako čeľade s monocentrickými chromozómami ( $2C = 12,5$  pg). Z ôsmich analyzovaných čeľadí mala najmenšiu veľkosť genómu čeľaď Buthidae ( $2C = 1,2$  pg) a najväčšiu veľkosť genómu čeľadí Euscorpiidae ( $2C = 20,37$  pg), ktorá mala aj najvyššiu variabilitu v rámci čeľade ( $2C = 7,6–20,37$  pg). Tieto analýzy boli prevedené zo svalového tkaniva kráčavej končatiny, ktoré vykazovalo najkvalitnejšie analýzy spomedzi tkanív cievnej sústavy, nervovej sústavy, čreva, hemolymfy a gonád. U väčšiny jedincov bolo rozlíšené pohlavie, a štatisticky sa nám podarilo overiť rozdiel vo veľkosti genómu medzi pohlavím u druhu *Alpiscorpius beta* (Di Caporiacco, 1950), kde signifikantný rozdiel medzi samcami a samicami potvrdený nebol.

V práci boli taktiež stanovené počty chromozómov u šiestich čeľadí s hodnotami od  $2n = 14$  u čeľade Buthidae po  $2n = 138$  u čeľade Euscorpiidae. Čeľaď Buthidae vykazovala konštantné počty chromozómov na medzidruhovej úrovni. Závislosť medzi veľkosťou genómu a počtom chromozómov u týchto čeľadí potvrdená nebola.

**Kľúčové slová:** veľkosť genómu, prietoková cytometria, cytogenetika, štúry

**Abstract:**

Genome size can be determined by multiple methods and one of them is flow cytometry, which was used in this thesis. We determined genome size in order Scorpionida, an ancient group of Arachnida known for its extensive evolution history and ecological diversity. One of their interesting features that was confirmed in Buthidae family is presence of holocentric chromosomes, while in rest of examined families monocentric chromosomes were confirmed. According to our results, family with holocentric chromosomes showed substantially smaller genome size ( $2C = 2,5$  pg) than families with monocentric chromosomes ( $2C = 12,5$  pg). Out of 8 analyzed families, Buthidae had smallest genome size ( $2C = 1,2$  pg) and Euscorpiidae had largest genome size ( $2C = 20,37$  pg). Euscorpiidae also showed biggest variability within family ( $2C = 7,6-20,37$  pg).

Analyses were performed on muscle tissue, which yielded higher quality results than tissues of vascular system, nervous system, intestine, hemolymph and gonads. For majority of individuals, gender was distinguished. We were able to examine genome size of different sexes of *Alpiscorpius beta*, where a significant difference was not confirmed.

In this thesis we also determined chromosome numbers in six families with values from  $2n = 14$  in Buthidae to  $2n = 138$  in Euscorpiidae. Buthidae have shown constant chromosome numbers on interspecific level. The relationship between genome size and chromosome number in these families was not confirmed.

Key words: genome size, flow cytometry, cytogenetics, scorpions

# Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cieľ práce .....	2
3. Prietokový cytometer.....	3
3.1 Princíp metódy.....	3
3.1.1 Fluidný systém .....	4
3.1.2 Optický systém.....	4
3.1.3 Detekčný systém .....	5
3.2 Fluorescenčné farbivá .....	5
3.3 Štandardy .....	6
3.4 Využitie.....	8
3.5 Veľkosť genómu u pavúkovcov .....	8
4. Charakteristika škorpiónov .....	10
4.1 Morfológia.....	10
4.2 Biológia.....	11
4.3 Klasifikácia a fylogenéza škorpiónov.....	13
5. Cytogenetika škorpiónov .....	15
5.1 Kinetická organizácia chromozómov .....	15
5.2 Využitie cytogenetiky u škorpiónov .....	17
6. Metodika .....	19
6.1 Materiál.....	19
6.2 Príprava materiálu na meranie veľkosti genómu.....	19
6.3 Príprava farbiva .....	20
6.4 Analýza prietokovým cytometrom.....	21
6.5 Štatistické spracovanie výsledkov.....	24
6.6 Analýza karyotypu.....	25
7. Výsledky .....	26
7.1 Prehľadná tabuľka analyzovaných jedincov.....	26
7.2 Veľkosť genómu jednotlivých čeladií.....	33
7.3 Evolúcia veľkosti genómu .....	35
7.4 Počet chromozómov jednotlivých čeladií.....	36
7.5 Porovnanie veľkosti genómu čeladií Euscorpiidae a Buthidae.....	37
7.6 Závislosť veľkosti genómu a počtu chromozómov u čeladií Buthidae a Euscorpiidae .....	38
7.7 Analýza genómu jednotlivých tkanív druhu <i>Pandinurus exitialis</i> .....	40
7.8 Rozdiel vo veľkosti genómu medzi pohlavím.....	41



8. Diskusia .....	43
8.1 Veľkosť genómu .....	43
8.2 Štandardy .....	46
8.3 Tkanivá .....	47
8.4 Evolúcia veľkosti genómu u škorpiónov.....	49
8.5 Počet chromozómov .....	50
8.6 Závislosť veľkosti genómu na počte chromozómov.....	51
8.7 Rozdiel medzi samcami a samicami.....	52
9. Záver.....	53
10. Literatúra.....	54
11. Prílohy .....	63

# 1. Úvod

Metódy analýzy založené na fluorescencii sú stále využívané pre svoje široké uplatnenie. Fluorescenčné analýzy ako je prietoková cytometria je rozšírená v mnohých odvetviach výskumu a priemyselných aplikáciách. Vďaka modernizácii techniky a zvýšeniu citlivosti sa otvorili nové možnosti na sledovanie a analýzu bunkového jadra. V súčasnosti môžeme sledovať fundamentálne bunkové vlastnosti ako je bunková integrita, enzymatická aktivita, obsah DNA a RNA. Pri aplikácii vhodných fluorescenčných farbív je možné aj z veľmi malého objemu vzorky získať veľké množstvo informácií o stave bunkovej kultúry (Shapiro 2003). Prietoková cytometria našla najväčšie uplatnenie v biomedicínskom výskume, v botanike, a to pri určovaní druhov, štúdiu ploídie, evolúcii genómu, alebo detekcii hybridizácie. (Kron a kol. 2007). Na štúdium triedy pavúkovce, konkrétne rádu štúry, však táto metóda nie je veľmi využívaná. Existuje len obmedzený počet štúdií, ktoré sa venujú analýze veľkosti genómu u vybraných taxónov. Táto metóda má ale oproti iným metódam veľké množstvo výhod ako napríklad vysoká presnosť merania, rýchlosť analýzy a pomerne nízka finančná náročnosť (Suda 2011).

Trieda pavúkovce (Arachnida) je starobylá skupina v rámci kmeňa článkonožcov (Arthropoda). V rámci tejto triedy rozlišujeme jedenásť rádov a jedným z nich je rád štúry (Scorpiones) (Selden a kol. 1991). V posledných rokoch došlo k veľkým zmenám vo fylogenéze štúrov vďaka kladistickým analýzám s využitím hlavne molekulárnych metód. Vďaka cytogenetike bola potvrdená prítomnosť holocentrických chromozómov u čeľade Buthidae (Fet a Soleglad 2003). U ďalších čeľadí z rádu štúry bola potvrdená prítomnosť chromozómov monocentrických. Ďalej sa u škorpiónov vyskytuje značná diverzita v diploidnom počte chromozómov v rozpätí od  $2n = 5$  (*Tityus bahiensis* (Perty, 1833); Buthidae) (Schneider a kol. 2009) do  $2n = 186$  (*Chaerilus stockmannorum* Kovařík a kol., 2018; Chaerilidae) (Kovařík a kol. 2018). Pre štúrov je charakteristická aj achiazmatická meióza, ktorá bola zistená u všetkých doposiaľ analyzovaných čeľadí. Taktiež u nich neboli identifikované pohlavné chromozómy (Ullerich 1961). Ako som spomínala vyššie, napriek veľkej diverzite a zaujímavým charakteristikám existuje len veľmi obmedzené množstvo štúdií zaoberajúcich sa veľkosťou genómu škorpiónov a databáza zvieracích genómov aktuálne obsahuje len 2 druhy z rádu štúry.

## **2. Cieľ práce**

Cieľom práce bola analýza absolútnej veľkosti genómu u vybraných zástupcov rádu škorpióny (Scorpionida) s prihliadnutím na ich odlišné ekologické vlastnosti, fylogenetickú pozíciu, druhovú rozmanitosť a typ chromozómov. Ďalej analýza počtu chromozómov jednotlivých čeľadí a vyhodnotenie závislosti veľkosti genómu od počtu chromozómov u dvoch najpočetnejších čeľadí Buthidae a Euscorpidae. Taktiež bolo za cieľ zanalyzovať veľkosť genómu z jednotlivých tkanív a určiť vhodnosť ich využitia. Posledným cieľom bolo porovnanie veľkostí genómu medzi pohlavím.

### 3. Prietokový cytometer

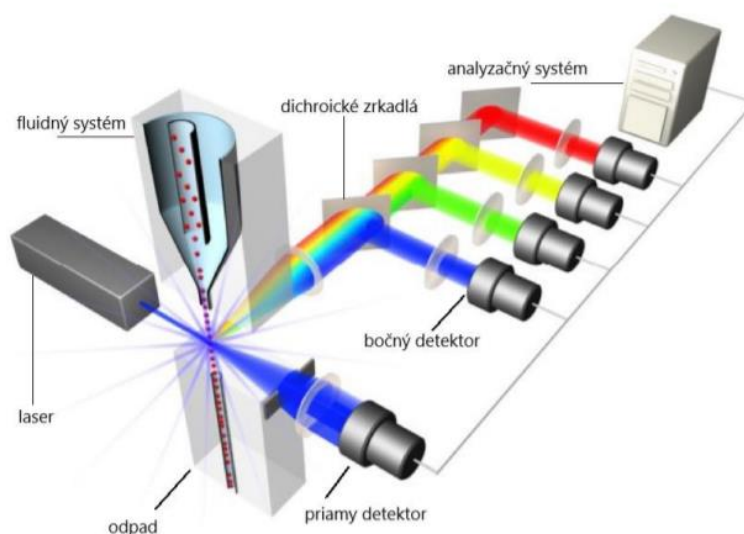
Metóda prietokovej cytometrie (flow cytometry) nám umožňuje štúdium jednotlivých buniek a iných častíc v suspenzii na základe analýzy ich fyzikálnych alebo chemických vlastností. V súčasnosti môžeme analyzovať akúkoľvek suspenziu častíc i s podstatne menšími rozmermi ako bunky (Shapiro 2003).

#### 3.1 Princíp metódy

Princípom prietokovej cytometrie je detekcia fluorescenčného signálu. Na sledovanie konkrétnych znakov je potrebné využiť fluorescenčne značené protilátky alebo fluorescenčné farbivá (fluorochrómy), ktoré sa priamo naviažu na DNA (Shapiro 2003). Zafarbené jadrá následne prechádzajú v suspenzii cez meracie zariadenie jednotlivo. To umožňuje prietoková komôrka do ktorej je vzorka pod tlakom vstriednutá do stredu prúdu kvapaliny (sheat fluid) (Ormerod 1990). Cytometer potom analyzuje bunky, ktoré prechádzajú zdrojom svetla (Givan 2010). Po osvietení bunky lúčom s určitou vlnovou dĺžkou dôjde k emitácii fluorochrómu, pričom emitované žiarenie má inú vlnovú dĺžku, ktorá je detekovaná fotodetektormi (Shapiro 2003).

Na zobrazenie výsledku z merania sa využíva viacrozmerný graf, do ktorého je zanesená intenzita každého zo sledovaných znakov. Jednotlivé jadrá sa následne roztriedia štatistickou analýzou do skupín podľa intenzity jednotlivých znakov (Givan 2001).

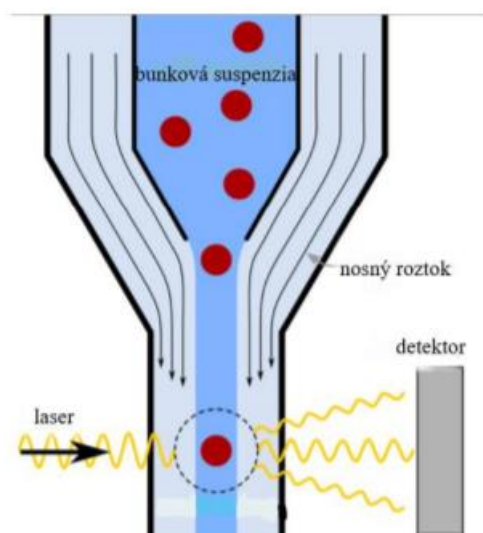
Prietokový cytometer sa skladá z 3 hlavných častí fluidného systému, optického systému a analyzačného systému (obrázok 1) (Pekarčíková a kol. 2014).



Obrázok 1: Prietokový cytometer. Prevzaté z Rowley (2018).

### 3.1.1 Fluidný systém

Fluidný systém zahŕňa prietokovú komoru, do ktorej je vstrekaná tekutina vzorku. Častice sa nachádzajú v suspenzii, kde prechádzajú jednotlivou prietokovou komorou a analyzujú sa osobitne (Robinson 2004). Väčšina moderných optických prietokových cytometerov využíva princíp hydrodynamickej fokusácie, ktorá usmerní prúdenie buniek kanálom radených jedna za druhou (obrázok 2). Týmto sa zabezpečí tok tekutiny vzorky laminárne a zlepši sa presnosť, s akou môže byť vzorka snímaná optickou časťou cytometra (McKinnon 2018). Vzorka je zároveň vstriednutá tak, aby sa vytvoril koaxiálny prúd a nedošlo k zmiešaniu s tekutinou. Cytometrom následne prejde práve jedna častica vďaka zúženým kapiláram (Hawley 2004).



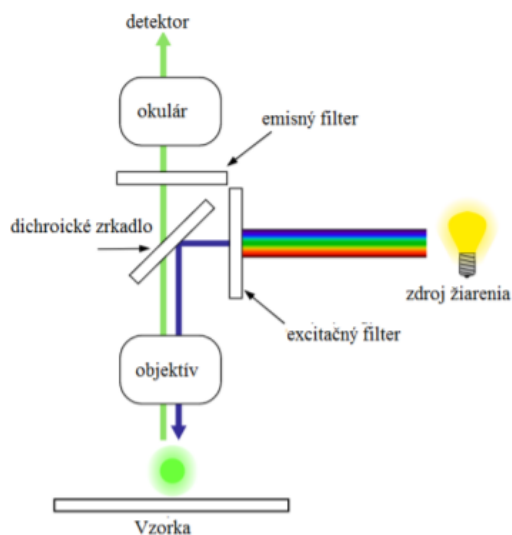
Obrázok 2: Fluidný systém prietokovej cytometrie. Zdroj:

<https://www.ptb.de/cms/en/ptb/fachabteilungen/abt8/fb-84/ag-841/flowzytometrie-841.html>

### 3.1.2 Optický systém

Optika je systém filtrov a zrkadiel, ktorých úlohou je zber vyžiareného svetla. Tieto filtre a zrkadlá zachytávajú fluorescenčné žiarenie, ktoré usmerňujú na aktívnu vrstvu príslušných detektorov a na rozhranie optického a elektronického systému (Shapiro 2003). Svetlo je zachytávané v dvoch smeroch, čo môžeme vidieť na obrázku 1. Ide o predný a bočný rozptyl. Predný rozptyl alebo tiež forward scatter channel (FSC), zachytáva signál v približnom uhle  $160^\circ$  od vychádzajúceho laserového lúča. FSC nám dáva informácie o veľkosti bunky a taktiež dokáže rozlíšiť živé bunky od mŕtvych.

Druhý rozptyl takzvaný side scatter channel (SSC) je zachytávaný v 90° uhle. Ide o sériu dichroických zrkadiel, ktoré poskytujú informácie o členitosti a rozmanitosti vnútorného priestoru bunky (obrázok 3). Dichroické zrkadlá prepúšťajú len žiarenie o určitej vlnovej dĺžke (Marinov 2008).



Obrázok 3: Schéma priechodu žiarenia epifluorescenčným mikroskopom. Prevzaté z Veselá (2017).

### 3.1.3 Detekčný systém

Nakoniec pomocou elektronického systému je možné previesť optický signál na elektrický a vďaka počítačovému softwaru a digitalizovať výsledky. Dáta sa najčastejšie zobrazujú pomocou dvojrozmerného grafu (DOT–PLOT) alebo vo forme histogramu (jednoparametrová analýza) (Pekarčíková a kol. 2014). DOT–PLOT sa využíva pri dvoch parametroch a na osách budeme mať intenzitu fluorescencie meraného parametra. Pri jednoparametrovom histograme máme na osiach hodnotu meraného parametra a to intenzitu fluorescencie (osa x) a na ose y je zobrazený počet zachytených častíc (Shapiro 2003).

## 3.2 Fluorescenčné farbivá

Pre využitie v prietokovej cytometrii sa na bunkovú štruktúru viažu fluorescenční farbivá. Ide o chemické zlúčeniny, ktoré vo svojej molekule obsahujú reaktívnu skupinu, ktorá dokáže reagovať s nukleofilnými skupinami (NH<sub>2</sub>, OH, SH). Fluorochrómy absorbujú svetelnú energiu o určitej vlnovej dĺžke (excitácia) a následne ju vyžarujú v inej vlnovej dĺžke (emisía) (Diaz a kol. 2010).

Každý fluorochróm sa od seba bude odlišovať tým, aké žiarenie bude vyžarovať. Tieto odlišnosti medzi rôznymi fluorochrómmi uľahčuje rozlíšenie medzi jednotlivými populáciami buniek alebo rôznymi bunkovými aktivitami. Pri fluorochrómoch dochádza k Stokesovmu posunu. Tento jav označuje rozdiel medzi excitačnou vlnovou dĺžkou a vlnovou dĺžkou emitovanou. Ideálne je ich zvoliť tak, aby sa ich absorpčné maximum blížilo vlnovým dĺžkam u použitých laserov. (BD Biosciences 2014)

V súčasnosti sa na izoláciu jadra bunky a stabilizáciu suspenzie jadier využíva množstvo rôznych roztokov, ide o takzvané pufry. Fluorochróm je buď súčasťou pufru, alebo sa pridáva po izolácii jadier. Najčastejšie používanými puframi sú Tris–MgCl<sub>2</sub> pufr (Pfosser a kol. 1995), Galbraithov pufr (Galbraith a kol. 1983), LB01 pufr (Doležel a kol. 1989) alebo pufry Otto I a Otto II (Doležel a kol. 1995).

V tejto práci sme pre analýzu využívali farbivo Propidium jodid (PI). Molekulová hmotnosť tohto farbiva je 668,4 g/mol. Ide o takzvané interkalačné činidlo (viaže sa medzi vlákna dvojvláknovej molekuly DNA). Je vhodné na hodnotenie životaschopnosti buniek pomocou prietokovej cytometrie a taktiež k stanoveniu obsahu DNA pri analýze bunkového cyklu (Mortimer 2000). Propidium jodid sa dokáže naviazať i na RNA a preto pre presné výsledky analýzy obsahu DNA sa do vzorky pridáva dostatočné množstvo ribonukleázy (Doležel a kol. 2005).

Ďalším často využívaným farbivom takzvané DAPI, ktoré sme taktiež v práci využívali. Celý názov farbiva je 4', 6–diamidino–2–fenylindol dihydrochlorid a viaže sa s vysokou afinitou do malého žliabku B–DNA, a to preferenčne do oblastí s vysokou hustotou báze adenín, thymin (Breusegem a kol. 2002). Maximálna excitácia celku DAPI–DNA je dosiahnutá UV–žiarením s vlnovou dĺžkou 358 nm, maximum emisie prebieha v oblasti viditeľného svetla s vlnovou dĺžkou 461 nm (Amalfitano a kol., 2008).

### **3.3 Štandardy**

Na stanovenie veľkosti jadrového genómu sa používajú takzvané štandardy. Ide o rastliny u ktorých poznáme veľkosť genómu. Veľkosť genómu zistíme tak, že jadrá meranej rastliny a štandardu odizolujeme a zafarbíme spoločne (tzv. interná štandardizácia). Dôležitý je pomer intenzity fluorescencie štandardu a skúmanej vzorky, na základe ktorého potom určíme výsledok (Doležel a kol. 2005).

Na vyhodnotenie výsledku analýzy na prietokovom cytometri musíme využiť takzvané štandardy. Štandardy slúžia na porovnanie so vzorkou. Parametrie štandardu sú dopredu známe ako počet chromozómov a jeho veľkosť genómu. (Doležel a kol. 2007).

Rozlišujeme dve štandardizácie a to internú a externú. Externá v súčasnosti nie je veľmi využívaná a najčastejšie sa využíva interná. Pri tejto štandardizácii sú vo vhodnom pomere vzorky zmiešané a súčasne prebieha ich príprava aj meranie (Doležel a kol. 2010).

Pri vyberaní vhodného štandardu, by sme mali vyberať štandard s podobnou veľkosťou genómu ako skúmaná vzorka. Zároveň by však nemali byť natoľko totožné aby nedošlo k prekrytiu peakov v histograme. (Johnston a kol. 1999).

### **3.3.1 Stanovenie veľkosti genómu**

Podľa Tiersch a kol. (1989) definujeme veľkosť genómu ako množstvo DNA v haploidnom genóme. Existuje mnoho ďalších definícií, napríklad Doležel a kol. (2003) definuje veľkosť genómu ako celkové množstvo DNA a predstavuje rovnakú kópiu dedičnej informácie organizmu (C–hodnota).

Veľkosť genómu nesúvisí s komplexnosťou organizmu. Ide o takzvanú záhadnú C–hodnota alebo C–value paradox (Gregory 2005). Paradoxom hodnoty C je, že množstvo DNA v haploidnom genóme (hodnota 1C) neodpovedá zložitosti organizmu a hodnoty 1C môžu byť extrémne variabilné. Veľká časť DNA je zložená z opakujúcich sa sekvencií rôznych dĺžok (Praça–Fontes a kol. 2011). Toto naznačuje, že genómy môžu obsahovať podstatnú časť DNA inú ako gény a ich regulačné sekvencie (Eddy 2012)

Rozlišujeme dva typy veľkosti genómu. Veľkosť holoploidného genómu (hodnota C), kde ide o obsah DNA v nereplikovanom haploidnom jadre (neberieme ohľad na úroveň ploídie). Druhý typ je veľkosť homoploidného genómu (hodnota Cx), kde pozeráme na obsah DNA v monoploidnej chromozómovej sade (polyploidi).

Rozdiely vo veľkosti genómov sú v diploidných a polyploidných druhoch. Pri diploidných druhoch sa veľkosti holoploidných a homoploidných genómov rovnajú. Pri polyploidných druhoch je väčší holoploidný genóm. Hodnoty sa vyjadrujú v picogramoch DNA alebo v pároch megabáz (1 pg = 978 Mbp). Využitie známej veľkosti genómu môžeme napríklad k detekcii hybridov z homoploidných krížení (predpokladáme ale, že sa rodičia dostatočne líšia vo svojej veľkosti genómu). V tomto prípade môžeme jednoducho detekovať ich homoploidných krížencov, ďalej napríklad predvídať rôzne fenotypové znaky alebo ekologické a fenologické správanie. Je možná aj identifikácia druhov s rovnakým chromozomovým počtom, v niektorých rastlinných alianciách sa vyskytuje druhovo špecifická veľkosť genómu (Řepková 2013).



### 3.4 Využitie

Prietoková cytometria hraje významnú rolu v modernej biológii a medicíne. V súčasnosti sa prietoková cytometria využíva pro v oboroch hematológie, onkológie, patológie, imunológie a bunkovej biológii (Watson 1991).

Využíva sa k zhodnoteniu relatívneho a taktiež absolútneho obsahu DNA v rôznych typoch buniek alebo chromozomového profilu bunkových populácií. Pri správnom použití fluorescenčných farbív môžeme monitorovať delenie bunkového cyklu, lokalizovať S fázu a jej cyklus, ďalej napríklad abnormality počas mitózy (Crissman a kol. 1994). Ďalšie dôležité využitie má v oblasti štúdia jaderovej DNA, genovej expresii alebo pri triedení a počítaní buniek (Suda 2005).

V biológii pri štúdiu rastlín sa často stanovuje stupeň ploídie. U rastlín často dochádza k zmnoženiu chromozómových sad a k polyploidizácii (Suda, 2011). Čo sa týka živočíchov, tento jav nie je častý, predpokladá sa ale, že polyploidizácia hrala významnú rolu pri evolúcii niektorých hmyzích taxónov (Ghiselli a kol., 2007). Polyploidia sa u hmyzu často spája s partenogéziou (Otto a kol., 2000), to je známe napríklad u pakobyliiek (*Phasmida*) (Scali, 2009). Pri výzkuve hmyzu sa prietoková cytometria uplatňuje pri haplo–diploidnom určení pohlavia. (Schrempf a kol. 2006). Samice sú zväčša diploidné a samci haploidní (Butcher a kol. 2000).

Vďaka fluorescenčným farbivám, môžeme skúmať aj pomer A–T a G–C bází, pretože sa preferenčne viažu na tieto báze (Watson 1991). Na túto analýzu je potrebný prepočet pomocou vzorca, pretože intenzita fluorescencie nie je priamo úmerná obsahu bázi (Godelle a kol. 1993). Pomocou štúdií sa zistilo, že väčšie zastúpenie A–T bází sa nachádza u druhov ktoré sú odolnejšie na vonkajšie podmienky. (Šmarda a kol. 2008) a taktiež je pre nich jednoduchšia kolonizácia nového prostredia (Sharaf a kol. 2010).

### 3.5 Veľkosť genómu u pavúkovcov

Pavúkovce (Arachnida) sú početná a nápadná živočíšna skupina. Obývajú takmer každý suchozemský habitat, no majú aj s niekoľko sladkovodných a morských zástupcov. Primárne sú to dravce ,no niektoré skupiny ako zberači (Opiliones) a niektoré roztoče a kliešte (Acari) sú bylinožravé, detritivózne alebo parazitické. Táto veľmi rôznorodá skupina článkonožce zahŕňa v mnohých prípadoch ekonomicky a medicínsky významné taxóny ako sú roztoče a kliešte, pavúky a škorpióny. Niektoré pavúkovce sú škodcami alebo prenášačmi chorôb (Ballesteros a Sharma 2019). Odhaduje sa, že trieda Arachnida obsahuje viac ako 600 000 druhov z ktorých viac ako 100 000 je vedecky popísaných (Chapman 2006).

Ako som spomenula vyššie, vďaka ekologickému a socioekonomickému významu boli mnohé druhy pavúkovcov podrobené sekvenovaniu celého genómu. Väčšina z nich bola ale zameraná na skupinu Acari. Ďalšie druhy u ktorých bol sekvenovaný celý genóm je napríklad snovačka zlatého hodvábu *Nephila clavipes* (Linnaeus, 1767) (Babb a kol. 2017), škorpión čínsky *Mesobuthus martensii* (Karsch, 1879) (Cao a kol. 2013) a obrovská brazílska tarantula *Acanthoscurria geniculata* (C. L. Koch, 1841) (Sanggaard a kol. 2014).

