

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovateli povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Klára Jílková

Evolutione vybraných karyotypových znaků u tetrapulmonátních pavoukovců

Evolution of selected karyotype characters in tetrapulmonate arachnids

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Jiří Král, Dr.

Praha, 2013

Prohlášení:

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

V Praze, 15.8. 2013

Podpis

Poděkování:

V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Jiřímu Královi, Dr., za veškerou trpělivost a ochotu se mi věnovat při odborném vedení mé práce. Dále bych chtěla poděkovat členům laboratoře (Mgr. Martin Forman, Ing. Jana Musilová, Ivalú M. Ávila Herrera, Azucena C. Reyes Lerma) za pomoc v průběhu experimentální fáze.

Moje velké díky patří Mgr. Alexandru Semberovi (Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AVČR, Liběchov) za odborné vedení při aplikaci metod CGH a RNDr. Petru Nguyenovi (Entomologický ústav, AVČR, České Budějovice) za výrobu sond pro FISH. V poslední řadě bych chtěla poděkovat následujícím kolegům, kteří pomáhali při sběru, poskytli nebo určili materiál: S. Huber (Oberuhlingen, Německo), V. Šejna (Praha), P. Weygoldt (Univerzita ve Freiburgu, Německo), P. Just (Univerzita Karlova), M. Seiter (Univerzita ve Vídni, Rakousko), J. Murienne (Univerzita v Toulouse, Francie) a J. G. Palacios Vargas a jeho spolupracovníci (UNAM, Mexiko).

Diplomová práce vznikala v letech 2010 – 2013 v rámci grantového projektu GAČR 206/08/0813

Abstrakt

Pavoukovci nejsou z cytogenetického hlediska příliš probádanou skupinou. Dosavadní studie naznačují vysokou diverzitu karyotypů i způsobů určení pohlaví pavoukovců. Předložená práce se zabývá evolucí pohlavních chromozomů, nukleolárních organizátorů (NOR) a telomerických repetic u tetrapulmonátních pavoukovců, a to především u vývojově původnějších skupin. Pohlavní chromozomy se nám podařilo detekovat u dvou řádů. Detekcí NORů u většího souboru druhů byla získána data podporující hypotézu, že ancestrální karyotyp pavoukovců obsahoval NOR na jednom páru autozomů. U některých skupin pedipalpidů docházelo v evoluci ke zvyšování počtu NORů. NORy se nachází u většiny tetrapulmonátních pavoukovců v terminálních nebo subterminálních oblastech. U zástupců všech tetrapulmonátních pavoukovců s výjimkou pavouků jsme potvrdili výskyt „hmyzího“ telomerického motivu. S výjimkou jednoho druhu jsme neprokázali přítomnost intersticiálních telomerických repetic.

Klíčová slova: pavoukovci, meióza, pohlavní chromozomy, telomery, nukleolární organizátor, heterochromatin

Abstract

The class Arachnida is not thoroughly explored from the cytogenetic point of view. Previous studies suggest a high diversity of karyotypes and sex determination in arachnids. This study deals with the evolution of sex chromosomes, nucleolar organizer regions (NOR), and telomeric repeats in the tetrapulmonate clade of arachnids, particularly in groups of ancient origin. Sex chromosomes were detected in two orders. Detection of NORs in a large set of species supports the hypothesis that the ancestral karyotype of arachnids contained NOR on one pair of autosomes only. The number of NORs has increased during the evolution of some groups of Pedipalpi. The NORs are located in terminal or subterminal chromosomal regions in most tetrapulmonates. The occurrence of the “insect“ telomeric motif was confirmed in majority of tetrapulmonates. Interstitial telomeric repeats were not detected with the exception of one species.