Bohužiaľ, čo sa týka analýz veľkosti genómu pavúkovcov, existuje len minimálne množstvo štúdií. Gregory a Shorthouse (2003) študovali veľkosť genómu dvojplúcnych pavúkov, ale štúdia je takmer 20 rokov stará. Databáza zvieracích genómov aktuálne obsahuje 148 záznamov pavúkovcov z toho 122 pavúkov (Araneae), 24 roztočov a kliešťov (Acari) a len 2 škorpióny (Scorpiones) (Gregory 2022). Veľkou nevýhodou väčšiny údajov o najlepšie preskúmanom ráde pavúkov v tejto databáze je tiež fakt, že veľká časť údajov bola získaná z geograficky malej oblasti v Ontáriu v Kanade (Gregory a Shorthouse 2003). Jednou z mála doplňujúcich štúdií v poslednej dobe je štúdia zameraná na analýzu veľkosti genómu haplogynných pavúkov (Kráľ a kol. 2019). V štúdiu sa konkrétne zameriavajú na porovnanie pavúkov s holokinetickými a monocentrickými chromozómami. Všetky študované čeľade s holokinetickými chromozómami v tejto štúdiu vykazovali podstatne nižšie počty chromozómov a menšie veľkosti genómov. Taktiež bol preukázaný menší rozptyl veľkostí genómu u skupiny s holokinetickými chromozómami.

## 4. Charakteristika škorpiónov

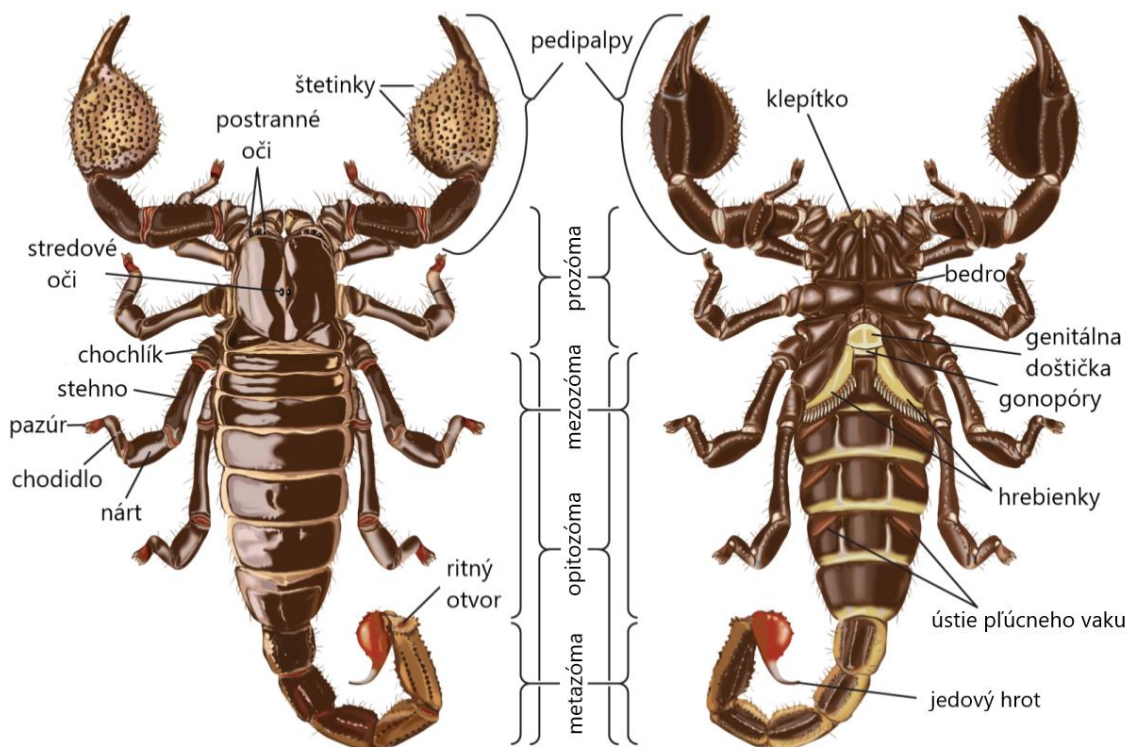
V rámci rádu Škorpióny (Scorpiones) je aktuálne popísaných vyše 2 600 druhov a ide tak o stredne početný rád triedy pavúkovcov (Arachnida) (Rein 2022). Škorpióny sú v rámci tejto triedy navyše jednou z najstarších skupín, ktorých história siaha prinajmenšom do obdobia Silúru, pred asi 400 miliónmi rokov. Predpokladá sa, že začali ako vodné článkonožce, o čom svedčí nedostatok tarzálnych pazúrov, ktoré sa objavili na prvom fosílnom škorpiónovi – *Palaeophonus* (Thorell a Lindström, 1884). Niektoré z najstarších foriem by mohli mať žiabre, to však nie je vedecky jasne dokázané. Niektoré druhy začali obývať súš už v devóne, v silúre (asi pred 420 miliónmi rokov), boli pravdepodobne už suchozemské. V karbone (pred 350 miliónmi rokov) boli mnohé takmer na nerozoznanie od dnešných foriem škorpiónov. Niektoré formy (vrátane tých prvých) mali pravdepodobne zložené oči, tie sa ale stratili až na malý zhluk „jednoduchých očí“ v predných rohoch panciera. Škorpióny boli považovaní hlavne za blízkych príbuzných buď zberačom (Opiliones), alebo vyhynutým Eurypterida (niekedy označovaní ako morské škorpióny) (Prendini 2000). V súčasnej chvíli sa naopak považujú za sesterskú líniu skupiny Tetrapulmonata, ktorá zahŕňa aj ďalšie rady pavúkovcov, ktorí na dýchanie využívajú pľúcne vaky, ako sú napríklad pavúky a bičovci (Sharma a kol. 2014).

### 4.1 Morfológia

Anatómia škorpiónov sa od silúrskeho obdobia (pred 443 až 417 miliónmi rokov) zmenila len málo. Škorpióny majú viditeľných 18 telových segmentov a na rozdiel od ostatných pavúkovcov, majú silne segmentovanú štruktúru srdca a nervového systému. Namiesto priedušníc, ktoré sú vyvinuté na dýchanie vzdušného kyslíka, u mnohých iných skupín článkonožcov majú na dýchanie pľúcne vaky, ktoré sa považujú za pôvodný znak pavúkovcov (Polis a kol. 2020).

Telo škorpiónov tvoria tri hlavné časti – prozóma, mezozóma a metazóma. Mezozóma a metazóma spolu tvorí brucho alebo opitozóm (obrázok 4). Prozóma má šesť segmentov, každý s párom prívěskov. Trojsegmentové chelicéry, ktoré vychádzajú z prvého segmentu, sú kliešťovité (chelátové) a slúžia na žuvanie potravy. Pedipalpy vychádzajú z druhého segmentu a sú zakončené kliešťami. Pedipalpy slúžia na zachytávanie koristi, obranu, dvorenie a vykopávanie nory. Na segmentoch tri až šesť sa nachádza pár nôh. Pedipalpy a nohy sa skladajú zo siedmich segmentov. Nohy končia tarzálnymi pazúrami, ktorými sa škorpióny zachytávajú povrchu počas chôdze (Clarkson a kol. 2020).

Mezozóma sa skladá zo siedmich článkov. Prvý mezozomálny segment nesie gonopór prekrytý genitálnym operculom. Druhý segment obsahuje špecifický zmyslový orgán pecten (mechano–chemoreceptor). Na zvyšku článkov mezozomatu sa nachádzajú štyri páry spirakulárnych otvorov, vedúcich do pľúcnych vakov škorpióna. Tento počet pľúcnych vakov je považovaný za pôvodný počet a je najvyšší v triede pavúkovcov. Koniec tela je tvorený metazómom, ktorý je zložený z piatich pravých telových článkov a zakončuje ju telsonom. Telsonom obsahuje jedovú žľazu, ktorá vyúsťuje na jeho konci a slúži na lov koristi a k obrane (Polis 1990).



Obrázok 4: Popis stavby tela škorpióna. Zdroj: <https://www.britannica.com/animal/scorpion/Ecology-and-habitats>.

## 4.2 Biológia

Rozmnožovanie je sezónne a väčšinou prebieha počas teplých mesiacov, od konca jari do začiatku jesene. Samce prechádzajú stovky metrov aby našli vhodnú samicu na párenie. Samce pravdepodobne lokalizujú samice pomocou feromónu, ktorý samica vypúšťa z konca brucha. Páreniu u škorpiónov predchádza komplikované a charakteristické dvorenie, ktoré iniciuje samec. Najprv sa postaví tvárou k samici a uchopí ju pomocou klieští (pedipalp). Potom sa pár pohybuje v tanci nazývanom promenáda à deux.

Pár sa usiluje nájsť hladký povrch, na ktorý samec vytlačí žľazový sekret tvoriaci stopku, ku ktorej je pripojený spermatofor (obsahuje spermie) (Polis 2020). Potom manévruje samicu tak, aby sa jej genitálny otvor spojil so spermatofórom. Spermie sú následne vymrštené do pohlavného otvoru (gonopóru) samice. Samice niekedy zabijú a zjedia samcov, ktorí po párení zostanú v blízkosti samíc (Jiao a kol. 2009).

Samičky sú živorodé, zárodok sa môže vyvíjať v špeciálne prispôsobených vývodoch pohlavných ciest z vlastných zásob, alebo pomocou orgánov ktoré sú analogické k placente cicavcov. Embryá sú napojené na matkin telesný obeh a mláďatá vyživuje samica počas ich embryonálneho vývoja vo vnútri svojho tela. Gravidita je rôzne dlhá, pohybuje sa v rozmedzí od 30 do 540 dní. Mláďatá opúšťajú trup matky po vyzliekaní počas niekoľkých dní a pokúšajú sa nájsť drobnú potravu v okolí. Počas ďalších štrnástich dní už mláďatá u väčšiny druhov matku opustia (Kovařík 1999). Škorpióny sa dožívajú v priemere od 5 do 8 rokov, ale niektoré druhy sa môžu dožívať až 25 let (Polis 1990). Väčšina čeládí škorpiónov sa radí ku K–stratégom, ide o väčšie druhy ktoré žijú v stabilnejších habitatoch, majú dlhší životný cyklus a starajú sa o niekoľko väčších potomkov. Jediná čelad' škorpiónov, ktorá sa vyznačuje r–stratégmi je čelad' Buthidae, ktorá sa vyznačuje malými jedincami, krátkym životným cyklom a bohatým potomstvom (Monge Nájera 2019).

Škorpióny sa živia malým hmyzom, článkonožcami alebo malými stavovcami, ako sú myši alebo jašterice. Mláďatá zachytávajú korisť pomocou jedovatého žihadla, zatiaľ čo dospelí používajú kliešte, ktorými korisť rozdrvia. Škorpión zvyčajne uchopí korisť na oboch koncoch, čím dosiahne zovretie hlavy jedným pedipalpom, ktorý je pri použití sily často smrteľný. Korisť si často predáva z pedipalpu do pedipalpu, aby si našiel čo najefektívnejší úchop (Casper 1985). Je taktiež zaujímavé, že v rámci evolúcie škorpiónov došlo k výraznej diferenciacii zloženia jedu – čelad' Buthidae zjavne predstavuje samostatnú líniu v rámci škorpiónov ktorého zloženie jedu umožňuje efektívnejšie pôsobenie na stavovce. Z tohto dôvodu sa aj väčšina nebezpečných druhov pre človeka radí do tejto čelade (Santibáñez–López a kol. 2020)

Hoci škorpióny nie sú morfológicky veľmi rôznorodé, sú celkom prispôsobivé z hľadiska ekológie, fyziológie a histórie života. Niektoré druhy prežijú niekoľko týždňov pri teplote pod bodom mrazu, no pri návrate do normálnej teploty sa vrátia na normálnu úroveň aktivity v priebehu niekoľkých hodín. Iné prežijú ponorené pod vodou až jeden alebo dva dni. Púštne škorpióny vydržia teploty 47 °C, čo je o niekoľko stupňov viac ako smrteľné teploty pre iné púštne článkonožce (Polis a kol. 2020).

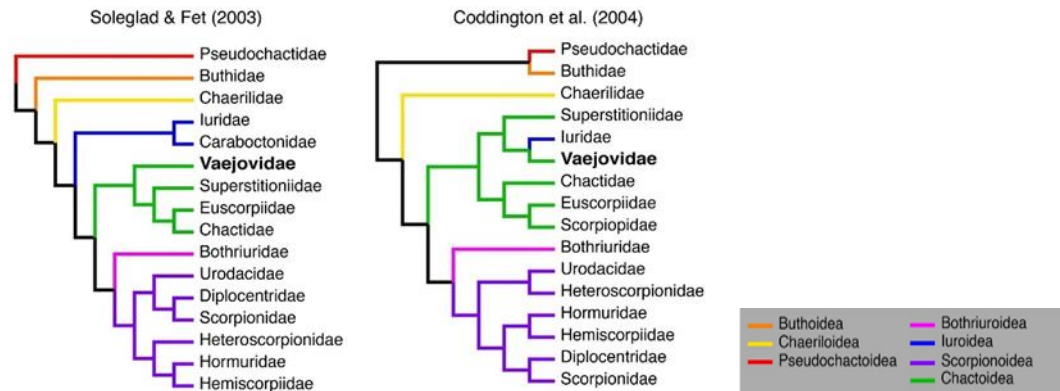
### 4.3 Klasifikácia a fylogenéza škorpiónov

Taxonómia a i pohľad na fylogézu škorpiónov prešiel v posledných rokoch veľkými zmenami a to hlavne vďaka využitiu molekulárnych metód. Sissom (1990) rozdeľoval na základe čisto morfológických znakov deväť čeládí (Bothriuridae, Buthidae, Chactidae, Chaerilidae, Diplocentridae, Ischnuridae, Luridae, Scorpionidae a Vaejovidae). Do roku 2000 sa tento počet takmer zdvojnásobil na 16 čeládí a to vďaka využitiu kladistických analýz (Soleglad a Sissom 2001). V rámci tejto štúdie sa využívali čisto morfológické znaky ako napr. štruktúry hrudnej kosti, gnathobáze, nôh, chelicerálneho chrupu a jedovej žľazy, počet a distribúcie laterálnych očí a pedipalpálnej trichobotrie, ale i embryonálny vývoj a anatómia reprodukčného systému. Ďalšie úpravy a zmeny vo vyššej klasifikácii škorpiónov publikovali Soleglad a Fet (2003, 2005) či Prendini a Wheeler (2005), pričom tieto práce sa líšia hlavne v chápaní samostatnosti niektorých čeládí a podčeládí. V podstate do dnes tak neexistuje jeden konkrétny systém v klasifikácii škorpiónov. Názory sa rozdeľujú hlavne v počte čeládí. Soledal a Fet (2003) navrhujú 15 čeládí a na druhej strane Prendini a Wheeler navrhujú čeládí 19.

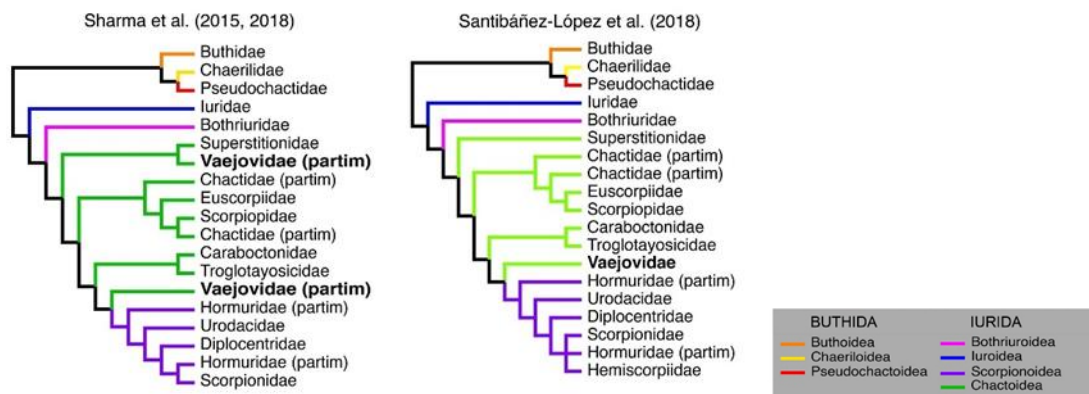
Ďalším rozdielom v názoroch je postavenie bazálnych skupín. Coddington a kol. (2004), rovnako ako Prendini a Wheeler (2005), považujú za bazálne skupiny Buthidae a Pseudochactidae (obrázok 5). Tieto radia k sesterským k ostatným skupinám škorpiónov. Soleglad a Fet (2003) na druhej strane považujú za bazálnu skupinu iba Pseudochactidae (obrázok 5). Problematické sú aj skupiny Diplocentrinae a Urodacinae. Prendini a Wheeler (2005) ich označujú ako čelade, naopak Fet a Soleglad (2003) ich radí ako podčelade v rámci Scorpionidae. Čo sa týka nadčelade Luroidea, Prendini a Wheeler (2005) uznávajú v rámci iba jedinú čelad' Luridae zahrňajúcu podčeladě Caraboctoninae, Hormirinae a Lurinae, naopak Solegal a Fet (2003) zahrňajú pod Luroidea dve čelade a to Luridae a Caraboctonidae. Posledným rozdielom v týchto názoroch sú čelade Scorpionidae a Hemiscorpidae, ktoré považujú Solegal a Fet (2003) za sesterské v rámci Scorpinoidea. Prendini a Wheeler (2005) ale rozlišujú viacero čeládí v rámci tejto skupiny.

V súčasnej chvíli sa škorpióny delia na dve hlavné skupiny, Lurida a Buthida (obrázok 6). V rámci týchto skupín sa ale nachádzajú čelade, ktoré zdieľajú niektoré znaky s oboma skupinami. Ide o čelad' Chaerilidae a Pseudochactidae (Sharma a kol. 2015). Coddington (2004) najprv zaradil čelad' Chaerilidae na základe analýzy morfológických znakov do skupiny Lurida (obrázok 5). Naopak súčasné fylogenetické analýzy ukazujú na blízku príbuznosť čeládí Buthidae, Pseudochactidae a Chaerilidae a všetky tri radia do skupiny Buthida (obrázok 6) (Sharma a kol. 2015; Santibáñez-López a kol. 2019, 2020).

Molekulárne fylogenetické studie taktiež ukázali, že nadčelad' Chactoidea a niektoré morfológicky definované čelade nie sú monofyletické (vid' obrázok 6) (Sharma a kol. 2015; Santibáñez-López a kol. 2019, 2020). S ohľadom na nedostupnosť niektorých kľúčových skupín v súčasných molekulárne fylogenetických štúdiách viac menej stále zatiaľ nemáme k dispozícii plne rozriešené fylogenetické vzťahy v rámci celého rádu ščúry a u niektorých skupín ktoré nie sú zjavne monofyletické Vaejovidae, Chactidae a Hormuridae nebola zatiaľ formálne doriešená ich vyššia klasifikácia.



Obrázok 5: Dve fylogenetické hypotézy vzťahov škorpiónov založených na analýze morfológických znakov. Použité farby korešpondujú nadčeladiam (vysvetlivka vpravo dole). Zdroj: Prevzaté zo Santibáñez-López a kol. (2019).



Obrázok 6: Dve fylogenetické hypotézy vzťahov škorpiónov založených na analýze transkriptomických a genomických dát. Použité farby korešpondujú tradičným morfológickým nadčeladiam (vysvetlivka vpravo dole). Zdroj: Prevzaté zo Santibáñez-López a kol. (2019).

## 5. Cytogenetika škorpiónov

Napriek tomu, že sa v prípade škorpiónov jedná o morfológicky veľmi uniformnú skupinu, tak ide o rád, ktorý má veľmi variabilné počty chromozómov. Diploidné počty chromozómov sú u škorpiónov v rozpätí od  $2n=5$  (*Tityus bahiensis*; Buthidae) (Schneider a kol. 2009) do  $2n=186$  (*Chaerilus stockmannorum*; Chaerilidae) (Kovařík a kol. 2018). Jedná sa tak o najväčší známy rozsah počtu chromozómov v rámci triedy pavúkovci. U iných podobne preskúmaných rádo pavúkovcov je variabilita podstatne nižšia, napríklad rád roztoče dosahuje rozpätie ( $2n = 2-34$ ) (Oliver a Nelson 1967, Weeks a kol. 2001). Viac menej podobný rozsah počtu chromozómov, nie ale na toľko veľký, bol zistený napríklad u sekáčov ( $2n = 10-109$ ) (Tsurusaki 2007), pavúkov ( $2n = 7-152$ ) (Araujo a kol. 2022) a štúrikov ( $2n = 7-143$ ) (Šťáhlavský 2022).

Štúry ďalej vykazujú niektoré špecifické cytogenetické charakteristiky ako je napríklad výskyt achiazmatickej meiózy, ktorá bola zistená u všetkých doposiaľ analyzovaných čeľadí. Aiachmatická meióza je odvodený typ meiózy, ktorý sa vyznačuje neprítomnosťou chiazmat medzi homologickými chromozómami v profáze prvého meiotického delenia, a to v dôsledku absencie procesu, ktorý nazývame crossing-over (Ullerich 1961). Vďaka tejto absencii sa v meiotickom cykle (profáze I) nevyskytujú fázy diplotene a diakinézy (Shanahan 1989). Ďalším spoločným znakom všetkých škorpiónov je tiež absencia morfológicky diferencovaných pohlavných chromozómov, pričom ich existencia u škorpiónov je stále diskutovaná téma (Adilardi a kol. 2016). Zaujímavosťou tiež je, že v rámci celého rádu štúry sa vyskytujú dva rôzne typy kinetickej organizácie chromozómov (viď nižšie), pričom je zrejmé, že v prípade chromozómov s definovanou centromérou sú hlavnými mechanizmami diferenciácie karyotypu hlavne centrická fúzia, inverzia a štiepenie chromozómov, čo sa preukázalo hlavne u skupiny Urodacidae a Euscorpiidae (Shanahan 1989, Štundlová a kol. 2019).

### 5.1 Kinetická organizácia chromozómov

Na základe kinetickej aktivity chromozómov u škorpiónov rozlišujeme dve skupiny, a to chromozómy monocentrické a chromozómy holocentrické. Väčšina pozorovaných čeľadí škorpiónov, všetky sa radia do skupiny lurida, má chromozómy monocentrické (Schneider a kol. 2009). Tieto majú definovanú oblasť centroméry, teda miesto, kde sa upínajú mikrotubuly deliaceho vretienka pri bunkovom delení. Čo sa týka kinetickej aktivity bude lokalizovaná iba v jednom konkrétnom mieste (Melters a kol. 2012).



Druhý typ chromozómov – holocentrický alebo holokinetický, sa vyskytuje u čeľadi Buthidae (Prendini a Wheeler 2005). Tento typ chromozómov má kinetickú aktivitu rozloženú po celej dĺžke chromozómu alebo po jeho značnej časti a chýba mu zreteľná primárna konštrukcia (Dernburg 2001). Čo sa týka jeho vzniku, nie je jasné ako presne vznikol, v minulosti výskyt holokinetických chromozómov v niekoľkých nepríbuzných skupinách naznačoval, že vznikli relatívne jednoduchým, ale nevysvetleným mechanizmom (Kráľ 1994). Jedna z možností ako mohli holokinetické chromozómy vzniknúť zahrňuje následné fúzie viacerých chromozómov a výrazné zmenšenie veľkosti genómu ako uvádza v novšej štúdii Král a kol. (2019). Ich opakovaný výskyt u rôznych organizmov taktiež naznačuje, že holocentrické chromozómy poskytujú určitú selektívnu výhodu, ktorá môže byť obranou pred centromérovým mechanizmom ako uvádza Zedek a Bureš (2016). Ďalej holocentrické chromozómy umožňujú taktiež schopnosť rýchlo meniť rýchlosť rekombinácie prostredníctvom chromozomálnych zoskupení alebo tolerancii k faktorov, ktoré spôsobujú poškodenia chromozómov (Escudero a kol. 2012).

### **Holocentrické chromozómy**

Tento typ chromozómov sa u pavúkovcov vyvinul samostatne mimo škorpiónov a taktiež pri roztočoch skupiny acariformes (Wrensch a kol. 1994) a u štyroch čeľadi pavúkov (Kráľ a kol. 2019). Holocentrické chromozómy v rámci rádu štúry boli zatiaľ preukázané len u čeľadi Buthidae (Shanahan 1989). Táto skupina sa od ostatných čeľadi a evolučných línií škorpiónov líši svojím celosvetovým rozšírením, výrazne vyššou diverzitou (zahrňuje polovinu popísaných druhov) a i zložením jedu (napr. Rein 2022; Santibanez–Lopez a kol. 2020). Silnou toxicitou pre človeka a ostatne stavovce sa totiž v skutočnosti vyznačuje len malá časť škorpiónov a väčšina týchto druhov patrí práve do čeľade Buthidae (Ward a kol. 2018). Pravdepodobne práve vďaka holokinetickým chromosomom má čeľaď Buthidae jeden neobvyklý cytogenetický znak a to multivalentno–meiotické asociácie. Multivalentné asociácie v meióze boli pozorované u približne 50 % druhov zaradených do ôsmich rodov čeľade Buthidae (Mattos a kol. 2013). Najnovšie fylogenetické analýzy označili čeľaď Buthidae, čeľaď Pseudochactidae a čeľaď Chaerilidae ako skupinu Buthida, ktorá predstavuje skoro sa vetviacu líniu celého rádu škorpiónov (Sharma a kol. 2015). U ostatných dvoch čeľadi riadiacich sa do Buthida nebola organizácia chromozómov zatiaľ preukázaná.

U organizmov s holokinetickými chromozómami sa predpokladá, že absencia lokalizovanej centroméry uľahčuje zmeny karyotypu (Melters a kol. 2012). Holokinetický mechanizmus ďalej pomáha vysvetliť značné rozdiely vo veľkosti a počte chromozómov, negatívnu koreláciu medzi počtom chromozómov a veľkosťou genómu, ktorá bola pozorovaná u niektorých taxónov s holokinetickými chromozómami (Bureš a Zedek 2014). Melters a kol. (2012) ale uvádzajú, že druhy s holokinetickými chromozómami vo všeobecnosti nevykazujú zvýšenie diverzity karyotypu. Tento fakt sa dá doložiť i u škorpiónov z čeľade Buthidae, tá má zatiaľ ako jediná známa čeľaď škorpiónov s holocentrickými chromozómami taktiež v porovnaní s ostatnými čeľadami nižší počet chromozómov (od  $2n = 5$  do  $2n = 36$ ) (Schneider a kol. 2022; Šťáhlavský a kol. 2020). Veľké množstvo rodov tejto čeľade má potom konštantné počty chromozómov (napr. *Androctonus*:  $2n = 24$ , *Compsobuthus*:  $2n = 22$ ) (Schneider a kol. 2022). Na druhú stranu ale niektoré juhoamerické druhy majú taktiež vnútrodruhovou variabilitu (napr. *Tityus bahiensis*,  $2n = 5-19$ ) (Schneider a kol. 2009).

### **Monocentrické chromozómy**

Monocentrické chromozómy (s lokalizovanou centromérou) boli aktuálne preukázané zatiaľ u deviatich čeľadi rádu škorpiónov zo skupiny Iurida. Jedinou výnimkou predstavuje len čeľaď Chaerilidae, ktorá je fylogeneticky príbuzná čeľadi Buthidae s holocentrickými chromozómami (patrí do spoločnej línie Buthida) (Sharma a kol. 2015), ale na rozdiel od škorpiónov čeľadi Buthidae majú zástupcovia tejto čisto ázijskej čeľadi pravdepodobne monocentrické chromozómy. Analýzy a práce zaoberajúce sa skupinou Chaerilidae ale u skupiny uvádzajú u jednotlivých druhov predovšetkým diploidný počet chromozómov (Kovařík a kol. 2014). Na druhej strane ale typ chromozómov u nich zatiaľ v skutočnosti nebol bezpečne potvrdený. No vysoký počet chromozómov je zdokumentovaný u tejto čeľadi ( $2n = 76 - 186$ ) a odpovedá skôr skupinám škorpiónov s monocentrickými chromozómami (Kovařík a kol. 2018).

## **5.2 Využitie cytogenetiky u škorpiónov**

Vďaka tomu, že cytogenetické znaky u škorpiónov vykazujú pomerne veľkú špecifickú variabilitu, tak tieto charakteristiky našli v poslednej dobe uplatnenie napríklad v delimitácii blízko príbuzných taxónov a v odhalení kryptických línií. Tato možnosť bola asi najlepšie dokumentovaná v rámci čeľadi Euscorpidae (Štundlová a kol. 2019). Mimo cytogenetické dáta sa totiž v súčasnej chvíli na detekciu fylogeneticky oddelených línií využívajú hlavne analýzy DNA. To umožňuje identifikovať kryptické druhy a taktiež uľahčuje správnu interpretáciu morfologickej variability (Parmakelis a kol. 2013).

Treba ale brať v úvahu, že delimitácia druhov založených len na analýze DNA je dosť diskutabilná, pretože môže preceňovať druhovú diverzitu, najmä u sedavých organizmov (Opatova a Arnedo 2014). Analýza karyotypu sa tak ukazuje ako užitočná metóda, ktorá na základe rozdielnosti karyotypu umožňuje taktiež identifikovať hranice medzi jednotlivými taxónami. Tento prístup umožnil napríklad zistiť vysokú mieru kryptickej diverzity v rámci rodu *Alpiscorpius* v Alpách (Štundlová a kol. 2019) a cytogenetická analýza pomohla odhaliť kryptické druhy u ďalších škorpiónoch či v rôznych rádoch pavúkovcov (Zaragoza a Šťáhlavský 2008; Ojanguren–Affilastro a kol. 2017; Řezáč a kol. 2018). Do určitej miery sa ale ako problémové môže javiť využitie cytogenetických údajov v taxonómii čeľade Buthidae. Ta má na jednu stranu často pomerne konzervatívne karyotypy, kedy celé rody vykazujú jednotné počty i veľkosť chromozómov, napr. *Androctonus* ( $2n = 24$ ), *Compsobuthus* ( $2n = 22$ ), *Leiurus* ( $2n = 22$ ) (Schneider a kol. 2022). Na druhú stranu ale majú niektoré druhy i veľmi polymorfné karyotypy (napr. *Tytius bahiensis*  $2n = 19$ ) (vid' Schneider a kol. 2022). Cytogenetické metódy tu preto môžu tvoriť v taxonomických štúdiách iba podporné charakteristiky, ktoré vymedzujú jednotlivé druhy. Existuje pár štúdií, ktoré pomocou morfológie, cytogenetiky a sekvenovania delimitovali sesterské druhy. V štúdiu od Ojanguren–Affilastro a kol. (2017) boli delimitované sesterské druhy *Tityus curupi* Ojanguren–Affilastro a kol., 2017 ( $2n = 31 - 32$ ) a *T. uruguayensis* Borelli, 1901 ( $2n = 31$ ). Naopak v štúdiu od Kovařík a kol. (2009) i na základe cytogenetických výsledkov synchronizovali druhy *T. ythieri* Lourenço, 2007 s *T. magnimanus* Pocock, 1897.

## 6. Metodika

### 6.1 Materiál

Pre analýzu veľkosti genómu sa podarilo získať celkom 220 jedincov zaradených do ôsmich čeľadí (tabuľka 1). Materiál bol zbieraný z rôznych lokalít alebo bol získaný zo záujmových chovov v rokoch 2011 až 2021 (viď tabuľka 3). Materiál bol primárne určený na analýzu karyotypu (viď kapitola 6.6), pričom po pitve tkanív určených na výrobu chromozómových preparátov bola z exemplárov odobraná časť končatiny a tá bola skladovaná v  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  na meranie veľkosti genómu. Taktiež boli u jedného druhu odobrané vzorky tkanív, konkrétne cievna sústava, nervová sústava, gonády, črevo a lymfa. Tieto tkanivá boli následne takisto zmrazené a skladované v  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Je dôležité, aby bol materiál zmrazený tesne po usmrtení, inak by mohlo dôjsť k degradácii tkaniva a k chybnému meraniu. Analýza zo zmrazeného materiálu sa považuje za plne funkčnú ako uvádza Hanrahan a Johnston (2011). Veľkosť genómu niektorých druhov bola meraná taktiež tesne po usmrtení pre porovnanie výsledkov u rôzne starého materiálu. Analýza veľkosti genómu prebehla v roku 2021 v Sudovom laboratóriu prietokovej cytometrie na katedre botaniky Benátská 2.

Tabuľka 1: Počet analyzovaných jedincov podľa čeľade.

Čeľaď	Počet jedincov
Buthidae	104
Caraboctonidae	2
Euscorpiidae	92
Hormuridae	2
Chaerilidae	8
Iuridae	2
Scorpionidae	7
Scorpiopidae	3

### 6.2 Príprava materiálu na meranie veľkosti genómu

Existujú rôzne postupy na prípravu materiálu. V tejto práci som sa som riadila postupom využívaným hlavne v botanike (napr. od Koutecký (2012), ktorý bol úspešne využitý aj u článkonožcov, a ktorý je popísaný v publikácii o prietokovej cytometrii v botanike (napr. Sadílek a kol. 2019).

Najprv je dôležité jadrá štandardu a vzorky odizolovať. Pripravíme si vzorku, ktorú chceme analyzovať, a zvolíme vhodný rastlinný štandard u ktorého poznáme veľkosť genómu. Do Petriho misky vložíme malý kus štandardu s veľkosťou asi 0,2–0,5 cm<sup>2</sup>. Musíme voliť veľkosti pletiva, tkaniva a štandardu tak, aby sme v histograme mali približne rovnaké peaky. Následne pridáme študovaný materiál, v našom prípade jednu až dve končatiny škorpióna, ktoré sú v zmrazenom stave, prípadne ak boli v živom stave, končatinu odstrihneme. Pri živom materiály sme škorpióna na chvíľku zmrazili aby znehybnel.

Teraz je potrebné pridať vhodný pufer. My sme pridávali pufer Otto I. o objeme 0,6 ml, ktorý sme pridali pomocou pipety. Štandard a materiál žiletkou nasekáme v Petriho miske na drobné kusy. Takto vzniknutá suspenzia jadier je pripravená na filtrovanie do skúmavky cez nylonové plátno. Pre jednu skúmanú vzorku sa pripravili dve analýzy pre kontrolu. Niekedy bolo nedostatok materiálu, a preto sme mohli vykonať len jedno meranie. V skúmavke by sa teraz nemali v suspenzii nachádzať žiadne kúsky materiálu alebo štandardu, pretože by mohli narušiť správnu analýzu. Posledným krokom je zafarbenie vzorky fluorescenčným farbivom, ktoré pridáme o objeme 1 ml pri farbive propídium jodid (PI).

### **6.3 Príprava farbiva**

Pri analýze sme využívali farbivá propídium jodid (PI).

#### **Propídium jodid (PI)**

Roztok som pripravovala podľa Doležela a kol. (2007), ktorý uvádza, že na roztok potrebujeme pufer Otto II. Tento pufer pridáme v objeme 25 ml do pripravenej nádoby. Do pufru pridáme PI a RNA, ktoré vyberieme z mrazničky a rozmrazíme. Tieto pridávame v objeme 1 ml RNA a PI, jednu celú eppendorfku. Nakoniec pridávame 2–mercapethanol, ktorý napipetujeme do roztoku v objeme 44 µl. Takto namiešané farbivo môžeme pridávať k suspenzii jadier v objeme 1 ml (Doležel a kol. 2007).

V pufri Otto I môžeme nechať suspenziu jadier pár hodín pri izbovej teplote a nemalo by to negatívne ovplyvniť farbenie DNA. Naopak pri pufri Otto II je nevyhnutné vzorku čo najrýchlejšie zmerať aby nedošlo k poškodeniu jadier (Doležel a kol. 2005).

#### **Otto I (Otto 1990)**

Pufer pripravujeme z 0,1 M monohydrátu kyseliny citrónovej (4,2 g) a 0,5% Tween 20 (1 ml). Rozpustíme ich v destilovanej vode a takto vzniknutý roztok prelejeme do analytickej banky, kde ho doplníme destilovanou vodou a prefiltrujeme cez filter. Pufer sa musí uskladniť v chladničke pri 4°C.

Otto I obsahuje kyselinu citrónovú, ktorá fixuje izolované jadrá a zlepši prístup farbív k chromatínu. Druhou zložkou pufru je chemikália Tween 20 (polyoxoethylensorbitanmoholaurát). Tento detergent rozruší cytoplazmu a uvoľní jadrá. Taktiež zníži zhľukovanie zbytkov cytoplazmy s jadrami a rozptýli chloroplasty (Doležel a kol. 2006).

#### **Otto II (Doležel a kol. 1995)**

Otto II sa pripravuje z destilovanej vody a 0,4 M dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu sodného (28,65 g). Rozpustíme soľ a následne prelejeme do analytickej banky. Je potreba priliať ešte destilovanú vodu a následne prefiltrovať. Pufer skladujeme pri izbovej teplote a v tme. Iontovú silu v pufri udržiavajú ionty hydrogenfosforečnanu sodného (Doležel a kol. 2005).

### **6.4 Analýza prietokovým cytometrom**

Analýzy prebiehali v softwari FloMax Version 2.4d a na prietokovom cytometri značky Partec CyFlow SL (Partec GmbH, Münster). V prvom rade prebieha kontrola nádoby na sheat fluid (destilovanú vodu). Ak je nádoba prázdna, dolejeme dostatok destilovanej vody. Taktiež kontrolujeme nádobu s odpadom, ktorú je potreba vyliť ak je naplnená. Teraz môžeme zapnúť cytometer. Najprv zapíname počítač, následne cytometer, a spustíme program FloMax. Laser zapíname tesne pred prvým meraním.

Pred začiatkom merania premyjeme cytometer Savom a destilovanou vodou. To zabezpečí vyčistenie od minulých meraní a odstráni jadrá, ktoré tam mohli nachádzať.

Pri zapnutí programu máme všetky potrebné parametre nastavené z predchádzajúceho merania.

Vzorku teraz môžeme vložiť do sampleportu a prietokový cytometer si nasaje 150  $\mu$ l a bude analyzovať asi 90  $\mu$ l. Po nasatí vzorku sa nám objavia body na histogramoch. Je potrebné pár krát tieto histogramy clearovať, kým sa analýza ustáli a zníži sa rýchlosť.

Dôležitým histogramom je histogram 532 Grn (Area) vs. count. Zobrazuje nám fluorescenciu na 1024 kanáloch a zobrazia sa nám tzv. peaky (obrázok 7). Sú to gaussovské krivky fluorescencie meraných častíc.

Ďalší histogram, ktorý je pre nás indikačný je histogram 532 Grn vs. 532 LALS (area–peak). Zobrazuje sa nám bočný rozptyl (side scatter) a analyzuje rozptyl lúča lasera (obrázok 6). Vďaka tomuto histogramu určíme tvar meraných častíc.

## Nastavenie parametrov

Pri samotnej analýze v prietokovom cytometri môžeme v histograme vidieť rôzne neusporiadané častice. Tieto nám vytvárajú šum a spôsobujú nepresnú analýzu. V nastavení parametrov môžeme orezať histogram len na časť nášho záujmu. Ako som písala vyššie, parametre sú automaticky nastavené, no záleží aký štandard použijeme. Podľa štandardu potom nastavujem gain tak, aby štandard vychádzal na 100, poprípade 200, 300 alebo 400. Ak máme stále analýzu v ktorej sa nachádza šum okolo našich hlavných peakov, môžeme to dodatočne upraviť po samotnom meraní pri vyhodnocovaní výsledkov.

Čo sa týka samotných parametrov môžeme s niektorými pohybovať a upravovať ich podľa potreby. Môžeme napríklad nastaviť rýchlosť akou sa bude suspenzia analyzovať. Záleží na tom, koľko častíc sa v suspenzii nachádza. Ak ich je príliš veľa, rýchlosť znižujeme, a opačne. Vzorku analyzujeme najčastejšie pri rýchlosti 6–10  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Je lepšie mať rýchlosť čo najnižšiu, pretože pri zvýšenej rýchlosti môže dôjsť k zníženiu kvality výsledných dát. Ďalším parametrom, ktorý sme upravovali je osa x, ktorá zobrazuje fluorescenciu. Túto osu sme podľa potreby posunuli doprava alebo doľava, pričom záležalo na veľkosti meranej vzorky, ktorá mohla byť výrazne väčšia alebo menšia ako štandard. Niekedy ale bolo výhodnejšie vzorku nasekať s iným štandardom ktorého veľkosť genómu je bližšia študovanej vzorke.

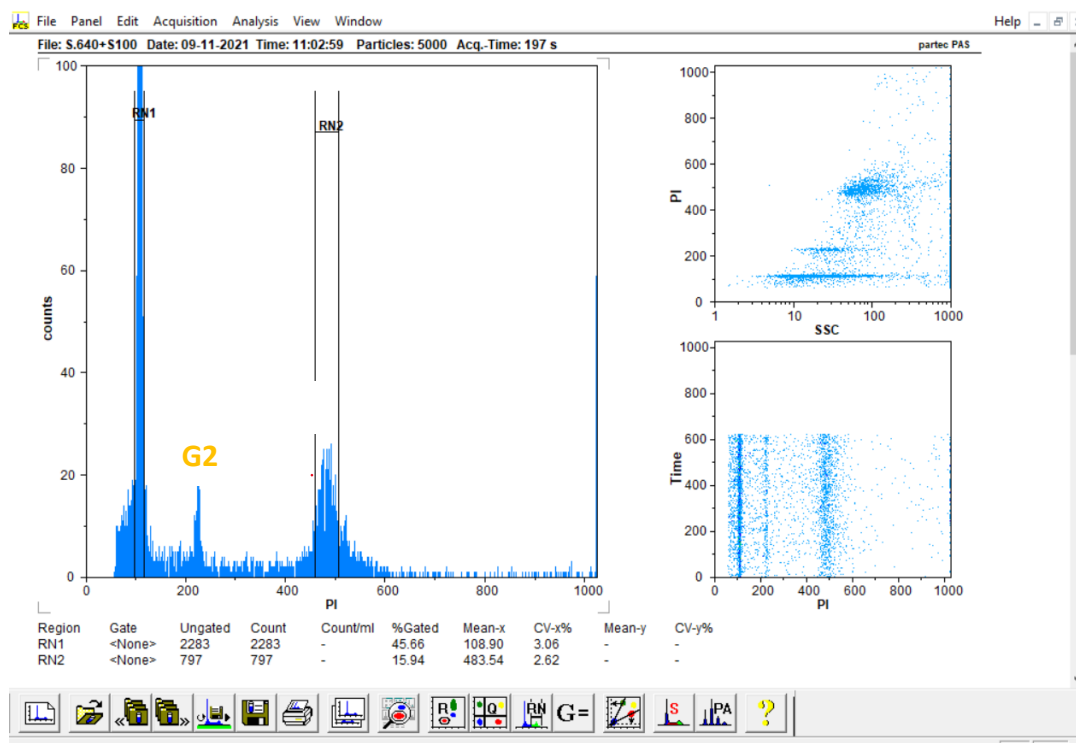
Ďalší parameter, ktorý nás zaujíma je tzv. variačný koeficient (CV). Tento koeficient nám udáva presnosť merania. Je to podiel smerodajnej odchýlky a priemernej pozície peaku. Najčastejšie je v rozmedzí od 1–10%, pre kvalitnú analýzu by sa percento CV malo pohybovať do 3%. Tento rozptyl hodnôt ovplyvňuje rôzne faktory, ako napríklad rozdielna farbiteľnosť častíc, neidentické podmienky, alebo prístrojová chyba (Suda 2005). Bohužiaľ, nie vždy je možné tento parameter ovplyvniť, hlavne pri rastlinách alebo vzorkách s rozpadnutými jadrami. Analýzu ukladáme vždy s popisom čísla vzorky a pozície a názvom štandardu, ktorý sme používali.

## Vyhodnotenie výsledkov

### PI

Výsledky sme vyhodnocovali cez software FloMax Version 2.4d a analýzy sme ukladali vo formáte histogramu. V programe sme si našli možnosti pre gate a cez gating regions sme si ohraničili naše dva peaky (peak štandardu a peak vzorky). Údaje ktoré budeme potrebovať na vyhodnotenie sme si zobrazili cez region statistics. Zaujímal nás údaj o fluorescencii vzorky a štandardu (6–mean, 4–mean), ďalej taktiež údaje o variačnom koeficiente (6–CV, 4–CV). Pri vyhodnotení sme si museli dávať pozor pri štandarde *Solanum pseudocapsicum*, a to na jeho G2, ktorý bol vždy presne dvakrát väčší ako G1 (obrázok 7).

Veľkým problémom boli vzorky staršie, kde boli jadrá bohužiaľ rozpadnuté a nebolo možné poznať veľkosť genómu. Údaje som následne zapísala do excelovej tabuľky a počítala z nich veľkosť genómu.



Obrázok 7: Ukážka výsledku z programu Partec FloMax zobrazujúci analýzu jadier DNA. RN1–peak štandardu (2n), RN2– peak vzorky, G2– dvojnásobné množstvo DNA štandardu (4n).

V programe Partec FloMax sa nám zobrazujú tri okná (obrázok 7). V ľavom okne môžeme vidieť označený peak štandardu, ktorý je označený gatom RN1. V tomto prípade bol použitý štandard *Solanum pseudocapsicum* (Ľuľok okrasný), a druh, ktorý sa analyzoval je *Alpiscorpius alpha* (Caporiaco, 1950) z čeľade Euscorpidae. Rovnako vidíme peak označený ako G2, ktorý zobrazuje dvojnásobné množstvo DNA štandardu (4n) ako som spomínala vyššie. Peak označený ako RN2 je naša neznáma vzorka, ktorej veľkosť genómu zisťujeme. Môžeme tiež vidieť údaje, s ktorými budeme pracovať. Zaujima nás údaj Mean-x, ktorý budeme dávať do pomeru a údaj CV. Ako som spomínala vyššie údaj CV by mal byť do 3% pre PI. U štandardu to jemne prevyšuje s číslom 3,06. To by ale nemal byť veľký problém pre našu analýzu a u rastlinných štandardov je niekedy náročné toto číslo udržať pod 3%. Ďalšie dva grafy vpravo nám zobrazujú fluorescenciu v čase a sidescatter. Tieto údaje nám môžu počas analýzy pomôcť pri kontrole, či analýza prebieha správne.



### Výpočet veľkosti genómu

Veľkosť genómu som počítala podľa postupu od Doležel a kol. (2007). Na výpočet som potrebovala informáciu o fluorescencii vzorky a štandardu. Fluorescenciu vzorky dávame do pomeru s fluorescenciou štandardu a tento pomer vynásobíme veľkosťou genómu štandardu, ktorý je známy.

$$VG \text{ neznámy} = VG \text{ štandard} \times (PI \text{ neznámy} / PI \text{ štandard})$$

### Štandardy, ktoré boli v práci využité:

Tabuľka 2: Prehľad použitých štandardov.

Latinský názov	Slovenský názov	2C (pg)
<i>Carex acutiformis</i>	ostrica ostrá	0.82
<i>Solanum pseudocapsicum</i>	ľuľok okrasný	2.61

## 6.5 Štatistické spracovanie výsledkov

Na záverečnú analýzu a štatistické spracovanie výsledkov dát bola využitá platforma R version 3.6.3 (2020–02–29) v prostredí RStudio (RStudio Team 2020).

Na určenie signifikantných rozdielov medzi jednotlivými rádmi sme využili Tukeyho HSD test. Tukeyho HSD test nám na základe jednotlivých písmen určí odlišnosť alebo podobnosť medzi jednotlivými rádmi.

Na potvrdenie signifikantných rozdielov medzi jednotlivými rádmi bol použitý test anova. Z výsledku anova testu nás zaujímala hodnota Pr (>F) a podľa počtu hviezdíčiek sme určili presnosť. V našom prípade výsledky mali \*\*\*, čo udáva, že medzi rádmi sa nachádzajú signifikantné rozdiely a môžeme to určiť s 99,9% presnosťou.

Závislosť medzi dvomi veličinami sme určili pomocou Pearsonovho korelačného testu. Tento nám pomocou p-value určí, či tam závislosť je alebo nie. Ak je hodnota p-value < 0,05, závislosť tam je. Ak je hodnota p-value > 0,05, závislosť tam nie je. Závislosť sme graficky zobrazili pomocou regresnej krivky.

V prípade určenia signifikantného rozdielu medzi pohlaviami bol spravený regresný model a následne potvrdenie anovou.

Grafy boli zobrazené pomocou boxplotu a dotplotu v programe RStudio vo verzii 3.6.3.

## 6.6 Analýza karyotypu

Na analýzu karyotypu boli použité chromozomálne preparáty pripravené technikou roztierania („spreading“), ktorá je popísaná v Traut (1976). Najprv boli vypitvané gonády, a tie boli následne hypotonizované v 0,075 M KCl po dobu 20 minút. Tkanivo sa ďalších 20 minút fixovalo v zmesi metanol:kyselina octová v pomere 3:1. Fixovaný materiál sme v kvapke (60% kyseliny octovej) preniesli na mikroskopické sklíčko. Kvapka bola rozrušená wolframovou ihlou a premiestnená na teplú histologickú platňu (45 °C) na odparenie. Chromozómy boli zafarbené 5% Giemsa v Sörensenovom fosfátovom pufri (pH = 6,8) ďalších 20 min. Chromozómové preparáty boli pozorované s mikroskopom Olympus AX70 Provis a fotené kamerou Olympus DP72. Počet chromozómov (2n) bol následne stanovený z fotografií pomocou softvéru ImageJ 1.45r (<http://rsbweb.nih.gov/ij>).

## 7. Výsledky

### 7.1 Prehľadná tabuľka analyzovaných jedincov

Veľkosť genómu, ako som spomínala vyššie, bola vypočítaná pre 220 jedincov z ôsmich čeľadí (tabuľka 1), zahŕňajúcich približne 90 druhov. Nasledujúca tabuľka 3 poskytuje prehľadné informácie o všetkých analyzovaných jedincoch.

Tabuľka 3: Prehľadná tabuľka s analyzovanými jedincami popisujúca jednotlivé druhy podľa čeľade, informáciu o veľkosti genómu, počte chromozómov (údaje prevzaté z literatúry označené \*, vid' Novotný 2012; Štundlová 2019, Schneider a kol. 2022), pohlaví, roku zmrazenia a pôvodu. Zoznam skratiek: NA–nedostupná informácia, M–samec, F–samica, juv.–nedospelý potomok, DR–Dominikánska republika, RSA–Juhoafrická republika.

Čeľaď	Veľkosť genómu (pg)	2n	Druh	Pohlavie	Rok zmrazenia	Pôvod
Buthidae	2,5	20	<i>Aegaeobuthus cyprius</i>	juv.	2021	Cyprus
Buthidae	2,51	20	<i>Aegaeobuthus cyprius</i>	juv.	2021	Cyprus
Buthidae	2,52	20	<i>Aegaeobuthus cyprius</i>	M	2021	Cyprus
Buthidae	2,06	20	<i>Aegaeobuthus cyprius</i>	F	2021	Cyprus
Buthidae	3,11	20	<i>Aegaeobuthus cyprius</i>	juv.	2021	Cyprus
Buthidae	2,59	20	<i>Aegaeobuthus cyprius</i>	juv.	2021	Cyprus
Buthidae	2,99	20	<i>Aegaeobuthus cyprius</i>	juv.	2021	Cyprus
Buthidae	3,07	20	<i>Aegaeobuthus cyprius</i>	F	2018	Cyprus
Buthidae	2,94	20	<i>Aegaeobuthus galianoi</i>	M	2019	Grécko
Buthidae	3,06	20	<i>Aegaeobuthus gibbosus</i>	M	2019	Grécko
Buthidae	2,88	20	<i>Aegaeobuthus gibbosus</i>	M	2019	Grécko
Buthidae	3,54	20	<i>Aegaeobuthus gibbosus</i>	M	2019	Grécko
Buthidae	2,81	24	<i>Androctonus</i> sp.	M	2019	Omán
Buthidae	2,69	24	<i>Androctonus</i> sp.	M	2019	Maroko
Buthidae	2,44	24*	<i>Androctonus aeneas</i>	M	2021	Tunisko
Buthidae	2,57	24*	<i>Androctonus aeneas</i>	M	2021	Tunisko
Buthidae	2,25	24*	<i>Androctonus aeneas</i>	M	2021	Tunisko
Buthidae	2,35	24*	<i>Androctonus aeneas</i>	F	2021	Tunisko
Buthidae	2,39	24*	<i>Androctonus aeneas</i>	F	2021	Tunisko
Buthidae	1,65	NA	<i>Androctonus aeneas</i>	F	2021	Tunisko
Buthidae	2,65	24*	<i>Androctonus amoreuxi</i>	M	2018	Maroko
Buthidae	2,66	24*	<i>Androctonus amoreuxi</i>	M	2018	Maroko
Buthidae	2,6	24*	<i>Androctonus amoreuxi</i>	M	2020	Maroko
Buthidae	2,48	24*	<i>Androctonus amoreuxi</i>	F	2021	Maroko
Buthidae	2,51	22*	<i>Androctonus crassicauda</i>	M	2020	Omán
Buthidae	2,55	24*	<i>Androctonus crassicauda</i>	M	2021	Oman
Buthidae	2,25	24*	<i>Androctonus crassicauda</i>	M	2021	Omán
Buthidae	2,34	24	<i>Androctonus crassicauda</i>	M	2021	Omán

Tabuľka 3: pokračovanie.