Keywords: arachnids, meiosis, sex chromosomes, telomeres, nucleolar organizer, heterochromatin

Obsah

1. Úvod	8
2. Cíle práce	9
3. Přehled literatury	10
3.1. Tetrapulmonátní pavoukovci	10
3.2. Pohlavní chromozomy	14
3.2.1. Pohlavní chromozomy u pavouků	16
3.2.2. Pohlavní chromozomy dalších skupin pavoukvců	17
3.3. Nukleolární organizátory a rDNA	17
3.3.1. Stavba jadérka	17
3.3.2. Nukleolární organizátory a rDNA	18
3.3.3. Funkce jadérka	21
3.3.4. Dynamika jadérka během mitózy a meiózy.....	22
3.4. Telomery.....	23
3.4.1. Stavba a funkce telomerické DNA.....	23
4. Materiál a metody	29
4.1. Materiál	29
4.2. Metody	30
4.2.1. Výroba chromozomových preparátů	30
4.2.2. Pruhovací techniky	31
4.2.3. Fluorescenční hybridizace in situ (FISH)	32
5. Výsledky.....	39
5.1. Řád bičovci (Amblypygi) (THORELL 1883)	39
5.1.1. Čeleď Phryniidae (BLANCHARD 1899).....	39
5.1.2. Čeleď Phrynichidae (SIMON 1892).....	49
5.1.3. Čeleď Charontidae (SIMON 1892).....	54
5.2. Řád bičnatci (Uropygi)	55
5.2.2. Čeleď Thelyphonidae (LUCAS 1835).....	55
5.3. Řád krátkochvosti (Schizomida)	58
5.4. Řád roztočovci (Ricinulei)	59
5.5. Řád pavouci (Araneae)	60
5.5.1. Podřád sklípkoši (Mesothelae)	60
5.5.2 Podřád dvouplicní (Araneomorphae).....	64
6. Diskuze.....	66

6.1. Diploidní počty a morfologie chromozomů.....	66
6.2. Pohlavní chromozomy	68
6.3. Nukleolární organizátory.....	71
6.4. Telomerické repetice.....	75
7. Souhrn	76
Seznam literatury	78

Seznam zkratek

A - akrocentrický chromozom, Levanova klasifikace

BSA - hovězí sérový albumin (z angl. bovine serum albumine), protein se širokým využitím v mol. biologických laboratořích, mj. i jako blokátor mnoha reakcí (blokuje volná vazebná místa reaktantů)

C pruh – vizualizovaný usek konstitutivního heterochromatinu

CGH – (z angl. comparative genomic hybridization), metoda používaná pro odhalení rozdílů mezi dvěma genomy, sondou jsou dvě celogenomové DNA

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindol; fluorescenční barvivo vážící se na DNA (přednostně na AT páry)

Denhardtovo činidlo - blokátor nespecifického nasednutí sondy nebo cytoplazmatických proteinů

DFC - denzní fibrilární komponenta jadérka

dNTP – směs čtyř deoxyribonukleosidtrifosfátů (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)

Entelegynní pavouci – evolučně nejpokročilejší skupina pavouků, do níž patří většina čeledí. Skupina je definována podle utváření samičího kopulačního orgánu

ETS - (z angl. external transcribed spacer) - mezerník v transkripční jednotce rRNA

FC - fibrilární centra jadérka

FISH – Fluorescenční *in situ* hybridizace

GC - granulární komponenta jadérka

IGS (z angl. intergenic spacer) - mezerník v transkripční jednotce rRNA

ITS - (z angl. internal transcribed spacer) - mezerník v transkripční jednotce rRNA

M - metacentrický chromozom, Levanova klasifikace

NOR – (z angl. nucleolus organizer region) - nukleolární organizátor jadérka. Část chromozomu, v níž se nachází geny pro rRNA (kromě genů pro 5S rRNA)

PBS – pufr obsahující NaCl, KH₂PO₄, Na₂HPO₄.12H₂O

PCR - polymerázová řetězová reakce, metoda amplifikace DNA

rDNA – úseky DNA, které kódují geny pro ribozomální RNA

SM - submetacentrický chromozom, Levanova klasifikace

SSC - tzv. SSC pufr (1 x SSC obsahuje 0,15 mol/l chloridu sodného, 0,015 mol/l citrátu sodného)