Čeľad'	Veľkosť genómu (pg)	2n	Druh	Pohlavie	Rok zmrazenia	Pôvod
Buthidae	2,43	24*	<i>Androctonus crassicauda</i>	M	2021	Turecko
Buthidae	2,49	24*	<i>Androctonus crassicauda</i>	M	2021	Turecko
Buthidae	2,57	24*	<i>Androctonus crassicauda</i>	M	2021	Turecko
Buthidae	2,24	24*	<i>Androctonus crassicauda</i>	M	2021	Omán
Buthidae	2,11	24	<i>Androctonus cholistanus</i>	M	2021	Pakistán
Buthidae	2,75	24*	<i>Androctonus liouvillei</i>	M	2018	Maroko
Buthidae	2,72	24*	<i>Androctonus mauritanicus</i>	M	2018	Maroko
Buthidae	2,39	24*	<i>Androctonus mauritanicus</i>	F	2021	Maroko
Buthidae	2,82	24*	<i>Androctonus tenuissimus</i>	M	2018	Egypt
Buthidae	2,15	24*	<i>Androctonus tenuissimus</i>	M	2021	Egypt
Buthidae	2,83	26	<i>Buthacus leptochelys</i>	juv.	2018	Jordán
Buthidae	2,6	22	<i>Buthus elongatus</i>	M	2019	Španielsko
Buthidae	2,62	22	<i>Buthus ibericus</i>	M	2012	Španielsko
Buthidae	2,56	22	<i>Buthus ibericus</i>	M	2013	Portugalsko
Buthidae	2,42	22	<i>Buthus ibericus</i>	M	2013	Portugalsko
Buthidae	2,47	22	<i>Buthus ibericus</i>	M	2013	Portugalsko
Buthidae	2,52	22	<i>Buthus paris</i>	F	2013	Maroko
Buthidae	2,57	22*	<i>Buthus paris</i>	M	2020	Tunisko
Buthidae	2,53	22	<i>Buthus sp.</i>	M	2018	Maroko
Buthidae	2,68	22	<i>Buthus sp.</i>	M	2019	Maroko
Buthidae	2,74	22*	<i>Buthus sp.</i>	M	2019	Maroko
Buthidae	2,66	22	<i>Buthus sp.</i>	F	2019	Maroko
Buthidae	2,64	22	<i>Buthus sp.</i>	juv.	2019	Maroko
Buthidae	2,85	22*	<i>Buthus sp.</i>	F	2019	Maroko
Buthidae	2,78	22	<i>Buthus sp.</i>	F	2019	Maroko
Buthidae	2,68	22*	<i>Buthus sp.</i>	M	2019	Maroko
Buthidae	2,84	22	<i>Buthus sp.</i>	M	2019	Maroko
Buthidae	2,75	22	<i>Buthus sp.</i>	M	2019	Maroko
Buthidae	2,84	22	<i>Buthus sp.</i>	juv.F	2019	Maroko
Buthidae	2,79	22	<i>Buthus sp.</i>	M	2019	Maroko
Buthidae	2,77	22	<i>Buthus sp.</i>	juv.F	2019	Maroko
Buthidae	2,64	19	<i>Buthus sp.</i>	F	2019	Maroko
Buthidae	2,65	19	<i>Buthus sp.</i>	M	2019	Maroko
Buthidae	2,21	22	<i>Buthus sp.</i>	F	2021	Maroko
Buthidae	2,23	24	<i>Centruroides sp.</i>	M	2019	Mexiko
Buthidae	1,79	26	<i>Centruroides flavopiceus</i>	M	2019	Mexiko
Buthidae	1,87	26	<i>Centruroides lucidus</i>	M	2014	DR
Buthidae	2,29	22	<i>Compsobuthus maindroni</i>	M	2019	Omán
Buthidae	2,14	22	<i>Compsobuthus maindroni</i>	M	2019	Omán

Tabuľka 3: pokračovanie.

Čeľad'	Veľkosť genómu (pg)	2n	Druh	Pohlavie	Rok zmrazenia	Pôvod
Buthidae	2,21	22*	<i>Comsobuthus acutecarinatus</i>	M	2021	Omán
Buthidae	1,93	16*	<i>Heteroctenus princeps</i>	M	2014	DR
Buthidae	3,09	24*	<i>Hottentota flavidulus</i>	NA	2012	Pakistán
Buthidae	3,19	22	<i>Hottentota pakistan</i>	M	2019	Pakistán
Buthidae	3,19	16*	<i>Hottentotta hottentotta</i>	F	2018	Benin
Buthidae	3,7	16*	<i>Hottentotta judaicus</i>	M	2019	Jordán
Buthidae	3,12	14	<i>Hottentotta salei</i>	M	2020	Omán
Buthidae	3,17	24	<i>Hottentotta</i> sp.	M	2021	India
Buthidae	1,92	28*	<i>Jaguajir rochae</i>	M	2021	Brazil
Buthidae	2,39	22	<i>Leiurus hebraeus</i>	M	2019	Jordán
Buthidae	2,35	22	<i>Leiurus cf. somalicus</i>	F	2021	Somaliland
Buthidae	2,25	22	<i>Leiurus cf. somalicus</i>	M	2021	Somaliland
Buthidae	3,67	16	<i>Lychas mucronatus</i>	F	2018	Thajsko
Buthidae	2,97	22*	<i>Mesobuthus eupeus</i>	M	2012	Gruzie
Buthidae	2,69	22*	<i>Mesobuthus haarlovi</i>	M	2012	Auganistán
Buthidae	1,91	22	<i>Odonthobuthus brevidigitatus</i>	M	2021	Omán
Buthidae	2,01	22	<i>Odonthobuthus brevidigitatus</i>	M	2021	Omán
Buthidae	2,02	22	<i>Parabuthus capensis</i>	M	2019	RSA
Buthidae	3,97	20*	<i>Parabuthus glabrimanus</i>	M	2018	Namíbia
Buthidae	2,06	22	<i>Parabuthus granimanus</i>	M	2021	Somaliland
Buthidae	3,16	24	<i>Parabuthus granulatus</i>	M	2018	Namíbia
Buthidae	1,97	16*	<i>Parabuthus heterurus</i>	M	2018	Somaliland
Buthidae	1,99	16*	<i>Parabuthus kabateki</i>	M	2018	Somaliland
Buthidae	1,85	16	<i>Parabuthus leiosoma</i>	M	2021	Somaliland
Buthidae	2,27	20*	<i>Parabuthus raudus</i>	M	2018	Namíbia
Buthidae	2,38	20	<i>Parabuthus schlechteri</i>	M	2018	RSA
Buthidae	2,85	20	<i>Rhopalurus</i> sp.	M	2020	DR
Buthidae	1,2	20*	<i>Tityus mana</i>	M	2021	Tunsiko
Buthidae	1,32	20*	<i>Tityus mana</i>	M	2021	Tunsiko
Buthidae	1,31	20*	<i>Tityus mana</i>	F	2021	Tunsiko
Buthidae	1,56	32*	<i>Tityus neibae</i>	M	2014	DR
Buthidae	1,82	14	<i>Tityus obscurus</i>	M	2018	French Guyana
Buthidae	1,57	22	<i>Tityus silvestris</i>	M	2021	Tunsiko
Buthidae	3,31	19	<i>Tityus</i> sp.	M	2021	Ekvádor
Buthidae	1,49	NA	<i>Tityus</i> sp.	F	2021	Ekvádor
Buthidae	2,62	26	<i>Trypanothacus buettikeri</i>	M	2018	Omán
Caraboctonidae	8,42	26	<i>Hadruroides juanchaparroi</i>	M	2018	Peru

Tabuľka 3: pokračovanie.

Čeľad'	Veľkosť genómu (pg)	2n	Druh	Pohlavie	Rok zmrazenia	Pôvod
Caraboctonidae	5,41	28	<i>Hadruroides</i> sp.	M	2021	Ekvádor
Euscorpiidae	11,58	90*	<i>Alpiscorpius alpha</i>	F	2013	Taliansko
Euscorpiidae	11,59	90*	<i>Alpiscorpius alpha</i>	F	2013	Taliansko
Euscorpiidae	11,69	90*	<i>Alpiscorpius alpha</i>	F	2013	Taliansko
Euscorpiidae	12,56	NA	<i>Alpiscorpius beta</i>	M	2014	Taliansko
Euscorpiidae	11,88	NA	<i>Alpiscorpius beta</i>	M	2014	Taliansko
Euscorpiidae	12,51	NA	<i>Alpiscorpius beta</i>	M	2014	Taliansko
Euscorpiidae	11,4	NA	<i>Alpiscorpius beta</i>	M	2014	Taliansko
Euscorpiidae	11,46	NA	<i>Alpiscorpius beta</i>	M	2014	Taliansko
Euscorpiidae	11,95	NA	<i>Alpiscorpius beta</i>	M	2014	Taliansko
Euscorpiidae	12,21	NA	<i>Alpiscorpius beta</i>	F	2014	Taliansko
Euscorpiidae	12,16	NA	<i>Alpiscorpius beta</i>	F	2014	Taliansko
Euscorpiidae	11,99	NA	<i>Alpiscorpius beta</i>	F	2014	Taliansko
Euscorpiidae	11,07	NA	<i>Alpiscorpius beta</i>	F	2014	Taliansko
Euscorpiidae	11,69	NA	<i>Alpiscorpius beta</i>	F	2014	Taliansko
Euscorpiidae	11,72	NA	<i>Alpiscorpius beta</i>	F	2014	Taliansko
Euscorpiidae	11,47	NA	<i>Alpiscorpius beta</i>	F	2014	Taliansko
Euscorpiidae	11,7	NA	<i>Alpiscorpius beta</i>	F	2014	Taliansko
Euscorpiidae	11,62	NA	<i>Alpiscorpius beta</i>	F	2014	Taliansko
Euscorpiidae	11,9	NA	<i>Alpiscorpius beta</i>	F	2014	Taliansko
Euscorpiidae	12,19	60*	<i>Alpiscorpius beta</i>	F	2014	Švajčiarsko
Euscorpiidae	11,23	60*	<i>Alpiscorpius beta</i>	F	2014	Taliansko
Euscorpiidae	12,01	60*	<i>Alpiscorpius beta</i>	F	2014	Taliansko
Euscorpiidae	12,45	60*	<i>Alpiscorpius beta</i>	F	2014	Taliansko
Euscorpiidae	13,28	60*	<i>Alpiscorpius beta</i>	F	2014	Taliansko
Euscorpiidae	7,84	60*	<i>Alpiscorpius beta</i>	F	2011	Švajčiarsko
Euscorpiidae	11,36	60*	<i>Alpiscorpius beta</i>	F	2011	Švajčiarsko
Euscorpiidae	12,39	60*	<i>Alpiscorpius beta</i>	F	2011	Švajčiarsko
Euscorpiidae	11,7	60*	<i>Alpiscorpius beta</i>	F	2011	Švajčiarsko
Euscorpiidae	11,48	80*	<i>Alpiscorpius delta</i>	M	2014	Taliansko
Euscorpiidae	11,35	80*	<i>Alpiscorpius delta</i>	M	2014	Taliansko
Euscorpiidae	8,3	80*	<i>Alpiscorpius delta</i>	M	2014	Taliansko
Euscorpiidae	8,36	80*	<i>Alpiscorpius delta</i>	M	2014	Taliansko
Euscorpiidae	10,88	80*	<i>Alpiscorpius delta</i>	M	2014	Taliansko
Euscorpiidae	11,62	80*	<i>Alpiscorpius delta</i>	M	2014	Taliansko
Euscorpiidae	11,65	56*	<i>Alpiscorpius delta</i>	F	2013	Taliansko
Euscorpiidae	11,38	56*	<i>Alpiscorpius delta</i>	F	2013	Taliansko
Euscorpiidae	12,37	46*	<i>Alpiscorpius germanus</i>	M	2020	Rakúsko
Euscorpiidae	12,23	46*	<i>Alpiscorpius germanus</i>	F	2014	Taliansko

Tabuľka 3: pokračovanie.

Čeľad'	Veľkosť genómu (pg)	2n	Druh	Pohlavie	Rok zmrazenia	Pôvod
Euscorpiidae	11,74	42*	<i>Euscorpius calabriae</i>	M	2018	Taliansko
Euscorpiidae	13,18	90*	<i>Euscorpius deltshevi</i>	M	2020	Bulharsko
Euscorpiidae	13,08	90*	<i>Euscorpius deltshevi</i>	M	2020	Bulharsko
Euscorpiidae	9,28	122	<i>Euscorpius flavicaudis</i>	M	2012	Taliansko
Euscorpiidae	8,19	122	<i>Euscorpius flavicaudis</i>	M	2012	Taliansko
Euscorpiidae	7,6	126	<i>Euscorpius flavicaudis</i>	F	2011	Španielsko
Euscorpiidae	12,19	68*	<i>Euscorpius hadzii</i>	F	2011	Srbsko
Euscorpiidae	11,34	36*	<i>Euscorpius italicus</i>	F	2021	Maroko
Euscorpiidae	16,09	36*	<i>Euscorpius italicus</i>	F	2021	Chorvátsko
Euscorpiidae	12,24	36*	<i>Euscorpius italicus</i>	M	2014	Taliansko
Euscorpiidae	14,92	36*	<i>Euscorpius italicus</i>	F	2008	Grécko
Euscorpiidae	14,35	36*	<i>Euscorpius italicus</i>	F	2011	Grécko
Euscorpiidae	14,11	36*	<i>Euscorpius italicus</i>	F	2011	Turecko
Euscorpiidae	16,29	36*	<i>Euscorpius italicus</i>	F	2011	Turecko
Euscorpiidae	14,63	60*	<i>Euscorpius naupliensis</i>	F	2011	Grécko
Euscorpiidae	16,83	60*	<i>Euscorpius naupliensis</i>	F	2011	Grécko
Euscorpiidae	19,72	62*	<i>Euscorpius sicanus</i>	M	2014	Taliansko
Euscorpiidae	20,37	62*	<i>Euscorpius sicanus</i>	M	2014	Taliansko
Euscorpiidae	18,09	62*	<i>Euscorpius sicanus</i>	F	2014	Malta
Euscorpiidae	12,19	68	<i>Euscorpius solegladi</i>	M	2020	Bulharsko
Euscorpiidae	13,94	68	<i>Euscorpius solegladi</i>	M	2020	Bulharsko
Euscorpiidae	14,55	68	<i>Euscorpius solegladi</i>	M	2020	Bulharsko
Euscorpiidae	10,59	NA	<i>Euscorpius</i> sp.	F	2011	Taliansko
Euscorpiidae	14,22	NA	<i>Euscorpius</i> sp.	F	2011	Albánsko
Euscorpiidae	11,71	100	<i>Euscorpius</i> sp.	F	2011	Grécko
Euscorpiidae	14,41	NA	<i>Euscorpius</i> sp.	F	2011	Grécko
Euscorpiidae	13,84	NA	<i>Euscorpius</i> sp.	F	2011	Grécko
Euscorpiidae	13,89	NA	<i>Euscorpius</i> sp.	F	2011	Grécko
Euscorpiidae	14,26	NA	<i>Euscorpius</i> sp.	F	2011	Grécko
Euscorpiidae	12,91	NA	<i>Euscorpius</i> sp.	F	2011	Grécko
Euscorpiidae	13,07	NA	<i>Euscorpius</i> sp.	F	2011	Grécko
Euscorpiidae	13,04	NA	<i>Euscorpius</i> sp.	F	2011	Grécko
Euscorpiidae	14,02	NA	<i>Euscorpius</i> sp.	F	2011	Grécko
Euscorpiidae	13,81	NA	<i>Euscorpius</i> sp.	F	2011	Grécko
Euscorpiidae	14,97	NA	<i>Euscorpius</i> sp.	F	2011	Grécko
Euscorpiidae	14	NA	<i>Euscorpius</i> sp.	F	2011	Grécko
Euscorpiidae	14,04	NA	<i>Euscorpius</i> sp.	F	2011	Grécko
Euscorpiidae	16,72	NA	<i>Euscorpius</i> sp.	F	2011	Grécko
Euscorpiidae	16,05	70	<i>Euscorpius</i> sp.	M	2019	Grécko

Tabuľka 3: pokračovanie.

Čeľad'	Veľkosť genómu (pg)	2n	Druh	Pohlavie	Rok zmrazenia	Pôvod
Euscorpiidae	20,27	92	<i>Euscorpius</i> sp.	M	2020	Bulharsko
Euscorpiidae	13,07	88	<i>Euscorpius</i> sp.	M	2021	Chorvátsko
Euscorpiidae	17,73	118	<i>Euscorpius</i> sp.	M	2021	Taliansko
Euscorpiidae	12,59	66	<i>Euscorpius</i> sp.	M	2021	Chorvátsko
Euscorpiidae	12,85	66	<i>Euscorpius</i> sp.	F	2021	Chorvátsko
Euscorpiidae	15,31	92	<i>Euscorpius</i> sp.	M	2013	Chorvátsko
Euscorpiidae	12,1	88	<i>Euscorpius</i> sp.	M	2014	Chorvátsko
Euscorpiidae	14,77	NA	<i>Euscorpius</i> sp.	M	2014	Taliansko
Euscorpiidae	16,62	116	<i>Euscorpius</i> sp.	F	2014	Taliansko
Euscorpiidae	13,03	52	<i>Euscorpius</i> sp.	juv.F	2014	Chorvátsko
Euscorpiidae	13,58	52	<i>Euscorpius tergestinus</i>	M	2014	Chorvátsko
Euscorpiidae	16,88	92*	<i>Euscorpius thracicus</i>	M	2020	Bulharsko
Euscorpiidae	18,89	92*	<i>Euscorpius thracicus</i>	M	2020	Bulharsko
Euscorpiidae	8,08	138	<i>Megacormus gertschi</i>	M	2019	Mexiko
Euscorpiidae	7,66	138	<i>Megacormus gertschi</i>	M	2019	Mexiko
Hormuridae	12,24	86	<i>Hadogenes</i> sp.	M	2018	RSA
Hormuridae	13,17	28	<i>Opithacanthus</i> sp.	M	2018	Madagaskar
Chaerilidae	10,3	186*	<i>Chaerilus stockmannorum</i>	M	2018	Thajsko
Chaerilidae	9,28	104*	<i>Chaerilus cimrmani</i>	M	2018	Thajsko
Chaerilidae	11,52	104*	<i>Chaerilus cimrmani</i>	F	2018	Thajsko
Chaerilidae	10,13	104*	<i>Chaerilus cimrmani</i>	M	2018	Thajsko
Chaerilidae	11,34	104*	<i>Chaerilus cimrmani</i>	F	2018	Thajsko
Chaerilidae	10,97	NA	<i>Chaerilus</i> sp.	M	2019	Thajsko
Chaerilidae	8,03	136*	<i>Chaerilus tichyi</i>	M	2018	Malajzia
Chaerilidae	8,07	136*	<i>Chaerilus tichyi</i>	NA	2021	Malajzia
Iuridae	8,59	30	<i>Iurus dekanum</i>	M	2019	Grécko
Iuridae	5,55	34	<i>Iurus dufourei</i>	M	2013	Grécko
Scorpionidae	12,25	138	<i>Heterometrus missorensis</i>	M	2020	India
Scorpionidae	12,13	106	<i>Heterometrus swammerdami</i>	M	2013	India
Scorpionidae	10,65	116	<i>Pandinurus exitilis</i>	M	2021	Etiopie
Scorpionidae	10,77	120*	<i>Pandinurus hangarale</i>	M	2018	Somaliland
Scorpionidae	10,22	110*	<i>Pandinurus intermedius</i>	M	2021	Etiopie
Scorpionidae	17,2	109*	<i>Pandinus cavimanus</i>	M	2014	Tanzánia
Scorpionidae	12,13	108– 109*	<i>Pandinus imperator</i>	M	2014	Ghana
Scorpiopidae	11,47	104*	<i>Scorpiopss anthracinus</i>	M	2018	Thajsko
Scorpiopidae	12,61	97*	<i>Scorpiops problematicus</i>	M	2018	Thajsko
Scorpiopidae	15,9	94*	<i>Scorpiops thaomischorum</i>	M	2019	Čína



Tabuľku 3 som sa zámerne rozhodla napriek dĺžke zaradiť do výsledkov, pretože zobrazuje všetky merania a prehľadné informácie, na ktoré sa často v texte odkazujem.

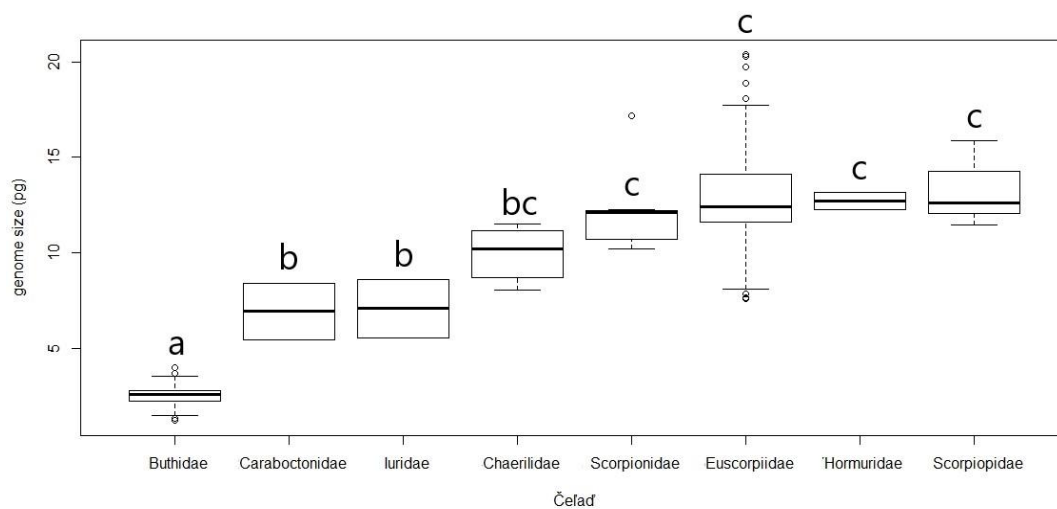
Možný vplyv dĺžky zmrazenia na merané hodnoty veľkosti genómu sme porovnávali u troch jedincov druhu *Aegeobuthus cyprius* (Gantenbein a Kropf, 2000), ktoré sme zmerali najprv v deň zmrazenia a následne za týždeň, mesiac a polrok (tabuľka 4). Analýzy vykazovali podobnú veľkosť genómu, čo nám potvrdilo, že takáto doba zmrazenia nemá na analýzu vplyv. Do výslednej tabuľky 3 tak bola použitá spriemerovaná hodnota zo všetkých štyroch meraní u týchto druhov.

Tabuľka 4: Veľkosti genómu (v pg) štyroch meraní troch jedincov druhu *Aegeobuthus cyprius*.

<b>Druh</b>	<b>1. meranie (deň)</b>	<b>2. meranie (týždeň)</b>	<b>3. meranie (mesiac)</b>	<b>4. meranie (polrok)</b>	<b>Priemer</b>
<i>Aegeobuthus cyprius</i>	3,23	2,95	3,09	3,18	3,11
<i>Aegeobuthus cyprius</i>	2,39	2,58	2,68	2,7	2,59
<i>Aegeobuthus cyprius</i>	3,09	2,89	3,19	2,8	2,99

## 7.2 Veľkosť genómu jednotlivých čeládí

Veľkosť genómu jednotlivých čeládí bola pomerne odlišná (obrázok 8). Priemerne najmenšie veľkosti genómu má čelad' Buthidae, naopak najväčšie veľkosti genómu má čelad' Scorpionidae. Konkrétne najmenšiu zistenú veľkosť genómu mal druh *Tityus mana* Lourenço, 2012;  $2C = 1,2$  pg z čelade Buthidae. Najväčšiu veľkosť genómu mal druh *Euscorpis sicanus* (C. L. Koch, 1837)  $2C = 20,37$  pg z čelade Euscorpidae. Najvariabilnejšou skupinou bola taktiež čelad' Euscorpidae, kde sa hodnoty pohybovali od  $2C = 7,6$  pg u *Euscorpis flavicaudis* (DeGeer, 1778), po  $2C = 20,37$  pg u *Euscorpis sicanus*. Čelad' Buthidae dosahovala najnižšie hodnoty od  $2C = 1,2$  pg u *Tityus mana*, po  $2C = 3,97$  pg u *Mesobuthus eupeus* (C. L. Koch, 1839). Čelad' Caraboctoninae obsahuje len 2 druhy s veľkosťami od  $2C = 5,41$  pg u *Hadruides* sp., po  $2C = 8,42$  pg u *Hadruides juanchaparroi* Ochoa a Prendini, 2010. Čelad' Iuridae taktiež obsahovala dva analyzované druhy s hodnotami od  $2C = 5,55$  pg u *Iurus dufourei* (Brullé, 1832), po  $2C = 8,59$  pg u *Iurus dekanum* (Roewer, 1943). Veľkosti genómu čelade Chaerilidae sa pohybovali od  $2C = 8,03$  pg u *Chaerilus tichyi* Kovařík, 2000, po  $2C = 11,52$  pg u *Chaerilus* sp. Čelad' Scorpionidae obsahovala 7 jedincov s veľkosťou genómu od  $2C = 10,22$  pg u *Pandinurus intermedius* (Borelli, 1919), po  $2C = 17,2$  pg u *Pandinus cavimanus* (Pocock, 1888). Dva druhy sa podarilo zanalyzovať z čelade Hormuridae, a to druh *Hadogenes* sp. s veľkosťou genómu  $2C = 12,24$  pg, a druh *Opithacanthus* sp. s veľkosťou genómu  $2C = 13,17$  pg. Poslednou meranou čeladou je čelad' Scorpionidae, ktorá má v priemere najväčšie veľkosti genómov. Hodnoty sa pohybovali od  $2C = 11,47$  pg u *Scorpiops anthracinus* (Simon, 1887), po  $2C = 15,9$  pg u *Scorpiops thaomischorum* (Kovařík, 2012).



Obrázok 8: Porovnanie relatívnej veľkosti genómu ôsmich čeládí štúrov pomocou boxplotov v programe RStudio vo verzii 3.6.3. Písmená zobrazujú skupiny rozdelené na základe Tukeyho HSD testu.

Podobnosť jednotlivých skupín sme určili pomocou Tukeyho HSD testu (tabuľka 5). Skupiny (b), Caraboctonidae a luridae, nemajú medzi sebou signifikantný rozdiel. Signifikantný rozdiel medzi sebou taktiež nemajú skupiny (c), Scorpionidae, Euscorpiidae a Hormuridae a Scorpiopidae. Čelad' Chaerilidae stojí medzi týmito dvoma skupinami (bc). Samostatnou skupinou, ktorá sa signifikantne líši od ostatných, je skupina (a) – Buthidae. Signifikantný rozdiel medzi skupinami nám potvrdila anova, ktorej výsledok vidíme v tabuľke 6. Keďže hodnota **Pr (>F)** < 0,05, čo znamená, že medzi skupinami je signifikantný rozdiel.

Tabuľka 5: Výsledok Tukeyho HSD testu pre veľkosť genómu v rámci čeladí v programe RStudio vo verzii 3.6.3.

Čelad'	Groups
Buthidae	a
Caraboctonidae	b
luridae	b
Chaerilidae	bc
Scorpionidae	c
Euscorpiidae	c
Hormuridae	c
Scorpiopidae	c

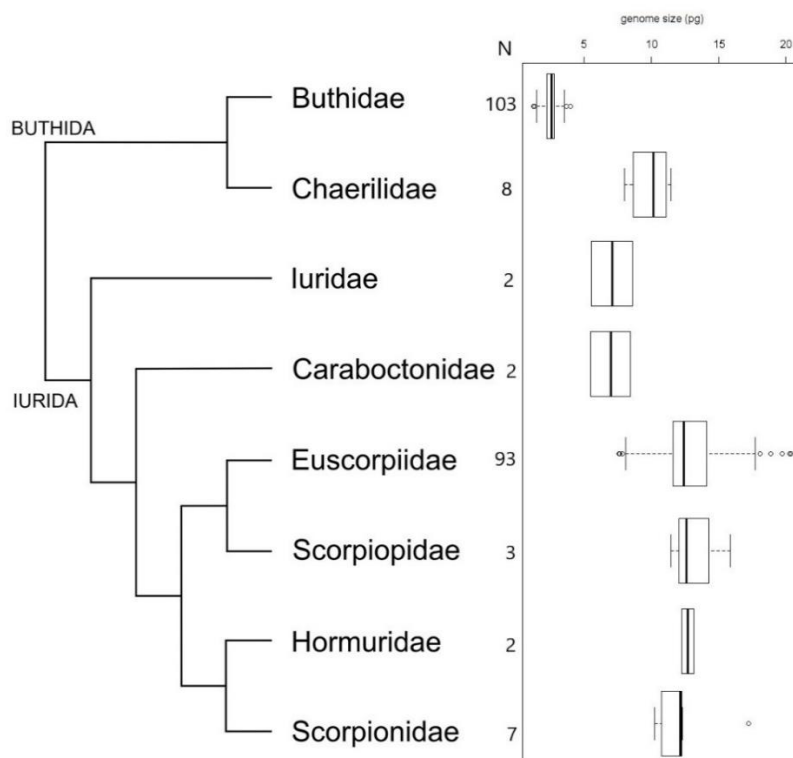
Tabuľka 6: Výsledok štatistickej analýzy anova pre veľkosť genómu v rámci čeladí v programe RStudio vo verzii 3.6.3.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Čelad'	7	5687	812.5	241.9	<2e-16 ***
Residuals	212	712	3.4		

### 7.3 Evolúcia veľkosti genómu

Vďaka znalosti evolučných vzťahov študovaných čeľadí môžeme odhadnúť hlavné trendy zmeny veľkosti genómu v rámci ôsmich čeľadí analyzovaných v tejto práci (obrázok 9). Môžeme vidieť, že v oboch hlavných skupinách štúrov, Buthida a Iurida, sú čeľade s výraznými rozdielmi veľkosti genómu. Trieda Buthida obsahuje čeľade Buthidae a Chaerilidae. Čeľaď Buthidae má veľmi malé genómy (priemerná veľkosť genómu  $2C = 2,5$  pg), zatiaľ čo čeľaď Chaerilidae má takmer štyrikrát väčšie genómy (priemerne  $2C = 9,95$  pg). Ako fylogeneticky príbuzné skupiny ide o pomerne veľký rozdiel, no z čeľade Chaerilidae bola analyzovaná omnoho menšia vzorka (tabuľka 3). Skupina Iurida obsahuje čeľade Iuridae, Caraboctonidae, Euscorpidae, Scorpionidae, Hormuridae a Scorpionidae. Obe bazálne čeľade Iuridae a Caraboctonidae majú veľmi podobnú priemernú veľkosť genómu (Caraboctonidae  $2C = 6,92$  pg, Iuridae  $2C = 7,07$  pg).

Ostatné čeľade majú opäť výrazne väčšie genómy, pričom sesterské čeľade Euscorpidae a Scorpionidae, majú taktiež veľmi podobnú priemernú hodnotu (Euscorpidae  $2C = 12,97$  pg, Scorpionidae  $2C = 13,32$  pg). Poslednými dvoma príbuznými skupinami sú Hormuridae a Scorpionidae s podobnými priemernými hodnotami  $2C = 12$  pg u čeľade Scorpionidae a  $2C = 12,71$  pg.



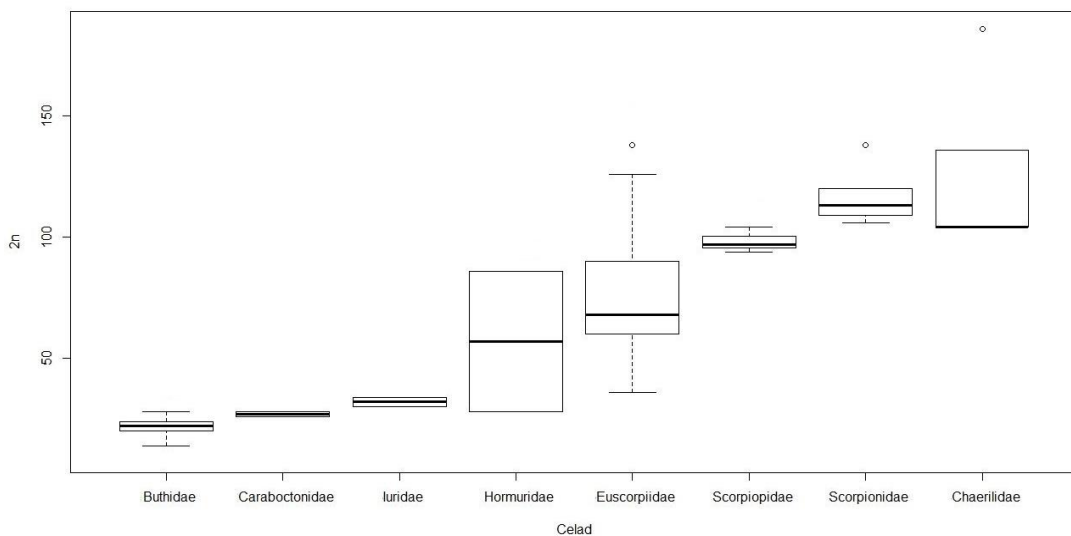
Obrázok 9: Fylogenetický strom (upravené podľa Sharma a kol. 2015) s veľkosťami genómu jednotlivých čeľadí (N – počet analyzovaných vzoriek).

## 7.4 Počet chromozómov jednotlivých čeľadí

Počty chromozómov boli určené na základe chromozomálnych preparátov (prílohy 1–4) a niektoré počty boli prevzaté z literatúry (viď tabuľka 3, Novotný 2012; Štundlová 2019; Schneider a kol. 2022). Dostupné údaje o analyzovaných vzorkách boli zobrazené pre jednotlivé čeľade pomocou boxplotu (obrázok 10), čo dobre dokumentuje ich rozdiely. Čeľaď Buthidae má počty chromozómov u našich analyzovaných jedincov od  $2n = 14$  u *Tityus obscurus* (Gervais, 1843) (príloha 1–m) a *Hottentotta salei* (Vachon, 1980) (príloha 1–b), po  $2n = 32$  u *Tityus neibae* Armas, 1999. Celkovo je v štatistike zahrnutých 99 jedincov z čeľade Buthidae so známym počtom chromozómov.

Čeľaď Craboctonidae má hodnoty chromozómov od  $2n = 26$  u *Hadruioides juanchaparroi* (príloha 4–a), po  $2n = 28$  u *Hadruioides* sp. (príloha 4–b). Čeľaď Iuridae, rovnako ako čeľaď Caraboctonidae obsahovala dva jedince.

Čeľaď Iuridae má hodnoty od  $2n = 30$  u *Iurus dekanum* po  $2n = 34$  u *Iurus dufourei*. Čeľaď Hurmuridae má počty chromozómov u analyzovaných druhov  $2n = 28$  u *Opithacanthus* sp. a  $2n = 86$  u *Hadogenes* sp. Escorpiidae má počty od  $2n = 36$  u druhu *Euscorpis italicus* (Herbst, 1800), po  $2n = 138$  u *Megacormus gertschi* Díaz Nájera, 1966 (príloha 3–l). Hodnoty čeľade Scorpiopidae sa pohybujú od  $2n = 94$  u *Scorpiops thaomischorum*, po  $2n = 104$  u *Scorpiops anthracinus*. Počty chromozómov u čeľade Scorpionidae sú od  $2n = 108–109$  u *Pandinus imperator* (Koch, 1841), po  $2n = 138$  u *Heterometrus*. Poslednou čeľaďou s priemerne najväčším počtom chromozómov je čeľaď Chaerilidae s počtami od  $2n = 104$  po  $2n = 186$  u druhu *Chaerilus* sp., kde bohužiaľ nebolo možné určiť rod.

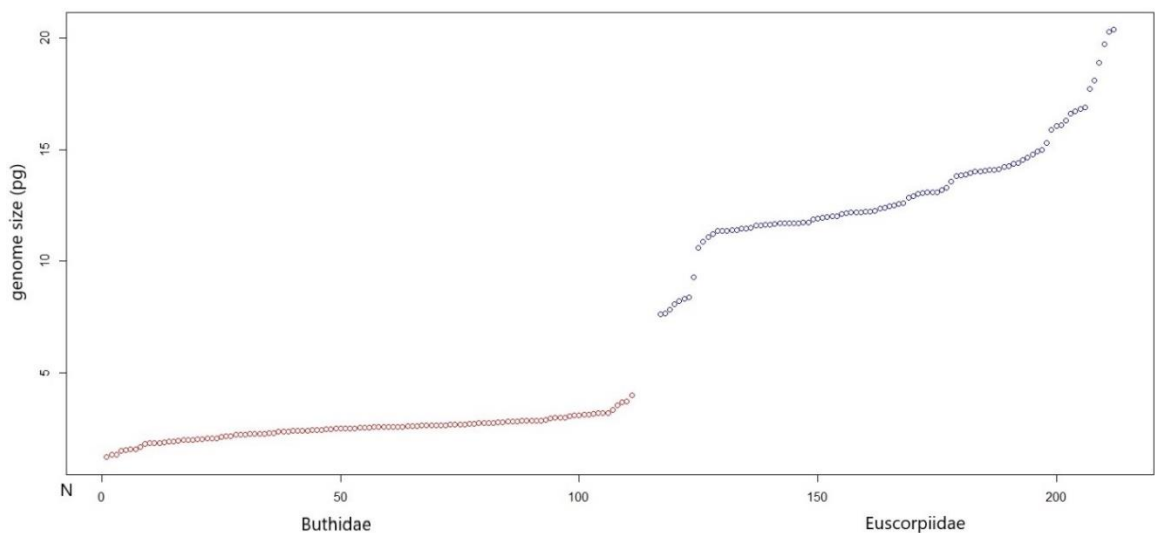


Obrázok 10: Grafické zobrazenie počtu chromozómov u ôsmich čeľadí štúrov pomocou boxplotov v programe RStudio vo verzii 3.6.3.

## 7.5 Porovnanie veľkosti genómu čeládí Euscorpiidae a Buthidae

Vďaka veľkému počtu analyzovaných jedincov sa podarilo získať najpresnejšie výsledky v rámci čeládí Buthidae a Euscorpiidae (tabuľka 3), čo umožňuje ich presnejšie porovnanie. Pomocou dotplotu sme zobrazili rozdiel vo veľkosti genómu (obrázok 11). Pomocou tohto grafu je jasne vidieť každého jedinca, ktorý reprezentuje jednu bodku. Čeľaď Buthidae je zobrazená červenou farbou a čeľaď Euscorpiidae je označená farbou modrou. Čeľaď Buthidae má výrazne menšie genómy, ktoré sa pohybujú približne do hodnoty 5 pg.

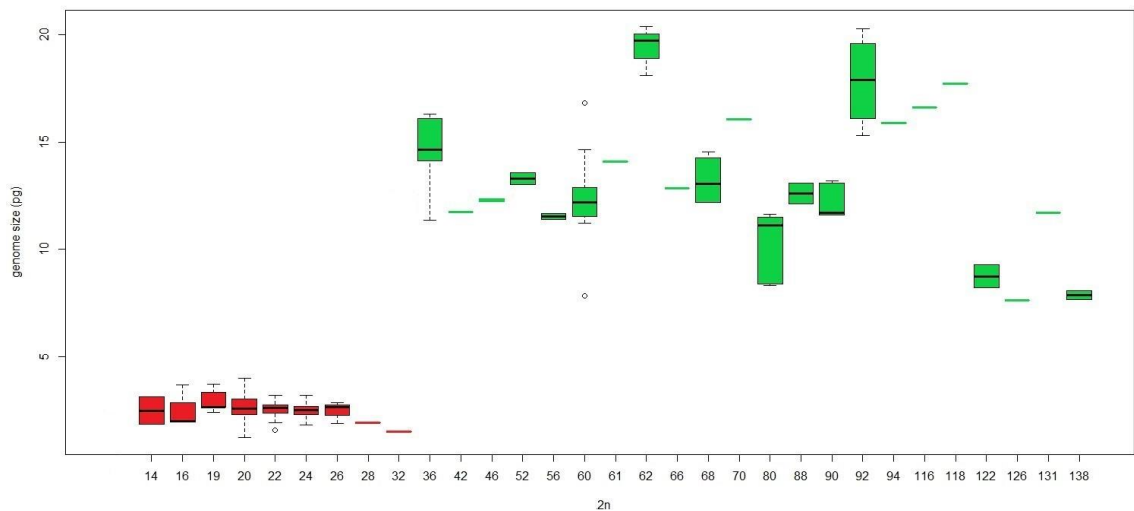
Veľkosti genómu čeľade Euscorpiidae sú nad hodnotou 5 pg a siahajú až do hodnoty okolo 20 pg, takže oproti čeľadi Buthidae majú väčšiu veľkosť genómu a väčší rozptyl veľkostí (obrázok 11).



Obrázok 11: Veľkosť genómu čeľade Buthidae a Escorpiidae zobrazené pomocou dotplotu v programe RStudio vo verzii 3.6.3.

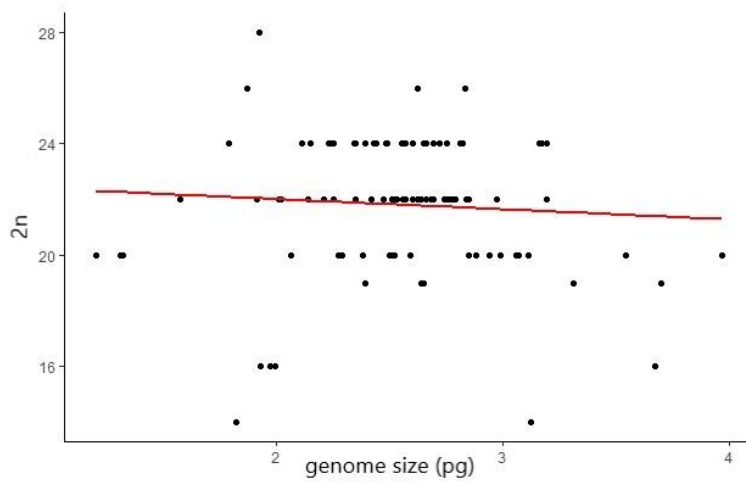
## 7.6 Závislosť veľkosti genómu a počtu chromozómov u čeľadí Buthidae a Euscorpiidae

Keďže sme sledovali dve premenné (počet chromozómov a veľkosť genómu), zobrazili sme aj možnú závislosť medzi týmito dvoma premennými pomocou boxplotu (obrázok 12). Zobrazili sme opäť najpočetnejšie čeľade. Na ose y máme veľkosť genómu v pg, a na ose x máme počet chromozómov. Z grafu vidíme, že čeľaď Buthidae (zobrazená červenou farbou), sa nachádza vľavo dole, čo znamená, že má malú veľkosť genómu a zároveň nižší počet chromozómov. Naopak čeľaď Euscorpiidae sa nachádza vpravo hore, čo znamená, že má vyššie počty chromozómov a väčšiu veľkosť genómu.

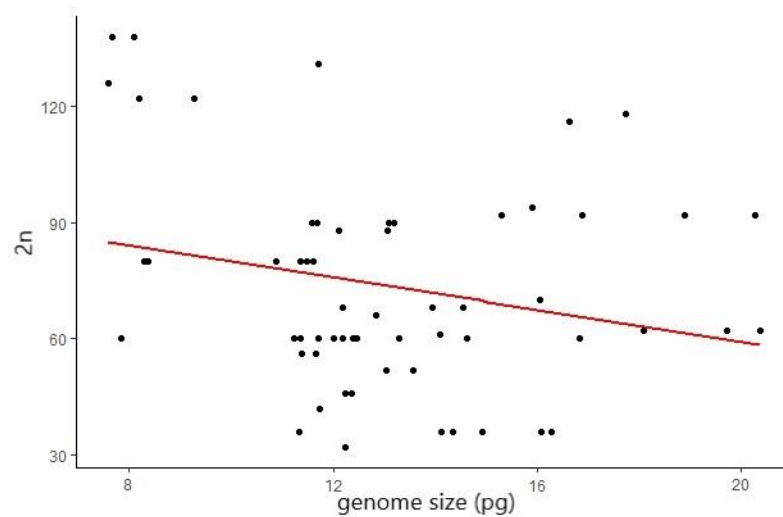


Obrázok 12: Závislosť dvoch premenných (veľkosť genómu a počet chromozómov) u čeľade Buthidae a Euscorpiidae zobrazená pomocou boxplotu v programe RStudio vo verzii 3.6.3.

Aby sme overili závislosť medzi veľkosťou genómu a počtom chromozómov, použili sme Pearsonov korelačný test v programe RStudio vo verzii 3.6.3. Závislosť sme overili samostatne pre čeľad' Buthidae a Euscorpiidae (tabuľka 7). P-value pre čeľad' Buthidae je 0,49, čo je väčšie ako 0,05, a preto závislosť medzi veľkosťou genómu a počtom chromozómov u čeľade Buthidae nie je. To isté platí pre čeľad' Euscorpiidae, kde je hodnota p-value = 0,07. Závislosť je taktiež graficky zobrazená pre čeľad' Buthidae (obrázok 13) a čeľad' Euscorpiidae (obrázok 14). Sklon krivky potvrdzuje nezávislosť týchto dvoch premenných.



Obrázok 13: Závislosť veľkosti genómu a počtu chromozómov pre čeľaď Buthidae zobrazená pomocou regresnej krivky v programe RStudio vo verzii 3.6.3.



Obrázok 14: Závislosť veľkosti genómu a počtu chromozómov pre čeľaď Euscorpiidae zobrazená pomocou regresnej krivky v programe RStudio vo verzii 3.6.3.

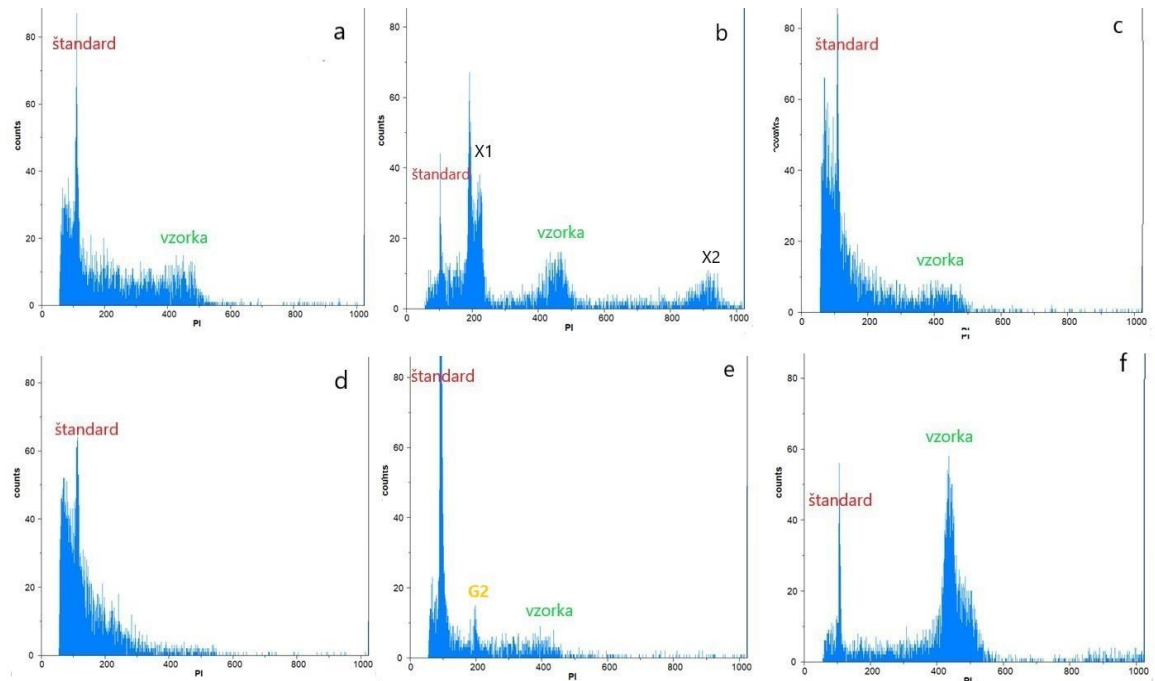
Tabuľka 7: Výsledok Pearsonovho korelačného testu na určenie závislosti medzi veľkosťou genómu a počtom chromozómov pre čeľaď Buthidae a Euscorpiidae v programe RStudio vo verzii 3.6.3.

Čeľaď	t	df	p-value	cor
Buthidae	-0.69141	95	0.491	-0.07075919
Euscorpiidae	-1.8737	59	0.06593	-0.2369842



## 7.7 Analýza genómu jednotlivých tkanív druhu *Pandinurus exitialis*

U samca druhu *Pandinurus exitialis* (Pocock, 1888) sme analýzou svaloviny končatiny identifikovali veľkosť genómu  $2C = 10,65$  pg. Z tohto druhu sa nám viac menej vďaka jeho veľkosti, podarilo odobrať rôzne typy tkanív, čo umožnilo porovnať ich vhodnosť pre meranie veľkosti genómu pomocou prietokovej cytometrie (obrázok 15). Analyzovala sa cievna sústava (a), gonády (b), nervová sústava (c), črevo (d), hemolymfa (e) a svalovina kráčavej končatiny (f). Výsledná veľkosť genómu bola vypočítaná zo svalového tkaniva, ktorá poskytovala najkvalitnejšie výsledky (obrázok 15–f). Vďaka analýze svalového tkaniva, sme mohli jasne určiť, kde môžeme očakávať peak ostatných vzoriek (obrázok 15–f).



Obrázok 15: Histogram z programu FloMax, zobrazujúca analýzu jednotlivých tkanív. a) cievna sústava b) gonády c) nervová sústava d) črevo e) hemolymfa f) svalovina kráčavej končatiny. Použité skratky: X1–pravdepodobne haploidné bunky, X2–pravdepodobne polyploidné jadrá.

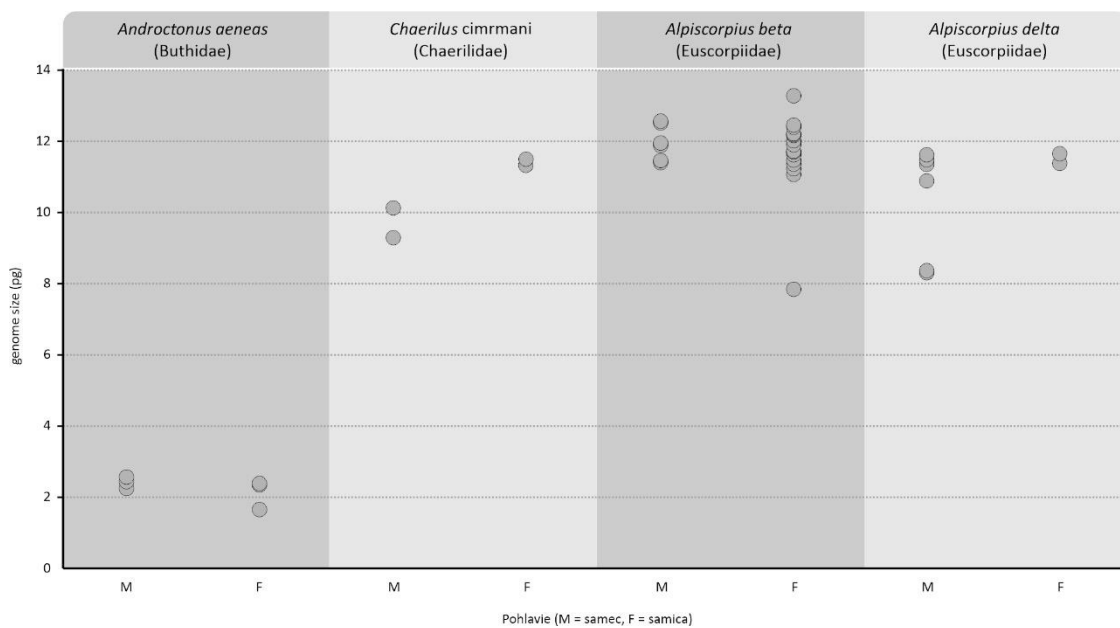
Pri analýze cievnej sústavy (obrázok 15–a) bol viditeľne analyzovaný iba štandard. V očakávanej oblasti v okolí PI–400 na ose x, môžeme vidieť viac menej iba náznak jadier, a takýto malý náznak nie je pre relevantnú analýzu postačujúci. Podobne je na tom aj analýza z nervovej sústavy (obrázok 15–c) a analýza hemolymfy, kde navyše vidíme peak G2 od štandardu (obrázok 15–e). Jediná analýza, u ktorej sa neobjavil ani náznak peaku vzorky, bola analýza čreva, kde navyše vidíme veľmi znečistený peak štandardu neznámymi jadrami (obrázok 15–d). Najzaujímavejšou analýzou je analýza gonád (obrázok 15–b).

Pri tejto analýze môžeme vidieť štyri rôzne peaky, pričom peak X1 je rozdelený na ďalšie dva. Môžeme vidieť peak štandardu a vzorky, ale pri analýze vzorky s neznámou veľkosťou genómu, by sme si nemohli byť istý, ktorí z peakov je správny. Peak X2 s istotou určiť nemôžeme, ale mohlo by ísť o polyploidné jadrá. U peaku označeného ako X1, by mohlo ísť o haploidné bunky, ktoré sa vytvárajú počas redukčného delenia (gametogenézy). Rozdelenie peaku na dve naznačuje produkciu dvoch typov gamét s heterogametickým pohlavím. Tento výsledok je veľmi zaujímavý, pretože škorpióny nemajú morfológicky diferencované pohlavné chromozómy.

## 7.8 Rozdiel vo veľkosti genómu medzi pohlavím

U niektorých druhov sa podarilo zmerať veľkosť genómu oboch pohlaví. Pre porovnanie rozdielu vo veľkosti genómu boli vybrané druhy a jedince, ktoré obsahovali viac ako dve merania u oboch pohlaví (tabuľka 3). Ide konkrétne o druhy *Androctonus aeneas* (Koch, 1939), *Alpiscorpius beta*, *Alpiscorpius delta* (Kovařík a kol., 2019) a *Chaerilus cimrmani* (Kovařík, 2012) (obrázok 16). Z druhu *Androctonus aeneas* sa podarilo zmerať troch samcov a tri samice. Najnižšia veľkosť genómu v rámci samíc je  $2C = 1,65$  pg a najvyššia  $2C = 2,35$  pg. U samcov to je  $2C = 2,25$  pg a  $2C = 2,57$  pg. Bohužiaľ, u šiestich jedincov sa tento údaj štatisticky overiť nedal, ale podľa týchto údajov tam výrazný rozdiel medzi pohlavím nie je. Z druhu *Alpiscorpius beta* sa zmeralo devätnásť samíc a šesť samcov s veľkosťami u samíc od  $2C = 7,84$  pg, po  $2C = 13,28$  pg, čo je samo o sebe veľká diverzita v rámci jedného druhu a pohlavia. U samcov sú hodnoty od  $2C = 11,4$  pg po  $2C = 12,56$  pg. Priemerne sa medzi pohlaviami pravdepodobne nenachádza výrazný rozdiel, no zaujímavá je variabilita v rámci samíc. Štyri jedince z druhu *Alpiscorpius beta* boli iného pôvodu a boli zmrazené v inom roku ako zbytok jedincov tohto druhu. Z druhu *Alpiscorpius delta* sa zanalyzovalo šesť samcov a dve samice. Veľkosti genómu samíc sú  $2C = 11,38$  pg a  $2C = 11,65$  pg. U samcov bola najnižšia hodnota  $2C = 8,3$  pg a najvyššia  $2C = 11,62$  pg. Priemerne by opäť medzi pohlavím u tohto druhu nemalo ísť o výrazný rozdiel. U druhu *Alpiscorpius delta* boli taktiež samice zmrazené v inom roku ako samce tohto druhu. Druh *Chaerilus cimrmani* obsahuje dve samice a dva samce. U tohto druhu sa nám ukazuje náznak rozdielu vo veľkosti genómu medzi samcami a samicami. Veľkosti genómu u samíc je  $2C = 11,34$  pg a  $2C = 11,52$  pg. U samcov je to  $2C = 9,28$  pg a  $2C = 10,13$  pg. Z obrázku 14 môžeme vidieť jednotlivé veľkosti genómu konkrétneho druhu rozdelené na samice a samce.

Štatisticky sa podarilo overiť možný rozdiel medzi pohlavím len u druhu *Alpiscorpius beta*, a to vďaka dostatočne veľkej vzorke. K tomu bol spravený regresný model a následne anova (tabuľka 8). Hodnota  $\text{Pr}( >F ) > 0,05$ , čo znamená, že medzi pohlavím nie je signifikantný rozdiel s 99,9% presnosťou.



Obrázok 16: Rozdiel vo veľkosti genómu medzi pohlavím štyroch druhov škorpiónov z čeľade Buthidae, Chaerilidae a Euscorpiidae.

Tabuľka 8: Výsledok štatistickej analýzy anova pre rozdiel veľkostí genómu pohlavia druhu *Alpiscorpius beta* v programe RStudio vo verzii 3.6.3.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Čeľad'	1	0.3472	0.34722	0.3572	0.5562
Residuals	22	21.3867	0.97212		

## 8. Diskusia

### 8.1 Veľkosť genómu

Absolútna veľkosť genómu u škorpiónov analyzovaných v našej práci sa pohybuje od  $2C = 1,2$  pg u druhu *Tityus mana* z čeľade Buthidae, po  $2C = 20,37$  pg u druhu *Euscorpius sicanus* z čeľade Euscorpiidae. Veľkosti genómu škorpiónov sú zaznamenané v *Animal Genome Size Database*, no táto databáza v súčasnosti nie je kompletná a aktuálne sa v nej nachádzajú len dva zamerané druhy z rádu štúry. Jedným druhom je *Centruroides vittatus* (Say, 1821) z čeľade Buthidae, ktorého veľkosť genómu bola stanovená na základe prietokovej cytometrie ako  $2C = 1,8$  pg. Tento údaj bol publikovaný v štúdiu od Hannah a Johnston (2011). Analyzované tkanivo bolo získané z mozgu a bol použitý zvierací štandard *Drosophila virilis* Sturtevant, 1916,  $2C = 0,68$  pg. Štúdia je ale inak zameraná na analýzu veľkosti genómu článkonožcov a toto je jediný zanalyzovaný druh v rámci celej štúdie. Druhým zmeraným druhom, ktorý sa v databáze nachádza je *Mesobuthus martensii* taktiež z čeľade Buthidae s veľkosťou genómu  $2C = 2,7$  pg, ktorá bola stanovená pomocou prietokovej cytometrie s využitím zvieracieho štandardu *Gallus domesticus* Linnaeus, 1758,  $2C = 2,5$  pg. Tento údaj bol publikovaný v práci od Cao a kol. (2013), v ktorej sa ale venujú sekvencii celého genómu tohto konkrétneho druhu. V tejto diplomovej práci sa nám podarilo zanalyzovať z tohto rodu druhy *Mesobuthus eupeus*,  $2C = 2,97$  pg, a *Mesobuthus haarlovi* Vachon, 1958,  $2C = 2,69$  pg, ktoré sú takmer totožné s veľkosťou genómu u *Mesobuthus martensii* z práce od Cao a kol. (2013).

Problém databáze je aj jej neaktuálnosť, minimálne z posledných dvoch rokov. Štúdia od Yorke (2020) zanalyzovala 20 druhov škorpiónov zo štyroch čeľadí s veľkosťami genómu od  $2C = 1,56$  pg po  $2C = 11,7$  pg. Tieto údaje ale v databáze uvedené nie sú. Na stanovenie veľkosti genómu bola v tejto práci použitá denzitometria Feulgenovej analýzy obrazu (FIAD), na rozdiel od našej analýzy pomocou prietokovej cytometrie. Táto metóda funguje na princípe farbenia fixovaných (vzduchom vysušených) tkanivových preparátov na mikroskopických sklíčkach Feulgenovou reakciou, najčastejšie s využitím Schiffovho leukofuchsínu kyseliny siričitej. Následne predpokladá, že množstvo naviazanej škrvny je priamo úmerné množstvu prítomnej DNA. Množstvo škrvny je určené na základe množstva svetla, ktoré absorbuje (Hardie a kol. 2002).

Aj keď vzorka analyzovaných škorpiónov v tejto štúdiu nie je dostatočne veľká (20 druhov), podarilo sa im zmerať druhy z dvoch skupín – Buthida (12 druhov) a Lurida (8 druhov). Tak ako aj v našej práci (viď tabuľka 3), skupina Buthida vykazovala podstatne menšie veľkosti genómu v priemere  $2C = 2,42$  pg, zatiaľ čo skupina Lurida vykazovala v priemere  $2C = 9,28$  pg.

V práci od Yorke (2020) boli analyzované čeľade Vaejovidae, Scorpionidae, Diplocentridae a Caraboctonidae zo skupiny Iurida a čeľad' Buthidae zo skupiny Buthida. Z čeľade Vaejovidae boli analyzované štyri druhy a veľkosť genómu sa pohybovala od  $2C = 6,48$  pg u druhu *Smeringurus vachoni* (Stahnke, 1961), po  $2C = 11,70$  pg u druhu *Hoffmannius confusus* (Stahnke, 1961). V našej práci sa nám z tejto čeľade nepodarilo zanalyzovať ani jeden druh. Z čeľade Diplocentridae, ktorú sme taktiež v našej práci neanalyzovali, bol analyzovaný iba druh *Nebo cf. whitei* Vachon, 1980,  $2C = 7,16$  pg. Z čeľade Scorpionidae boli zmerané dva druhy *Heterometrus cf. spinifer* (Ehrenberg, 1828),  $2C = 12,18$  pg a *Pandinus sp.*,  $2C = 10,36$  pg a tieto údaje odpovedajú hodnotám nameraným druhom z tejto čeľade v rámci našej práce (tabuľka 3). U čeľade Caraboctonidae bol zmeraný len jeden druh, a to *Hadrurus arizonensis* Ewing, 1928 s veľkosťou genómu  $2C = 5,44$  pg, a podobne nízku veľkosť genómu sme zistili aj u dvoch nami analyzovaných druhov čeľadi Caraboctonidae. Z čeľade Buthidae bol zanalyzovaný najvyšší počet druhov s hodnotami od  $2C = 1,56$  pg u *Parabuthus granulatus* (Ehrenberg, 1831), po  $2C = 3,08$  pg u *Hottentotta buchariensis* (Birula, 1897). Tri druhy zmerané v tejto štúdii sa podarilo zanalyzovať aj nám. Ide o druhy *Hottentotta hottentotta* (Fabricius, 1787);  $2C = 3,19$  pg, *Hottentotta salei* (Vachon, 1980;  $2C = 3,12$  pg) a *Androctonus cholistanus* Kovařík a Ahmed, 2013;  $2C = 2,11$  pg z čeľade Buthidae. Výsledky práce od Yorke (2020) boli u druhu *Hottentotta hottentotta*  $2C = 2,3$  pg, u druhu *Hottentotta salei*  $2C = 2,94$  pg, a u *Androctonus cholistanus*  $2C = 2,26$ . Druhy *Hottentotta salei* a *Androctonus cholistanus* majú podobné hodnoty ako u nás. U druhu *Hottentotta hottentotta* bol rozdiel medzi našimi výsledkami a Yorke (2020) pomerne vysoký a to o  $0,89$  pg. To ale mohlo byť spôsobené využitím dvoch odlišných metód na stanovenie veľkosti genómu.

V práci boli opäť využité zvieracie štandardy, konkrétne krv z kury domácej *Gallus domesticus*,  $2C = 2,5$  pg; krv pstruha dúhového *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792),  $2C = 5,2$  pg a mozgové tkanivo vínnych ovocných mušiek *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830,  $2C = 0,36$  pg pre analýzu najmenších genómov.

V našej práci bolo najviac jedincov zanalyzovaných z dvoch čeľadi – Buthidae zo skupiny Buthida a čeľad' Euscorpiidae zo skupiny Iurida (tabuľka 1). Priemerná veľkosť genómu u čeľade Buthidae bola u nás stanovená ako  $2C = 2,5$  pg, a u čeľade Euscorpiidae  $2C = 12,97$  pg. Tento rozdiel je výrazný a signifikantne nám to potvrdila aj anova (tabuľka 6).

Veľkosť genómu môže ovplyvňovať viacero faktorov. Malá veľkosť genómu by mohla byť vo všeobecnosti spojená podľa Sharaf a kol. (2008) s malou veľkosťou tela, holometabolickým vývojom, krátkym bunkovým cyklom, krátkym generačným cyklom, schopnosťou rýchlo kolonizovať nové potravinové zdroje, a taktiež by malá veľkosť genómu mohla šetriť energiu.

V rámci rádu škorpióny vykazujú menšie genómy čeľade zo skupiny Buthida, a naopak, väčšie genómy čeľade zo skupiny Iurida, ako som spomínala vyššie. Rozdiel medzi týmito dvoma skupinami je napríklad v prítomnosti ovariálnej divertikuly (doplňkový reprodukčný orgán). Tento plní podobnú úlohu ako placenta cicavcov a poskytuje embryám výživu počas vývoja vo vnútri matky. Škorpióny zo skupiny Buthida tieto ovariálne divertikuly nemajú a zvyčajne majú kratšiu dobu gravidity (2–3 mesiace) v porovnaní s druhmi, ktoré majú ovariálne divertikuly (až 24 mesiacov) (Stockmann a kol. 2010). Takéto výsledky vykazovali aj iné taxóny, kde sa rýchlejší vývoj odrazil v menšej veľkosti genómu (Gregory 2011).

Ďalším rozdielom je aj životná stratégia, pričom väčšina čeľadí škorpiónov sa radí ku K-stratégom, ktorí majú dlhší životný cyklus a starajú sa o niekoľko väčších potomkov. Jediná čeľaď škorpiónov, ktorá sa vyznačuje r-stratégmi je čeľaď Buthidae, do ktorej spadajú predovšetkým pomerne malé druhy s krátkym životným cyklom a bohatým potomstvom (Monge Nájera 2019). Zdá sa teda, že životná stratégia by mohla súvisieť s veľkosťou genómu, pričom r-stratégovia by mohli šetriť energiu vďaka menším genómom.

Odlíšnym znakom pozorovaným u škorpiónov, ktorý ich rozdeľuje na dve skupiny podľa kinetickej aktivity, je prítomnosť monocentrických chromozómov u skupiny Iurida a chromozómov holocentrických u čeľade Buthidae (Melters a kol. 2012; Prendini a Wheeler 2005). Táto charakteristika by taktiež mohla súvisieť s veľkosťou genómu, pričom čeľaď Buthidae s holokinetickými chromozómami vykazuje menšie veľkosti genómov (Yorke 2020). Štúdia od Král a kol. (2019) analyzovala rád pavúkov z triedy pavúkovce kde spadá aj rád škorpióny. Práca je zameraná na vývoj genómu a chromozómov u haplogynných pavúkov s holokinetickými chromozómami. Taktiež bol v práci analyzovaný obsah GC (%) báze.

Zaujímavým výsledkom je analýza čeľade Caponiidae s monocentrickými chromozómami a Dysderinae s holokinetickými chromozómami. Všetci zástupcovia holokinetickej čeľade Dysderinae vykazovali podstatne menšie genómy ( $2C = 3,03\text{--}16,53$  pg) v porovnaní s ich najbližšími príbuznými Caponiidae ( $2C = 30,42\text{--}46,36$  pg). Čeľaď Caponiidae má okrem veľkej veľkosti genómu aj vysoký počet diploidných a pohlavných chromozómov.

Autori v štúdiu naznačujú, že tieto hodnoty by mohla ovplyvniť polyploidná udalosť u predkov čeľade Capanidae. Holokinetické chromozómy u čeľade Dysderinae by potom mohli byť výsledkom následných fúzií viacerých chromozómov a značným zmenšením veľkosti genómu.

V práci od Král a kol. (2019) bola ďalej priemerná veľkosť holokinetických genómov (6,36 pg) podobná ako v monocentrických genómoch (6,06 pg), čo neodpovedá našim výsledkom, kde čeľaď s holokinetickými chromozómami vykazovala podstatne menšie veľkosti genómov ako čeľade s monocentrickými chromozómami. Rozsah veľkostí holokinetických genómov bol užší (3,93–9,39 pg) ako rozsah monocentrických genómov (1,76–11,54 pg), čo potvrdzuje aj naša analýza.

V práci taktiež stanovili obsah báz GC, ktorý sa u pavúkov pohyboval u čeľadí s monocentrickými chromozómami od 32,3% po 43,5% a u čeľadí s holocentrickými chromozómami od 36,5% po 39,4%. V štúdiu vykazovali druhy so zvýšenou veľkosťou genómu o niečo vyšší obsah GC báze ako ich blízki príbuzní s menším genómom. Veľkosť genómu aj obsah GC by mohli byť poháňané rovnakým procesom, ako je šírenie alebo odstraňovanie transponovateľných prvkov bohatých na GC alebo chudobných na GC, ako uvádzajú Šmarda a Bureš (2012). To môže stať za bežne zistenú pozitívnu koreláciu obsahu GC s veľkosťou genómu v rodoch s relatívne malými genómami (Bureš a kol. 2007). Táto pozitívna korelácia bola potvrdená aj v iných štúdiách napríklad od Veleba a kol. (2017), kde analyzovali mäsožravé holokinetické rastliny s čeľade Droseraceae. V tejto diplomovej práci sa nám nepodarilo tieto údaje získať, ale obsah báz GC by taktiež mohol mať vplyv na veľkosť genómu.

## 8.2 Štandardy

Dôležitou časťou analýzy veľkosti genómu je voľba vhodného štandardu. Aktuálne je využívané veľké množstvo rastlinných ale aj živočíšnych štandardov. Štandard, ktorý si zvolíme, by mal spĺňať niekoľko zásadných podmienok, z ktorých najdôležitejšia je známa a stabilná veľkosť genómu bez vnútrodruhovej variability. Taktiež je vhodné mať k dispozícii čo najviac informácií o štruktúre daného genómu. V najideálnejšom prípade by sa malo jednať o genóm, ktorý je osekvenovaný a anotovaný (Doležel a Greilhuber 2010).

Druhy, ktoré majú aktuálne osekvenovaný genóm a využívajú sa ako štandardy sú napríklad *Caenorhabditis elegans* (Maupas, 1899) s  $2C = 0,2$  pg podľa C. elegans Sequencing Consortium 1998, alebo *Drosophila melanogaster* s  $2C = 0,36$  pg podľa Adams a kol. 2000. Veľkosť týchto osekvenovaných genómov je ale pomerne malá vzhľadom na veľkosti genómov škorpiónov, ktoré sa v našej práci pohybovali až do veľkosti  $2C = 20,37$  pg.

Ako som spomínala vyššie v diskusii, v štúdiách škorpiónov sa používajú živočíšne štandardy ako napríklad *Gallus domesticus* s veľkosťou genómu  $2C = 2,5$  pg, pstruh dúhový *Oncorhynchus mykiss*,  $2C = 5,2$  pg, a vínne ovocné mušky *Drosophila melanogaster*,  $2C = 0,36$  pg a *Drosophila virilis*  $2C = 0,68$  pg. (Cao a kol. 2013; Hannah a Johnston 2011; Yorke 2020). Problémom pri zvieracích štandardoch je ale určite ich dostupnosť a skladovanie. Ďalšou komplikáciou u zvieracích genómoch je možná vnútrodruhová variabilita a rozdiely vo veľkosti genómu súvisiace s pohlavím, ktoré boli opísané u ľudí a kuriat (De Vita a kol. 1994; Mefford a kol. 1997).

Vo všeobecnosti sa neodporúča používať rastliny ako štandard pri analýze živočíšnych veľkostí genómov a naopak. Dôvodom sú niektoré odlišné vlastnosti živočíšnych a rastlinných buniek (Greilhuber a kol. 2007; Suda a Leitch 2010). Sekundárne metabolity a dôsledky ich prítomnosti pre cytometriu sú otázkou riešenou hlavne pri rastlinách. Analýzy veľkosti genómu komplikuje napríklad prítomnosť tanínov, rôznych organických kyselín či alkaloidov (Loureiro a kol. 2006; Nath a kol. 2014). Prítomnosť týchto látok môže ovplyvňovať mieru fluorescenčného farbenia, kvalitu analýzy (Greilhuber 2008) a môže viesť k nesprávnym predpokladom o vnútrodruhej variabilite veľkosti genómu (Noirot a kol. 2002). Tieto komplikácie sa ale do istej miery môžu riešiť napríklad využitím inej časti rastliny alebo zmenou pufru (Loureiro a kol. 2006; Sadhu a kol. 2016).

Existujú ale štúdie (napr. Rodrigues a kol. 2016; Sadílek a kol. 2019), ktoré považujú využitie rastlinných štandardov na analýzu genómu prietokovým cytometrom živočíchov za určitých podmienok vhodnejšie. Hlavnou výhodou rastlinných štandardov je lepšia dostupnosť, vyššie overenie v praxi a taktiež ich vyššia veľkosť genómu, ktorá bola vhodná pri analýze jedincov s väčšími veľkosťami genómov. To boli aj dôvody prečo sme sa v našej práci rozhodli používať rastlinné štandardy.

### **8.3 Tkanivá**

Na analýzu prietokovým cytometrom je potrebné zvoliť vhodný typ analyzovaného tkaniva u daného jedinca. Typ tkaniva môže mať významný vplyv na výslednú analýzu a jej kvalitu. V štúdiách zameraných na analýzu živočíšnych genómov sú najčastejšie využívanými tkanivami hemolymfa, nervové tkanivo, svalové tkanivo a v jednej štúdii boli využité aj spermie (Hanrahan a Johnston 2011; Cao a kol. 2013; Mao a kol. 2020). Hanrahan a Johnston (2011) využili mozgové tkanivo, no komplikáciou bolo nevedomé pridanie očného tkaniva, ktoré sa odrazilo v kvalite analýzy a šírky daného peaku. V práci od Kelly (2018) skúmali bunky rôznych typov tkanív u švábov (Blattodea). Konkrétne hemolymfu, nervové tkanivo a svalové tkanivo.



Z výsledkov vyšlo, že sa veľkosti genómu jednotlivých tkanív medzi sebou signifikantne nelíšia, zároveň ale nebolo konkrétne popísané u koľkých jedincov sa to pozorovalo, a chýba tiež štatistické overenie.

Problémy, ktoré môžu niektoré tkanivá spôsobiť je napríklad obsah čreva, prípadne slinné žľazy a niektoré ďalšie tkanivá, v ktorých môže dochádzať k endopolyploidizácii (Lee a kol. 2009; Camacho 2016).

V tejto práci sme sa pokúsili zanalyzovať rôzne tkanivá škorpiónov a vybrať najvhodnejšie na určenie veľkosti genómu štúrov. Analyzované boli tkanivá samca druhu *Pandinurus exitialis*, z ktorého sa nám vďaka jeho veľkosti naviac podarilo odobrať rôzne typy tkanív, a to konkrétne gonády, nervovú sústavu, črevo, hemolymfu a svalové tkanivo (obrázok 15). Najkvalitnejšiu analýzu sme dostali zo svalového tkaniva, z ktorého boli analyzované aj ostatné jedince v tejto práci. Ako najmenej kvalitný výsledok z našej analýzy sa ukázalo črevo, v ktorom nebol jasne viditeľný náznak študovaného tkaniva vzorky, a peak štandardu bol zároveň veľmi znečistený neznámymi jadrami. Analýza cievnej a nervovej sústavy vykazovala podobný výsledok, pričom bol viditeľný náznak študovanej vzorky škorpióna, no počet zanalyzovaných jadier vzorky nebol postačujúci na relevantnú a kvalitnú analýzu. Rovnako na tom bola aj analýza hemolymfy s tým, že bol tiež viditeľný peak G2 od použitého štandardu.

Najzaujímavejším výsledkom je analýza gonád, kde boli viditeľné štyri rôzne zhluky jadier. Z analýzy je viditeľná veľkosť genómu vzorky, ktorú sa podarilo určiť na základe znalosti veľkosti genómu zo svaloviny, no bez tejto znalosti by sme si nemohli byť istý, kde presne sa nachádza relatívny obsah jadrovej DNA. Jeden zhluk jadier (obrázok 15–b;X1), ktorý obsahoval rozdvojený peak, by mohol reprezentovať haploidné bunky, ktoré sa vytvárajú počas redukčného delenia (gametogenézy). Ako som spomínala vo výsledkoch, rozdvojené peaky môžu naznačovať produkciu dvoch typov gamét s heterogametickým pohlavím. Odlišnú veľkosť v haploidnej sade, ktorá indukuje vznik rôznych typov gamét identifikovali aj Sadílek a kol. (2019) v rámci analýzy genómu ploštíc a ich variability pohlavných chromozómov. U druhu *Cimex lectularius* (Linnaeus, 1758) vykazovala analýza gonád podobne rozdvojené peaky v relatívnom obsahu jadrovej DNA ako v našej práci. Tento výsledok potvrdil produkciu oboch typov gamét u druhu *C. lectularius*. Toto zistenie je ale pre nás veľmi zaujímavé, pretože u rádu škorpióny zatiaľ neboli morfológicky diferencované pohlavné chromozómy (napr. Adilardi a kol. 2015; Schneider a kol. 2009; Štundlová 2019). Druhý zhluk jadier by mohol reprezentovať polyploidné jadrá (obrázok 15–b;X2).

Tieto boli takisto identifikované v štúdiu od Sadílek a kol. (2019) u druhu *C. lectularius*, ktoré bolo možné identifikovať pri analýze gonád a čreva pomocou farbiva DAPI. V tejto práci boli viditeľné tieto polyploidné jadrá iba pri analýze gonád pomocou farbiva PI.

## 8.4 Evolúcia veľkosti genómu u škorpiónov

Tabuľka 9: Počet druhov jednotlivých čeľadí s informáciou o ich najväčšom a najmenšom genóme (v pg). Počet druhov podľa Rein (2022).

Fylogénéza škorpiónov nie je v súčasnosti jednoznačne rozriešená (viď kapitola 4.3). Napriek tejto skutočnosti sa pokúsim okomentovať súvislosť medzi aktuálnym fylogenetickým rozdelením a veľkosťou genómu. Čeľaď Buthidae radíme do skupiny Buthida, ktorá sa od ostatných čeľadí odlišuje výskytom holocentrických

Čeľaď	Počet druhov	Najmenší genóm	Najväčší genóm
Buthidae	1297	1, 2	3,97
Chaerilidae	54	8,03	11,52
Luridae	14	5,55	8,59
Caraboctonidae	25	5,41	8,42
Euscorpiidae	96	7,6	20,37
Scorpiopidae	100	11,47	15,9
Hormuridae	95	12,24	13,17
Scorpionidae	185	10,22	17,2

chromozómov (Shanan 1989). Táto čeľaď je aj spomedzi čeľadí, ktoré sme analyzovali druhovo najpočetnejšia (tabuľka 9), a druhy z tejto čeľade radíme k r–stratégom (Monge Nájera 2019). Spolu s čeľadami Pseudochactidae a Chaerilidae tvoria včasne sa vetviacu líniu celej skupiny Buthida. Dalo by sa predpokladať, že pri takomto druhovo bohatom zastúpení bude táto čeľaď vykazovať vysokú variabilitu vo veľkosti genómu, čo sa v našej práci nepotvrdilo. Sesterská čeľaď Chaerilidae bola zaradená do skupiny Buthida len nedávno (Santibáñez–López a kol. 2019; Sharma a kol. 2015,2018). Táto je druhovo podstatne menej početná ako čeľaď Buthidae (tabuľka 9). Jej priemerná veľkosť genómu v našej práci bola podstatne vyššia ako u čeľade Buthidae ( $2C = 2,5$  pg), Chaerilidae ( $2C = 9,95$  pg). U tejto čeľade zatiaľ nebol potvrdený typ chromozómov, ale vysoká variabilita počtu chromozómov ( $2n = 76–186$ ), a výrazne diferencované karyotypy odpovedajú skôr monocentrickým chromozómom (Kovářík a kol. 2018). To by mohlo vysvetľovať aj jej vyšší genóm, ktorý bol v našej práci identifikovaný u čeľadí s monocentrickými chromozómami. Prvou čeľaďou a samostatnou líniou v skupine Lurida je čeľaď Luridae, ktorá patrí do nadčeľade Luroidea. Táto je druhovo najmenej početná (tabuľka 9). Veľkosťami genómu ( $2C = 5,55$  pg,  $2C = 8,59$  pg) sa podobala čeľadi Caraboctonidae ( $2C = 5,41$  pg,  $2C = 8,42$  pg), ktorá sa aktuálne radí do nadčeľade Chactoidea. Ďalšími dvoma čeľadami z nadčeľade Chactoidea je Euscorpiidae a Scorpiopidae, pričom ide aj o dve sesterské línie. Tieto mali priemerné hodnoty  $2C = 12,97$  u Euscorpiidae a  $2C = 13,32$  pg. Ďalšou nadčeľaďou je Scorpionoidea, z ktorej sa nám podarilo zmerať čeľade Hormuridae a Scorpionidae, pričom Hormuridae sa v súčasnosti nepovažuje za monofyletickú.

Priemerná hodnota u Hormuridae je  $2C = 12,71$  a u Scorpionidae  $2C = 12$  pg. Z našich výsledkov je možné vidieť, že sesterské línie majú podobné veľkosti genómov, pričom sa veľkosť genómu postupne zvyšuje u neskôr sa vetviacich línií, u Scorpionidae, Hormuridae a Scorpionidae.

Veľkosti genómu Luridae a Caraboctonidae sú o niečo menšie, čo by mohli byť pôvodné veľkosti genómu, ktoré sa následne buď zväčšovali alebo zmenšovali. Jedinou výnimkou je čeľaď Chaerilidae, ktorá sa výrazne líšila veľkosťou genómu od sesterskej čeľade Buthidae, čo ale môže byť spôsobené prítomnosťou rozdielnych typov chromozómov. Zároveň je ale dôležité zmieniť, že z niektorých čeľadí bolo namerané minimálne množstvo jedincov a teda nejde o objektívny výsledok.

## 8.5 Počet chromozómov

Diploidný počet chromozómov u rádu škorpióny sa v tejto práci pohyboval od  $2n = 14$  u *Tityus obscurus* po  $2n = 138$  u *Megacormus gertschi*. Celkovo sa diploidný počet chromozómov u škorpiónov pohybuje od  $2n = 5$  u druhu *Tityus bahiensis* a *T. confluens* (Borelli, 1899), po  $2n = 186$  u *Chaerilus stockmanorum*.

Škorpióny majú taktiež vysoko variabilné karyotypy na medzidruhovej úrovni. Napríklad *Chaerilus* (Chaerilidae)  $2n = 76–186$  (Kovařík a kol. 2018), *Alpiscorpius* (Euscorpiidae)  $2n = 46–92$  (Štundlová a kol. 2019), *Hadogenes* (Hormuridae)  $2n = 48–174$  (Šťáhlavský a kol. 2018) a *Urodacus* (Urodacidae)  $2n = 29–175$  (Shanahan 1989). V súčasnosti sa ale väčšina štúdií zameriava na čeľaď Buthidae ( $2n = 5–36$ ). Táto čeľaď má ako jediná v rámci rádu škorpiónov holokinetickú organizáciu chromozómov. Tento typ chromozómov umožňuje ich časté štiepenie a fúzie, ako uvádza Melters a kol. (2012), a to by mohlo stať za objasnením variability karyotypu na vnútrodruhovej úrovni (napr. *Tityus bahiensis*  $2n = 5–19$ ) (Schneider a kol. 2009). U tohto druhu škorpióna boli zistené veľmi časté chromozómové prestavby, a taktiež bol zistený synaptonemálny komplex, ktorý je zodpovedný za riadne homológne rozdelenie v anafáze I bunkového cyklu (Schneider a kol. 2009). To by mohlo byť hlavne výhodné pre druhy článkonožcov, ktorí majú achiazmatickú meiózu a synaptonemálny komplex by mohol plniť funkciu chiazmat (Rasmussen 1977).

Táto čeľaď často vykazuje konštantný počet chromozómov v rámci jednotlivých rodov (napr. Sadílek a kol. 2015; Kovařík a kol. 2020). Tento fakt sa nám potvrdil aj v našej práci (tabuľka 3). Napríklad druh *Androctonus* má konštantný počet chromozómov  $2n = 24$ , a rovnako aj druh *Buthus*, ktorý má počet chromozómov  $2n = 22$ . Zvyšné čeľade škorpiónov majú monocentrické chromozómy a zvyčajne majú aj vyššie počty chromozómov (Šťáhlavský a kol. 2020b).

Analyzované druhy v tejto práci s monocentrickými chromozómami vykazovali počty chromozómov od  $2n = 28$  u *Opisthacanthus* sp. z čeľade Hormuridae (príloha 4–d) po  $2n = 138$  u *Heterometrus mysorensis* Kovařík, 2004 z čeľade Scorpionidae (príloha 4–g). V rámci čeľadí s monocentrickými chromozómami navyše môžeme vidieť vyššiu variabilitu na úrovni čeľadí.

Čo sa týka medzidruhovej variability, tá je tiež oproti čeľadi Buthidae s holocentrickými chromozómami vyššia. Napríklad druhy rodu *Euscorpius* z čeľade Euscorpiidae majú počty chromozómov  $2n = 36$  u *Euscorpius italicus*, po  $2n = 128$  u *Euscorpius flavicaudis* (tabuľka 3, príloha 3–d).

## 8.6 Závislosť veľkosti genómu na počte chromozómov

Genóm je zodpovedný za reprodukciu jedinečných vlastností druhu v priebehu generácií. Ak sa veľkosť alebo počet chromozómov zmení, môže dôjsť k drastickým zmenám charakteristík druhu. Štúdie potvrdili, že dva rozličné druhy môžu mať rovnakú veľkosť genómu, ale odlišný počet chromozómov s úplne inými fenotypovými znakmi. (El–Shehawi a Elseehy 2017).

Existuje viacero štúdií, ktoré skúmajú závislosť medzi veľkosťou genómu a počtom chromozómov. Veľký počet štúdií je hlavne zameraných na analýzu závislosti veľkosti genómu a počtu chromozómov u rastlín. Napríklad v štúdiu od Choi a kol. (2020), kde výsledky ukázali, že medzi počtom chromozómov neexistuje žiadna korelácia s veľkosťou genómu druhov rodu *Iris*. Napríklad druh *Iris ensata* Thumb. s nízkym počtom chromozómov  $2n = 24$  má veľkosť genómu  $2C = 15,52$  pg, zatiaľ čo jej blízky príbuzný *I. setosa* Pallas ex Link má  $2n = 38$ , ale veľkosť genómu  $2C = 11,26$  pg.

Štúdia od Pandit a kol. 2014 našla pozitívnu koreláciu medzi veľkosťou genómu a počtom chromozómov u invazívnych rastlín, pričom tieto rastliny vykazovali menšiu veľkosť genómu a vyšší počet chromozómov. Taktiež v práci navrhujú, že invázivnosť môže súvisieť so zmenami v počte chromozómov a ich následnom účinku na veľkosť genómu. Toto potvrdzuje, že veľkosť genómu by mohla ovplyvňovať adaptabilitu rastlinných a živočíšnych druhov, pričom druhy s väčšou veľkosťou genómu sa nedokážu prispôbiť premenlivým podmienkam, zatiaľ čo rastliny a živočíchy s menšími genómami v takomto prostredí prosperujú a stávajú sa invazívnymi (Bennett 1987; Bennett a kol. 1998).

V tejto práci sme popisovali závislosť veľkosti genómu a počtu chromozómov u čeľadí Buthidae a Euscorpiidae. Z výsledkov, ktoré boli štatisticky overené môžeme túto závislosť vylúčiť. Vyššia veľkosť genómu nekoreluje s vyšším počtom chromozómov a veľkosť genómu budú ovplyvňujú iné vlastnosti.

## 8.7 Rozdiel medzi samcami a samicami

U celého radu druhov článkonožcov boli vo veľkostiach genómov pozorované rozdiely medzi pohlaviami (napr. Hanrahan a Johnston; 2011, Picard a kol. 2012), ktoré pramenia z prítomnosti heteromorfných pohlavných chromozómov (Sharaf a kol. 2010) alebo z rozdielu počtu chromozómov (He a kol. 2016).

Výsledky tejto práce obsahujú porovnanie veľkosti genómu medzi samcami a samicami. Aktuálne nie sú žiadne štúdie, ktoré by sa zaoberali rozdielmi vo veľkosti genómu samcov a samíc u škorpiónov. V práci od Hanrahan a Johnston (2011), kde bola analyzovaná veľkosť genómu u druhu *Centruroides vittatus* z rádu škorpióny, boli rozoznané a analyzované pohlavia u niektorých rádov z triedy hmyz. Druhy u ktorých boli významné rozdiely vo veľkosti genómu medzi pohlavím boli z rádu Mecoptera a Orthoptera. Naopak druhy z čeľade Blaberidae a rádu Coleoptera nevykazovali významné rozdiely vo veľkosti genómu u samcov a samíc. U rádu Hemiptera z triedy hmyz boli ale analyzované významné rozdiely medzi pohlavím v štúdiu od Rodrigues (2016). Konkrétne u druhu *Philaenus spumarius* (Linnaeus, 1758), sa samce a samice významne líšili veľkosťou genómu, pričom samce mali v priemere menšiu veľkosť genómu než samice. Rozdiely vo veľkosti genómu medzi pohlavím môže zapríčiniť napríklad prítomnosť heteromorfných pohlavných chromozómov (Sharaf a kol. 2008) alebo rozdiel počtu chromozómov (He a kol. 2016).

V tejto diplomovej práci sa nám podarilo zanalyzovať štyri druhy škorpiónov z troch čeľadí. Išlo o druhy *Androctonus aeneas*, *Alpiscorpius beta*, *Alpiscorpius delta* a *Chaerilus cimrmani*. Štatisticky sa nám podarilo overiť rozdiel len u druhu *Alpiscorpius beta*, kde sa nám významný rozdiel nepotvrdil. Výsledky u druhov *Androctonus aenea* a *Alpiscorpius beta* taktiež naznačujú, že sa medzi pohlavím rozdiely vo veľkosti genómu nenachádzajú. Jediným druhom u ktorého bol viditeľný rozdiel medzi pohlavím bol druh *Chaerilus cimrmani*, pričom samice mali veľkosti genómov  $2C = 11,34$  pg a  $2C = 11,52$  pg a samce  $2C = 9,28$  pg a  $2C = 10,13$  pg. Tieto uvedené pohlavné rozdiely treba brať len ako orientačné, pretože sme nemali dostatok dát aby sme tieto rozdiely štatisticky overili.

## 9. Záver

Táto diplomová práca sa venovala štúdiu veľkosti genómu u rádu škorpióny s využitím metódy prietoková cytometria. Hlavným cieľom bolo zanalyzovať veľkosť genómu čo najväčšieho počtu druhov a čeľadí tohto rádu s prihliadnutím na ich odlišný typ chromozómov.

Najmenšie veľkosti genómu vykazovala čeľaď Buthidae s výskytom holocentrických chromozómov a priemernou veľkosťou genómu ( $2C = 2,5$  pg) a najmenším genómom  $2C = 1,2$  pg. Najväčšie priemerné veľkosti vykazovala čeľaď Scorpiopidae  $2C = 13,32$  pg, pričom najväčšia veľkosť genómu bola u čeľade Euscorpiidae  $2C = 20,37$  pg. Je možné, že práve holocentrické chromozómy, ktoré mohli vzniknúť následnými fúziami chromozómov súvisia s výrazným zmenšením veľkosti genómu.

V práci boli taktiež stanovené počty chromozómov u šiestich čeľadí s hodnotami od  $2n = 14$  u čeľade Buthidae po  $2n = 138$  u čeľade Euscorpiidae. Čeľaď Buthidae vykazovala konštantné počty chromozómov na medzidruhovej úrovni. Závislosť medzi veľkosťou genómu a počtom chromozómov u týchto čeľadí potvrdená nebola.

Analýzy veľkosti genómu boli prevedené zo svalového tkaniva kráčavej končatiny. Zaujímala nás ale aj vhodnosť využitia iných tkanív k analýze genómu prietokovým cytometrom. Zanalyzovaná bola cieвна sústava, nervová sústava, črevá, hemolymfa, gonády a svalovina. Ukázalo sa, že najvhodnejším tkanivom s najkvalitnejšou analýzou bola svalovina. Najzaujímavejšie výsledky boli z analýzy gonád, ktorá naznačuje prítomnosť gamét dvoch pohlaví, pričom u škorpiónov v súčasnosti nebola prítomnosť pohlavných chromozómov potvrdená. U väčšiny jedincov bolo rozlíšené pohlavie, ktoré sme následne zrovnali u štyroch druhov z troch čeľadí. Štatisticky sa nám podarilo overiť rozdiely u druhu *Alpiscorpius beta* z čeľade Euscorpiidae, a signifikantný rozdiel medzi samcami a samicami nebol potvrdený.

Celkovo sa podarilo určiť veľkosť genómu u približne 90 druhov a 220 jedincov z 8 čeľadí. Takmer u všetkých druhov ide o úplne nové údaje, pričom databáza zvieracích genómov obsahuje aktuálne z rádu škorpióny len 2 zamerané druhy z jednej čeľade. Táto práca prispieva novými dátami k výskumu veľkosti genómu škorpiónov a pomáha objasniť tzv. C-value paradox. Taktiež sa z dát diplomovej práce plánuje napísať článok do impaktovaného časopisu.

## 10. Literatúra

1. **Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A., Evans C.A., Gocayne J.D., Amanatides P.G., Scherer S.E., Li P.W., Hoskins R.A., Galle R.F. a kol. (2000):** The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185–2196.
2. **Adilardi R.S., Ojanguren–Affilastro A.A., Mattoni C.I. a kol. (2015):** Male and female meiosis in the mountain scorpion *Zabius fuscus* (Scorpiones, Buthidae): heterochromatin, rDNA and TTAGG telomeric repeats. *Genetica* 143, 393–401.
3. **Adilardi R. S., Ojanguren–Affilastro A. A., Mola L. M. (2016):** Sex–Linked Chromosome Heterozygosity in Males of *Tityus confluens* (Buthidae): A Clue about the Presence of Sex Chromosomes in Scorpions. *PLoS ONE* 11(10):e0164427.
4. **Amalfitano S., Fazi S. (2008):** Recovery and quantification of bacterial cells associated with streambed sediments. *Journal of Microbiological Methods* 75:237–243.
5. **Araujo D., Schneider M.C., Paula–Neto E., Cella D.M. (2022):** The spider cytogenetic database. Available in [www.arthropodacytogenetics.bio.br/spiderdatabase](http://www.arthropodacytogenetics.bio.br/spiderdatabase)
6. **Babb P., Lahens N., Correa–Garhwal S., Nicholson D., Kim E., Hogenesch J. a kol. (2017):** The *Nephila clavipes* genome highlights the diversity of spider silk genes and their complex expression. *Nature Genetics* 49: 895–903.
7. **Ballesteros J., Sharma P. (2019):** A critical appraisal of the placement of Xiphosura (Chelicerata) with account of known sources of phylogenetic error. *Systematic Biology*. 68 (6): 896–917.
8. **Bennett M.D. (1987):** Variation in genomic form in plants and its ecological implications. *New Phytologist* 106(Suppl): 177–200.
9. **Bennett M.D., Leitch I.J., Hanson L. (1998):** DNA amounts in two samples of Angiosperm weeds. *Annals of Botany* 82: 121–134.
10. **Breusegem S.Y., Clegg R.M., Loontjens F.G. (2002):** Base–sequence specificity of Hoechst 33258 and DAPI binding to five (A/T)<sub>4</sub> DNA sites with kinetic evidence for more than one high–affinity Hoechst 33258–AATT complex. *Journal of Molecular Biology* 315(5): 1049–61.
11. **Bureš P., Šmarda P., Hralová I. a kol. (2007):** Correlation between GC content and genome size in plants. *Cytometry A* 71A: 764.54
12. **Bureš P., Zedek F. (2014):** Holokinetic drive: centromere drive in chromosomes without centromeres. *Evolution* 68: 2412–2420.
13. **Butcher R.D.J., Whitfield W.G.F., Hubbard S.F. (2000):** Complementary sex determination in the genus *Diadegma* (Hymenoptera: Ichneumonidae). *Journal of Evolutionary Biology* 13: 593–606.
14. **Cao Z., Yu Y., Wu Y., Hao P., Di Z., He Y. a kol. (2013):** The genome of *Mesobuthus martensii* reveals a unique adaptation model of arthropods. *Nature Communications* 4: 2602.

15. **Camacho J.P.M. (2016):**“Genome size variation affects song attractiveness in grasshoppers: Evidence for sexual selection against large genomes”. *Evolution* (N. Y). 70: 1428–1430.
16. **Casper G. (1985):** Prey capture and stinging behavior in the Emperor Scorpion, *Pandinus Imperator* (koch) (scorpiones, scorpionidae). *The Journal of Arachnology* 13: 277–283.
17. **C. elegans Sequencing Consortium (1998):** Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology. *Science* 282: 2012–2018.
18. **Coddington J.A., Giribet G., Harvey M.S., Prendini L., Walter D.E. (2004):** Arachnida. pp. 296–318. In: Dacraft J., Donoghue M.J. (eds) *Assembling the tree of life*. New York, NY: Oxford University Press,.
19. **Crissman H.A., Hirons G.T. (1994):** Staining of DNA in Live and Fixed Cells. In: Darzynkiewicz Z., Robinson J.P., Crissman H.A. (eds). *Flow cytometry*, 2 nd edn. Part A. In: Wilson L., Matsudaira P. (eds). *Methods in Cell Biology*. San Diego: Academic Press Inc. 41: 195–210p.
20. **Dernburg A.F. (2001):** Here, There and Everywhere: Kinetochore fuction on holocentric chromosomes. *The Journal of Cell Biology*, 153: 33–38.
21. **De Vita R., Cavallo D., Eleuteri P., Dellomo G. (1994):** Evaluation of interspecific DNA content variation and sex identification in falconiformes and strigiformes by flow cytometric analysis. *Cytometry* 16: 346–350.
22. **Diaz M., Monica H., Luis A. G., Covadonga Q. (2010):** Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*. roč. 48, č. 3, s. 385–407.
23. **Doležel J. (1991):** Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemistry analysis* 2: 143–154.
24. **Doležel J., Greilhuber J., Meister A., Lysák M.A., Nardi L., Obermayer R., a Lucretti S. (1998):** Plant Genome Size Estimation by Flow Cytometry: Inter–laboratory Comparison. *Annals of Botany* 82: 17–26.
25. **Doležel J., Bartoš J., Voglmayr H., Greilhuber J. (2003):** Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry Part A*. 51 (2): 127–128.
26. **Doležel J., a Bartoš, J. (2005):** Plant DNA flow cytometry and estimation of nuclear genome size. *Annals of Botany* 95: 99–110.
27. **Doležel J., Greilhuber J., Suda J. (2007):** *Flow Cytometry with Plant Cells* (Weinheim: Wiley–VCH Verlag GmbH).
28. **Doležel J., Greilhuber J. (2010):** Nuclear genome size: Are we getting closer? *Cytometry Part A* 77: 635–642.
29. **Dunlop J.A., Webster M. (1999):** Fossil evidence, terrestrialization and arachnid phylogeny. *Journal of Arachnology* 27: 86–93.
30. **Eddy S. R. (2012):** The C–value paradox, junk DNA and ENCODE. *Current Biology* 22(21): 898–899.



31. **El-Shehawi A. M., Elseehy M. M. (2017):** Genome Size and Chromosome Number Relationship Contradicts the Principle of Darwinian Evolution from Common Ancestor. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, s5.
32. **Escudero M., Hipp A.L., Hansen T.F., Voje K.L., Luceño M. (2012):** Selection and inertia in the evolution of holocentric chromosomes in sedges (*Carex*, Cyperaceae). *New Phytol* 195:237–247.
33. **Ghiselli F., Milani L., Scali V., Passamonti M. (2007):** The *Leptynia hispanica* species complex (Insecta Phasmida): Polyploidy, parthenogenesis, hybridization and more. *Molecular Ecology* 1:, 4256–4268.
34. **Giribet G., Wheeler W.C. (2002):** On bivalve phylogeny: A high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. *Invertebrate Biology* 121:271–32
35. **Givan A. L. (2010):** Flow Cytometry: An Introduction. *Methods in Molecular Biology* 1–29.
36. **Godelle B., Cartier D., Marie D., Brown S.C., Siljak-Yakovlev S. (1993):** Heterochromatin study demonstrating the nonlinearity of fluorometry useful for calculating genomic base composition. *Cytometry* 14: 618–626.
37. **Gregory T.R., Shorthouse D.P. (2003):** Genome sizes of spiders. *Journal of Heredity* 94: 285–290.
38. **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: 133–146.
39. **Gregory T.R. (2022):** Animal Genome Size Database. <http://www.genomesize.com>.
40. **Greilhuber J., Temsch E.M., Loureiro J.C.M. (2007):** Nuclear DNA Content Measurement.
41. **Greilhuber J. (2008):** Cytochemistry and C-values: The Less-well-known World of Nuclear DNA Amounts. *Annals of Botany* 101: 791–804.
42. **Hanrahan S. J., Johnston J. S. (2011):** New genome size estimates of 134 species of arthropods. *Chromosome Research* 19(6): 809–823.
43. **Hardie D. C., Gregory T. R., Hebert P. D. N. (2002):** From Pixels to Picograms. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 50(6): 735–749.
44. **Hawley T. S., Hawley R.G. (2004):** Flow cytometry protocols 2nd ed., Humana press. New Jersey.
45. **Heppner J. B., Richman D. B., Naranjo S. E., Habeck D., Asaro C., Boevé J.L., Cave R. D. (2008):** Scorpions (Class Arachnida, Order Scorpiones). *Encyclopedia of Entomology*, 3310–3313.
46. **Howard R. J., Edgecombe G. D., Legg D. A., Pisani D., Lozano-Fernandez J. (2019):** Exploring the evolution and terrestrialization of scorpions (Arachnida: Scorpiones) with rocks and clocks. *Organisms Diversity & Evolution* 19: 71–86.
47. **Chapman A. (2006):** Numbers of living species in Australia and the world. Australian Government Department of the Environment and Heritage, Canberra.

48. **Choi B., Weiss–Schneeweiss H., Tensch E. M., So S., Myeong H.H., Jang T.S. (2020):** Genome Size and Chromosome Number Evolution in Korean Iris L. Species (Iridaceae Juss.). *Plants* 9(10): 1284.
49. **Jiao G., Zhu M. (2009):** Courtship and Mating in *Heterometrus petersii* (Thorell, 1876) (Scorpiones: Scorpionidae). *Euscorpius – Occasional Publications in Scorpiology*, 84: 1–5.
50. 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 – flow cytometry. *American Journal of Botany* 86: 609–613.
51. **Kelly D.J. (2018):** A Survey of Genome Size Diversity Within Scale Insects Hemiptera : Coccoidea) and Cockroaches and Termites (Blattodea). Guelph 2018. Diplomová práce. University of Guelph, Department of Integrative Biology. T. Ryan Gregory Ph.D. Dostupné z: <https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/handle/10214/12989>.
52. **Koutecký P. (2012):** Průtoková cytometrie v botanice. Laboratoř molekulární biologie rostlin. Přírodovědecká fakulta JU. Dostupné z: [http://botanika.bf.jcu.cz/laboratory/doc/FCM3\\_LaboratorniProtokoly.pdf](http://botanika.bf.jcu.cz/laboratory/doc/FCM3_LaboratorniProtokoly.pdf)
53. **Kovařík F. (2002):** Štíři. Nakladatelství Madagaskar, Pávov, 1998.
54. **Kovařík F., Košulič O., Štáhlavský F., Plíšková J., Dongkhamfu W., Wongprom P. (2015):** Two new species of *Euscorpiops* Vachon, 1980 from Thailand and Myanmar (Scorpiones: Euscorpiidae: Scorpioninae). *Annales Zoologici* 65: 109–122.
55. **Kovařík F., Lowe G., Štáhlavský F. (2018):** Three new *Chaerilus* from Malaysia (Tioman Island) and Thailand (Scorpiones: Chaerilidae), with a review of *C. cimrmani*, *C. sejnai*, and *C. tichyi*. *Euscorpius* 268: 1–27.
56. **Král J. (1994):** Holokinetic (holocentric) chromosomes. *Biologické listy*. 59: 191–217.
57. **Král J., Forman M., Kořínkova T. a kol. (2019):** Insights into the karyotype and genome evolution of haplogyne spiders indicate a polyploid origin of lineage with holokinetic chromosomes. *Scientific Reports* 9: 3001.
58. **Lee H.O., Davidson J.M., Duronio R.J. (2009):** Endoreplication : polyploidy with purpose. *Genes & development* 23: 2461–2477.
59. **Loureiro J., Rodriguez E., Doležel J., Santos C. (2006):** Flow Cytometric and Microscopic Analysis of the Effect of Tannic Acid on Plant Nuclei and Estimation of DNA Content. *Annals of Botany* 98: 515–527.
60. **Lucretti S., Gualberti G., Macas J., Doležel J. (1995):** Analysis and sorting of plant chromosomes using flow cytometry *Lettere GIC* 4: 39–51.
61. **Kron P., Suda J., Husband B.C. (2007):** Applications of Flow Cytometry to Evolutionary and Population Biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38: 847–876.
62. **Nath S., Mallick S.K., Jha S. (2014):** An improved method of genome size estimation by flow cytometry in five mucilaginous species of Hyacinthaceae. *Cytometry Part A* 85: 833–840.

63. **Noirot M., Barre P., Louarn J., Duperray C., Hamon S. (2002):** Consequences of stoichiometric error on nuclear DNA content evaluation in *Coffea liberica* var. *dewevrei* using DAPI and propidium iodide. *Annals of Botany* 89: 385–389.
64. **Mao Y., Zhang N., Nie Y., Zhang X., Li X., Huang Y. (2020):** Genome Size of 17 Species From Caelifera (Orthoptera) and Determination of Internal Standards With Very Large Genome Size in Insecta. *Frontiers in Physiology* 11: 567125.
65. **Marinov I. (2008):** Průtoková cytometrie v klinické hematologii: (minimum pro praxi). 2., přeprac. a rozš. vyd. Praha: Triton.
66. **Mattos V.F., Cella D.M., Carvalho L.S., Candido D.M., Schneider M.C. (2013):** High chromosome variability and the presence of multivalent associations in buthid scorpions. *Chromosome Research* 21(2): 121–136.
67. **Mefford H., vandenEngh G., Friedman C., Trask B.J. (1997):** Analysis of variation in chromosome size among diverse human populations by bivariate flow karyotyping. *Human Genetics* 100: 138–144.
68. **Melters D.P., Paliulis L.V., Korf I.F., Chan S.W.L. (2012):** Holocentric chromosomes: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. *Chromosome Research* 20: 579–593.
69. **Monge Nájera J. (2019):** Scorpion body size, litter characteristics, and duration of the life cycle (Scorpiones). *UNED Research Journal* 11(2): 102–104.
70. **Mortimer F. C. (2000):** Flow Cytometric Monitoring of Antibiotic-Induced Injury in *Escherichia coli* Using Cell-Impermeant Fluorescent Probes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Washington: American Society for Microbiology 44: 676–681
71. **Novotný T. (2012):** Karyotypová diferenciacie štírů rodu *Euscorpius* (Scorpiones: Euscorpiidae) v Evropě. Diplomová práce, Katedra zoologie PŘF UK, Praha. 63 strán.
72. **Ojanguren-Affilastro A.A., Adilardi R.S., Cajade R., Ramírez M.J., Ceccarelli F.S., Mola L.M. (2017):** Multiple approaches to understanding the taxonomic status of an enigmatic new scorpion species of the genus *Tityus* (Buthidae) from the biogeographic island of Paraje Tres Cerros (Argentina). *PLoS One* 12, e0181337.
73. **Oliver J.H., Nelson B.C. (1967):** Mite chromosomes: an exceptionally small number. *Nature* 214: 809.
74. **Opatová V., Arnedo M.A. (2014):** Spiders on a hot volcanic roof: colonisation pathways and phylogeography of the Canary Islands endemic trap-door spider *Titanidiops canariensis* (Araneae, Idiopidae). *PLoS One* 9, e115078.
75. **Otto F. (1990):** DAPI staining of fixed cells for high-resolution flow cytometry of nuclear DNA. *Methods in Cell Biology*. Vol. 33. Academic Press, New York. 105–110.
76. **Ormerod M.G., Imrie P.R. (1990):** Flow Cytometry. In: Walker J.M., Pollard J.W., Walker J.M. (eds) *Animal Cell Culture*. *Methods in Molecular Biology*, vol 5. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-150-0:543>

77. **Parmakelis A., Kotsakiozi P., Stathi I., Poulikarakou S., Fet V. (2013):** Hidden diversity of *Euscorpis* (Scorpiones: Euscorpiidae) in Greece revealed by multilocus species–delimitation approaches. *Biological Journal of the Linnean Society* 110: 728–748.
78. **Pandit M. K., White S. M., Pocock M. J. O. (2014):** The contrasting effects of genome size, chromosome number and ploidy level on plant invasiveness: a global analysis. *New Phytologist* 203(2): 697–703
79. **Pekarčíková L., Knopfová L., Ondroušková E., Smarda J. (2014):** Využití průtokové cytometrie pro analýzu mitochondriální buněčné smrti [The use of flow cytometry for analysis of the mitochondrial cell death]. *Klinická Onkologie* 27 (Suppl 1): 15–21.
80. **Polis G.A. (1990):** The biology of scorpions. Stanford University Press, Stanford, CA.
81. **Polis G.A., Culin J., Clarkson J. D., Gertsch W. J. (2020):** "scorpion". *Encyclopedia Britannica*.
82. **Praça-Fontes M.M., Carvalho C.R., Clarindo W.R. (2011):** C–value reassessment of plant standards: an image cytometry approach. *Plant Cell Reports* 30: 2303–2312.
83. **Prendini L. (2000):** Phylogeny and classification of the superfamily Scorpionoidea Latreille 1802 (Chelicerata, Scorpiones): An exemplar approach. *Cladistics* 16:1–78.
84. **Rein J.O. (2018):** The scorpion files. <http://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/>. Accessed 1st June 575 2019.
85. **Rasmussen S. W. (1977):** Meiosis in *Bombyx mori* females. *Philosophical Transactions of the Royal Society London* 277: 343–350.
86. **Rodrigues A.S.B., Silva S.E., Pina-Martins F., Loureiro J., Castro M., Gharbi K., Johnson K.P., Dietrich C.H. a kol. (2016):** Assessing genotype–phenotype associations in three dorsal colour morphs in the meadow spittlebug *Philaenus spumarius* (L.) (Hemiptera: Aphrophoridae) using genomic and transcriptomic resources. *BMC Genetics* 17: 144.
87. **Rowley T. (2018):** Flow Cytometry – A Survey and the Basics (online). (cit. 2018–05–07). Dostupné z: <http://www.labome.com/method/Flow-Cytometry-A-Survey-and-the-Basics.html>
88. **Řepková J. (2013):** Struktura rostlinného genómu. Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita. Dostupné z: <https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js13/genetika/web/pages/01-struktura-rostlinneho-genomu.html>
89. **Řezáč M., Arnedo M. A., Opatova V., Musilová J., Řezáčová V., Král J. (2018):** Taxonomic revision and insights into the speciation mode of the spider *Dysdera erythrina* species–complex (Araneae: Dysderidae): sibling species with sympatric distributions. *Invertebrate Systematics* 32(1): 10.
90. **Sadhu A., Bhadra S., Bandyopadhyay M. (2016):** Novel nuclei isolation buffer for flow cytometric genome size estimation of Zingiberaceae: A comparison with common isolation buffers. *Annals of Botany* 118: 1057–1070.

91. **Sadílek D., Urfus T., Vilímová J., Hadrava J., Suda J. (2019):** Nuclear genome size in contrast to sex chromosome number variability in the human bed bug, *Cimex lectularius* (Heteroptera: Cimicidae). *Cytometry Part A* 95(7): 746v756.
92. **Sakamoto Y., Zacaro A. A. (2009):** LEVAN, an ImageJ Plugin for Morphological Cytogenetic Analysis of Mitotic and Meiotic Chromosomes. Initial Version. Dostupné z: <http://rsbweb.nih.gov/ij/>
93. **Sanggaard K., Bechsgaard J., Fang X., Duan J., Dyrland T., Gupta, V. a kol. (2014):** Spider genomes provide insight into composition and evolution of venom and silk. *Nature Communications* 5: 3765.
94. **Santibáñez-López C.E., González-Santillán E., Monod L., Sharma P.P. (2019):** Phylogenomics facilitates stable scorpion systematics: Reassessing the relationships of Vaejovidae and a new higher-level classification of Scorpiones (Arachnida). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 135: 22–30.
95. **Ojanguren-Affilastro A., Raven E. J., Pinto-Da-Rocha R., Zvik Y., Gavish-Regev E., Sharma P.P. (2020):** Phylogenomics of scorpions reveal a co-diversification of scorpion mammalian predators and mammal-specific sodium channel toxins. *BioRxiv*. 11.06.372045.
96. **Selden P. A., Shear W. A., Bonamo P. M. (1991):** A spider and other arachnids from the Devonian of New York, and reinterpretations of Devonian Araneae. *Palaeontology* 34: 241–281.
97. **Shapiro H.M. (2003):** Practical flow cytometry. 4th edn., Hoboken: John Wiley & Sons. 681p.
98. **Sharaf K., Bureš P., Horová L., Pavlíček T., Nevo E. (2008):** Distribution of abundance and genome size variability in the grain beetle *Oryzaephilus surinamensis* (Linnaeus, 1758) (Coleoptera: Silvanidae). *Zoology in the Middle East* 45: 79–89.
99. **Sharma P. P., Fernandez R., Esposito L. A., Gonzalez-Santillan E., Monod L. (2015):** Phylogenomic resolution of scorpions reveals multilevel discordance with morphological phylogenetic signal. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 282(1804).
100. **Shanahan C.M. (1989):** Cytogenetics of Australian scorpions. II. Chromosome polymorphism in species of *Urodacus* (family Scorpionidae). *Genome* 32: 890–900.
101. **Shi C.-M., Huang Z.S., Wang L., He L.J., Hua Y.P., Leng L., Zhang D.X. (2007):** Geographical distribution of two species of *Mesobuthus* (Scorpiones, Buthidae) in China: Insights from systematic field surveys and predictive models. *Journal of Arachnology* 35(2): 215–226.
102. **Schneider M.C., Zacaro A.A., Pinto-da-Rocha R., Candido D.M., Cella D.M. (2009):** Complex meiotic configuration of the holocentric chromosomes: the intriguing case of the scorpion *Tityus bahiensis*. *Chromosome Research* 17: 883–898.
103. **Schneider M.C., Mattos V.F., Cella D.M. (2022):** The scorpion cytogenetic database. Available in [www.arthropodacytogenetics.bio.br/scorpiondatabase](http://www.arthropodacytogenetics.bio.br/scorpiondatabase)

104. **Schrempf A., Aron S., Heinze J. (2006):** Sex determination and inbreeding depression in an ant with regular sib-mating. *Heredity (Edinb)* 97: 75–80.
105. **Sissom W. D. (1990):** Systematics of *Vaejovis dugesi*, new status Pocock, with descriptions of two new related species (Scorpiones, Vaejovidae). *Southwestern Naturalist* 35(1): 47–53.
106. **Sissom D.V., Hendrixon B.F. (2005):** Scorpion biodiversity and patterns of endemism in Northern Mexico. Pp. 122–137. In: Carton, J.–L. E., Ceballos, G. & Felger, R.S. (eds): *Biodiversity, Ecosystems, and Conservation in Northern Mexico*. Oxford, New York.
107. **Stockmann R., Ythier E., Fet V. (2010):** *Scorpions of the world*. N.A.P. Editions, Verrières-le-Buisson.
108. **Suda J., Trávníček J. (2006):** Estimation of relative nuclear DNA content in dehydrated plant tissues by flow cytometry – *Current Protocols in Cytometry*. John Wiley & Sons.
109. **Suda J., Leitch I.J. (2010):** The quest for suitable reference standards in genome size research. *Cytometry Part A* 77: 717–720.
110. **Suda J. (2011):** Průtoková cytometrie a její využití v botanice. *Zprávy České Botanické Společnosti* 21–42.
111. **Šmarda P., Bureš P., Horová L., Foggi B., Rossi G. (2008):** Genome size and GC content evolution of *Festuca*: Ancestral expansion and subsequent reduction. *Annals of Botany* 101: 421–433.
112. **Šmarda P., Bureš P. (2012):** The variation of base composition in plant genomes. In: *Plant genome diversity*, vol. 1. Vienna: Springer, 209–235.
113. **Štundlová J. (2019):** Mechanismy karyotypové evoluce u štírů (Arachnida: Scorpiones). Dizertační práce, Katedra zoologie PŘF UK, Praha. 199 strán.
114. **Štáhlavský F. (2014):** The pseudoscorpion cytogenetic database. Available in [www.arthropodacytogenetics.bio.br/pseudoscorpiondatabase](http://www.arthropodacytogenetics.bio.br/pseudoscorpiondatabase)
115. **Štáhlavský F., Nguyen P., Sadílek D., Štundlová J., Just P., Haddad C. R., Kovařík F. (2020a):** Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of buthid scorpions (Chelicerata: Arachnida). *Biological Journal of the Linnean Society* 131: 547–565.
116. **Štáhlavský F., Kovařík F., Stockmann M., Opatova V. (2020b):** Karyotype evolution and preliminary molecular assessment of genera in the family Scorpiopidae (Arachnida: Scorpiones). *Zoology* 125882.
117. **Traut W. (1976):** Pachytene mapping in the female silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera). *Chromosoma* 58: 275–284.
118. **Tsurusaki N. (2007):** Cytogenetics. Pp. 266–279. In: Pinto-da-Rocha, R., Machdo, G. & Giribet, G. (eds): *Harvestmen: The Biology of Opiliones*. Harvard University Press, Cambridge.
119. **Ullerich F.H. (1961):** Achiastmatische spermatogenese bei der skorpionsfliege *Panorpa* (Mecoptera). *Chromosoma* 12: 215–232.

120. **Veleba A., Šmarda P., Zedek F., Horová L., Šmerda J., Bureš P. (2016):** Evolution of genome size and genomic GC content in carnivorous holokinetics (Droseraceae). *Annals of Botany* 119(3): 409–416.
121. **Ward M. J., Ellsworth S. A., Rokyta D. R. (2018):** Venom–gland transcriptomics and venom proteomics of the Hentz striped scorpion ( *Centruroides hentzi* ; Buthidae) reveal high toxin diversity in a harmless member of a lethal family. *Toxicon* 142: 14–29.
122. **Watson J.V. (1991):** Introduction to flow cytometry. Cambridge: Cambridge University Press. 443p.
123. **Weeks A.R., Marec F., Breeuwer J.A.J. (2001):** A mite species that consist entirely of haploid females. *Science* 292: 2479–2482.
124. **Yorke H. L. (2020):** Exploring genome size diversity in arachnid taxa. Master's thesis, University of Guelph, Ontario. 103 p.
125. **Zaragoza J.A., Šťáhlavský F. (2008):** A new *Roncus* species (Pseudoscorpiones: Neobisiidae) from Montseny Natural Park Catalonia, Spain), with remarks on karyology. *Zootaxa* 1693: 27–40.
126. **Zedek F., Bureš P. (2016):** Absence of positive selection on CenH3 in *Luzula* suggests that holokinetic chromosomes may suppress centromere drive. *Annals of Botany* 118: 1347–1352.

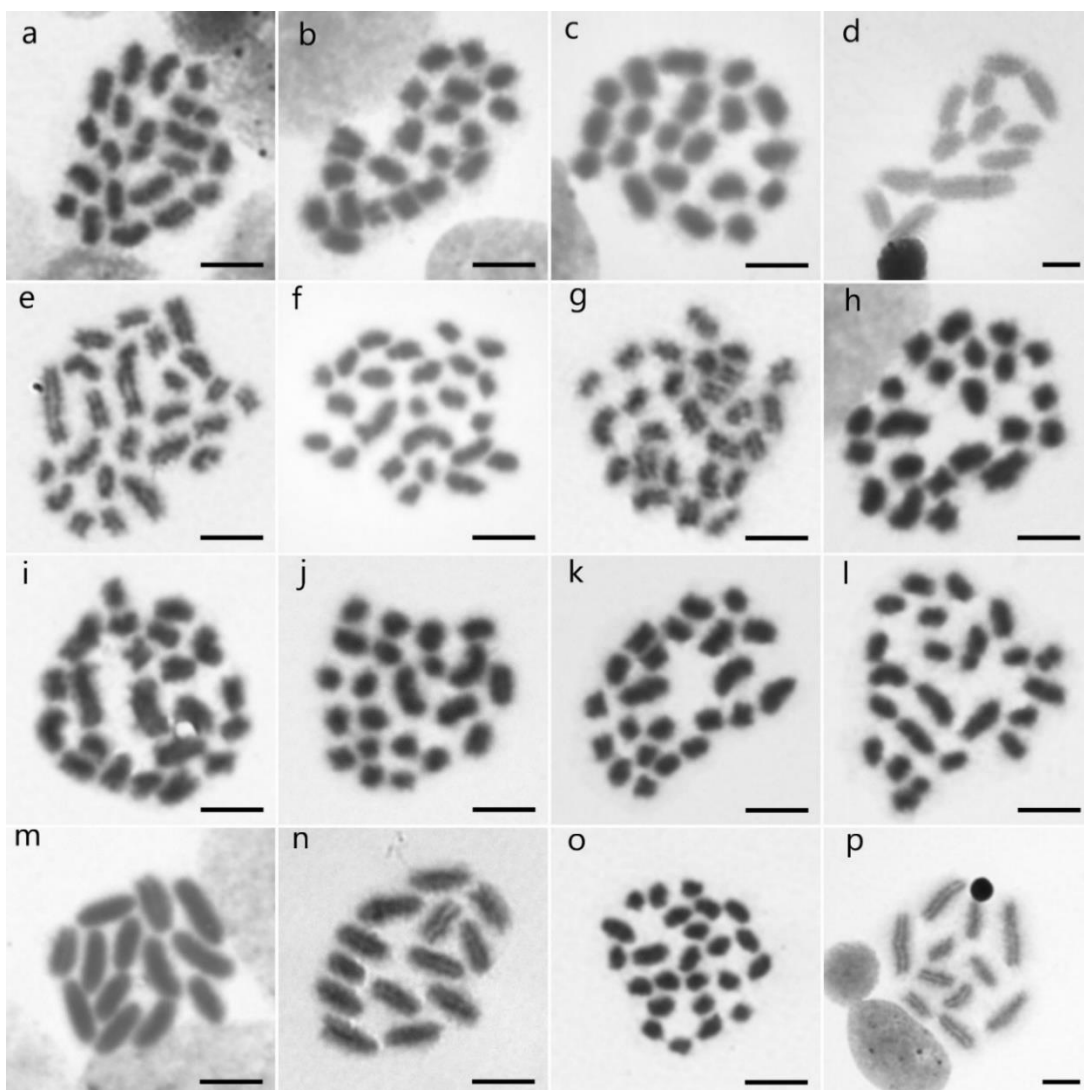
### Databáze

[www.genomesize.com](http://www.genomesize.com)

[www.wsc.nmbe.ch](http://www.wsc.nmbe.ch)

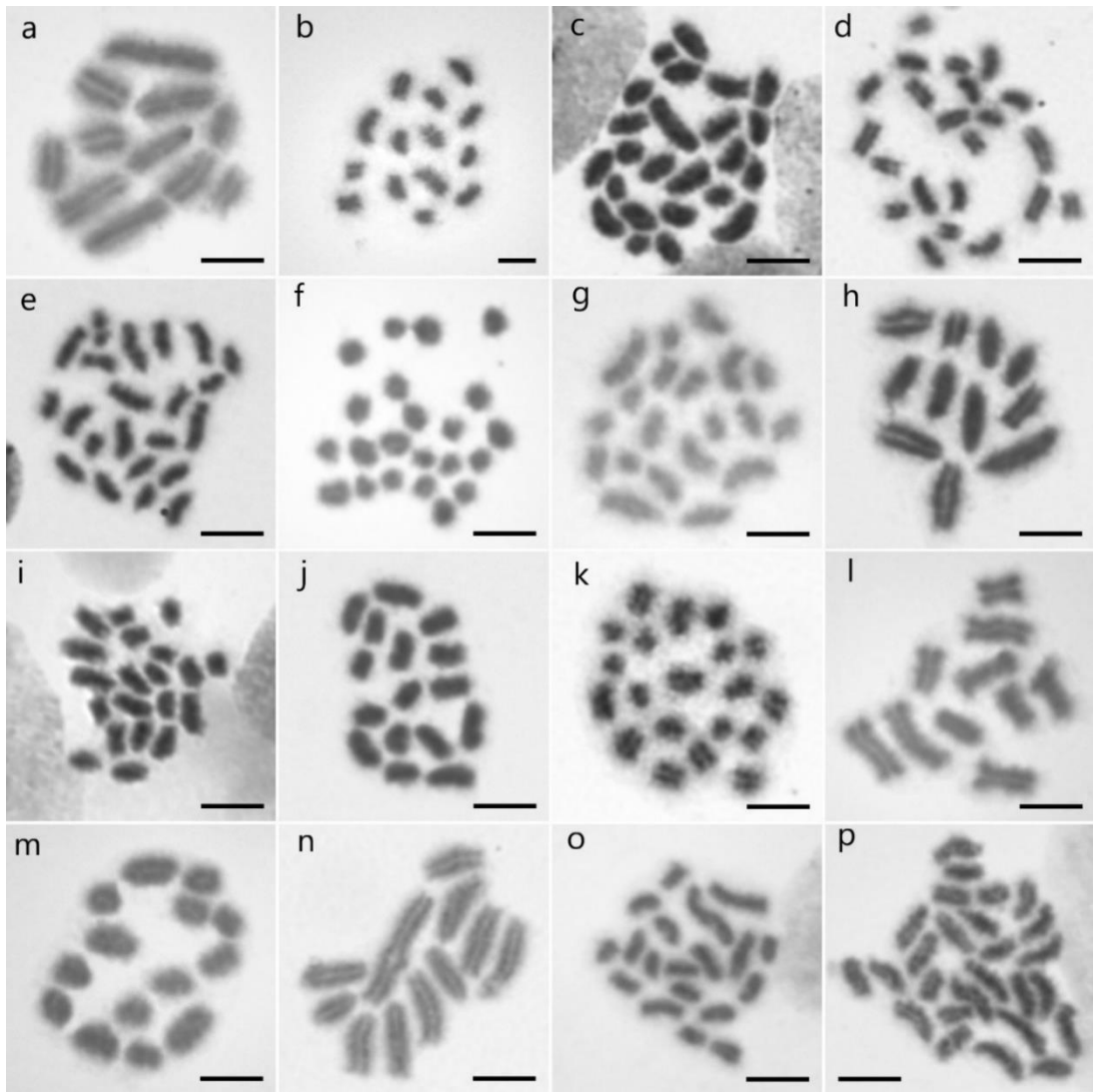
[www.arthropodacytogenetics.bio.br/scorpionsdatabase/index.html](http://www.arthropodacytogenetics.bio.br/scorpionsdatabase/index.html)

## 11. Přílohy

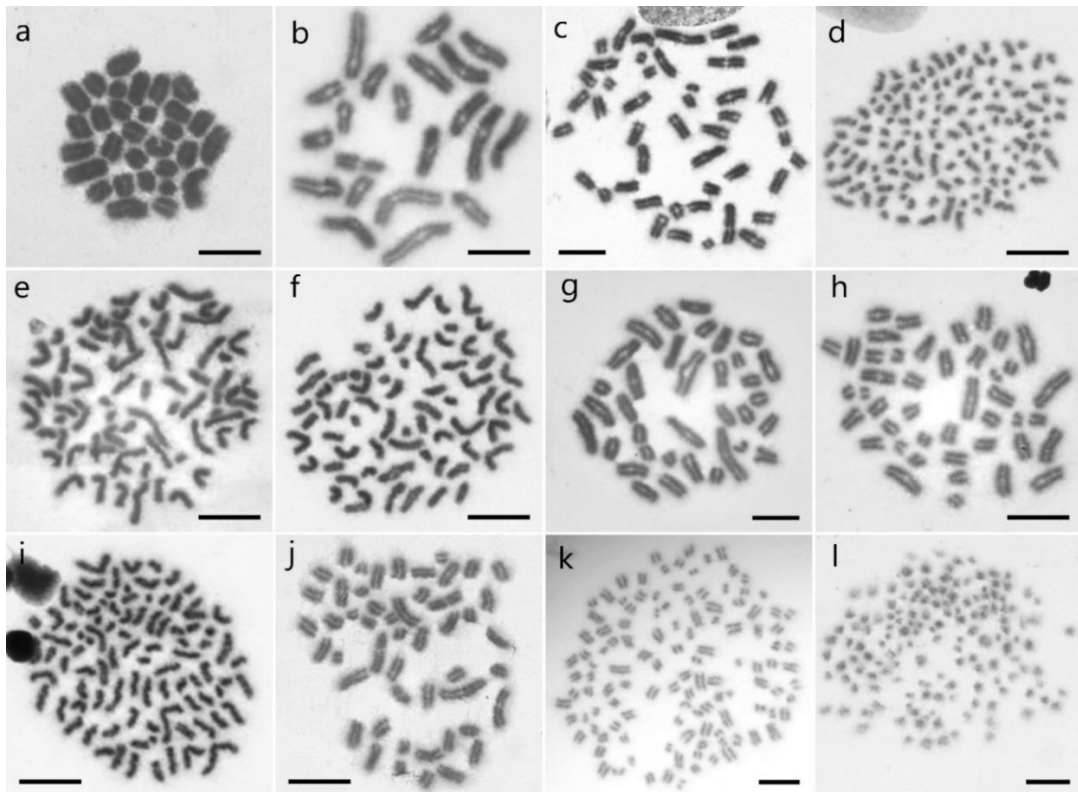


Příloha 1: Chromozómy čeladi Buthidae. Mitotická metafáza (a–c, e–l, o), postpachytene (d, m, n, p).  
**a)** *Aegeobuthus cyprius* ( $2n=20$ ); **b)** *Aegeobuthus galianoi* ( $2n=20$ ); **c)** *Aegeobuthus gibbosus* ( $2n=20$ );  
**d)** *Androctonus cholistanus* ( $2n=24$ ); **e)** *Androctonus* sp. z Moroka ( $2n=24$ ); **f)** *Androctonus* sp. z Ománu  
( $2n=24$ ); **g)** *Buthacus leptochelys* ( $2n=26$ ); **h)** *Buthus elongatus* ( $2n=22$ ); **i)** *Buthus ibericus* ( $2n=22$ );  
**j)** *Buthus paris* ( $2n=22$ ); **k)** *Buthus* sp. ( $2n=22$ ); **l)** *Buthus* sp. ( $2n=22$ ); **m)** *Centruroides flavopiceus* ( $2n=26$ );  
**n)** *Centruroides lucidus* ( $2n=26$ ); **o)** *Centruroides* sp. ( $2n=24$ ); **p)** *Compsobuthus maidroni* ( $2n=22$ ).  
Mierka = 5  $\mu\text{m}$ .

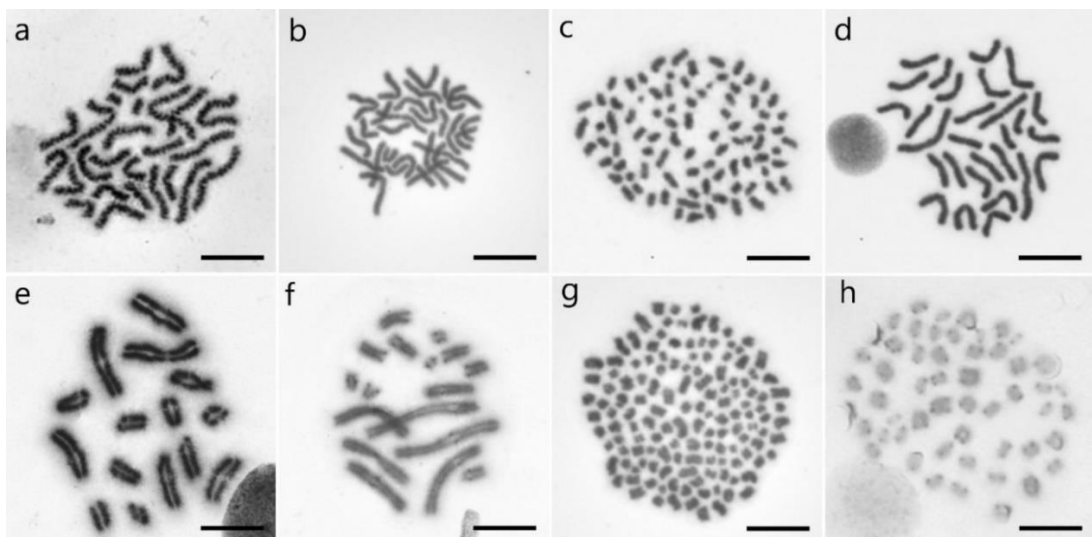




**Příloha 2: Chromozómy čeledi Buthidae. Mitotická metafáza (b–g, i–k, m, o, p), postpachytene (a, h, l, n, p). a) *Hottentotta pakistan* (2n=22); b) *Hottentotta salei* (2n=14); c) *Hottentotta* sp. (2n=24); d) *Leirurs somalicus* (2n=22); e) *Leirurs* sp. (2n=22); f) *Odonthobuthus brevidigitatus* (2n=22); g) *Parabuthus capensis* (2n=20); h) *Parabuthus granimanus* (2n=22); i) *Parabuthus granulatus* (2n=20); j) *Parabuthus leiosoma* (2n=16); k) *Parabuthus schlechteri* (2n=20); l) *Rhopalurus* sp. (2n = 20); m) *Tityus obscurus* (2n=14); n) *Tityus silvestris* (2n=22); o) *Tityus* sp. (2n=19); p) *Trypanothacus buettikeri* (2n=26). Mierka = 5  $\mu$ m.**



Příloha 3: Chromozómy čeladi *Euscorpidae*. Mitotická metafáza (d–f, i, k, l), postpachytene (b, c, g, h, j). **a**) *Euscorpius aquilejensis* ( $2n=61$ ); **b**) *Euscorpius calabrae* ( $2n=42$ ); **c**) *Euscorpius deltschevi* ( $2n=90$ ); **d**) *Euscorpius flavicaudis* ( $2n=126$ ); **e**) *Euscorpius solegladi* ( $2n=68$ ); **f**) *Euscorpius* sp. ( $2n=66$ ); **g**) *Euscorpius* sp. ( $2n=70$ ); **h**) *Euscorpius* sp. ( $2n=88$ ); **i**) *Euscorpius* sp. ( $2n=92$ ); **j**) *Euscorpius* sp. ( $2n=100$ ); **k**) *Euscorpius* sp. ( $2n=118$ ); **l**) *Megacormus gertschi* ( $2n = 138$ ). Mierka = 10  $\mu\text{m}$ .



Příloha 4: Chromozómy čeladí *Caraboctonidae* (a, b), *Hormuridae* (c, d), *Iuridae* (e, f) a *Scorpiopidae* (g, h). Mitotická metafáza (a–d, g, h), postpachytene (e, f). **a**) *Hadruroides juanchaparroi* ( $2n=26$ ); **b**) *Hadruroides* sp. ( $2n=28$ ); **c**) *Hadogenes* sp. ( $2n=86$ ); **d**) *Opisthacanthus* sp. ( $2n=28$ ); **e**) *Iurus dekanum* ( $2n=30$ ); **f**) *Iurus dufourea* ( $2n=34$ ); **g**) *Heterometrus missorensis* ( $2n=138$ ); **h**) *Heterometrus swammerdami* ( $2n=106$ ). Mierka = 10  $\mu\text{m}$ .