ST - subtelocentrický chromozom, Levanova klasifikace

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

1. Úvod

V rámci kmene členovců v průběhu posledního desetiletí prudce vzrostl počet cytogenetických studií. Nicméně u některých skupin, mezi které patří i pavoukovci, existuje stále málo informací o jejich cytogenetice. Pavoukovci jsou starobylou skupinou s fosilními nálezy pocházejícími již z prvohor (SELDEN 1993). Jedná se o vysoce diverzifikovanou skupinu živočichů s více jak 97 000 popsány druhy rozdělenými do 13 řádů (HARVEY 2002). Z cytogenetického hlediska je nejvíce prostudován řád pavouků, následují roztoči, sekáči, štíři a štírci. U ostatních řádů jsou k dispozici jen velmi skrovné informace o jejich karyotypech nebo tyto informace zcela chybí. Ze získaných dat je zcela jasné, že pavoukovci mají velmi rozrůzněné karyotypy. Diploidní počty jejich chromozomů se pohybují v rozmezí 4 – 175 (OLIVER & NELSON; SHANAHAN 1989). Z hlediska morfologie se u nich nacházejí chromozomy jak monocentrické, tak i holocentrické. Co se týče způsobu určení pohlaví, existují zde skupiny s chromozomovým určením typu *Drosophila* i *Abraxas*. Na druhou stranu jsou hojné také skupiny, u nichž nebyly pohlavní chromozomy detegovány, často se vyskytují různé formy partenogeneze (OLIVER 1977; SHANAHAN 1989; KRÁL et al. 2008).

V této práci se zabývám zástupci tetrapulmonátních pavoukovců, tedy bičovci, bičnatci, krátkochvosty, roztočovci a pavouky. V rámci pavouků se věnuji hlavně nejprimitivnějším žijícím zástupcům, podřádu sklípkošů. Tito pavouci jsou známi již ze svrchního karbonu. Starobylými skupinami jsou i bičovci, bičnatci a roztočovci, kteří jsou známi rovněž od svrchního karbonu. Mezi karyotypové znaky, na které se zaměřuji, patří nukleolární organizátory, telomerické repetice a pohlavní chromozomy. Studium vývojově původnějších skupin pavoukovců je důležité, protože nám může ukázat, jak se tyto znaky v průběhu evoluce vyvíjely a např. i zodpovědět otázku, jakým způsobem mohl vzniknout složitý systém pohlavních chromozomů u řádu pavouků.

2. Cíle práce

Diplomová práce je zaměřena na evoluci nukleolárních organizátorů, telomerických repetic (výskyt „hmyzího“ motivu) a pohlavních chromozomů u tetrapulmonálních pavoukoců.

Prvním z cílů práce bylo detekovat nukleolární organizátory pomocí fluorescenční hybridizace in situ, sledovat jejich počty a lokalizaci a porovnat výsledky s daty, které byly v minulosti získány metodou stříbření. Z údajů, které jsem měla k dispozici, jsem se snažila stanovit hlavní směry evoluce NORů, údaje byly také porovnány s dostupnými daty z ostatních skupin pavoukoců.

Druhým cílem práce bylo zjistit distribuci telomerického motivu (TTAGG)_n (taktéž metodou fluorescenční hybridizace in situ) v rámci tetrapulmonálních pavoukoců. Kromě toho jsem se zaměřila na výskyt intersticiálních telomerických repetic. U řádu bičovců je možné předpokládat zvýšenou míru chromozomových přestaveb, teoreticky by tedy bylo možné, že u některých druhů zůstanou intersticiální repetice v genomu zachovány.

Třetím cílem byla detekce pohlavních chromozomů metodou CGH u vybraných tetrapulmonátů. Poznatky o evoluci pohlavních chromozomů u různých skupin tetrapulmonátů by mohly pomoci vysvětlit, jakým způsobem vznikly složité pohlavní chromozomy u řádu pavouků.

Pokud to bylo možné, byl u dosud nekaryotypovaných druhů sestaven a popsán karyotyp.

3. Přehled literatury

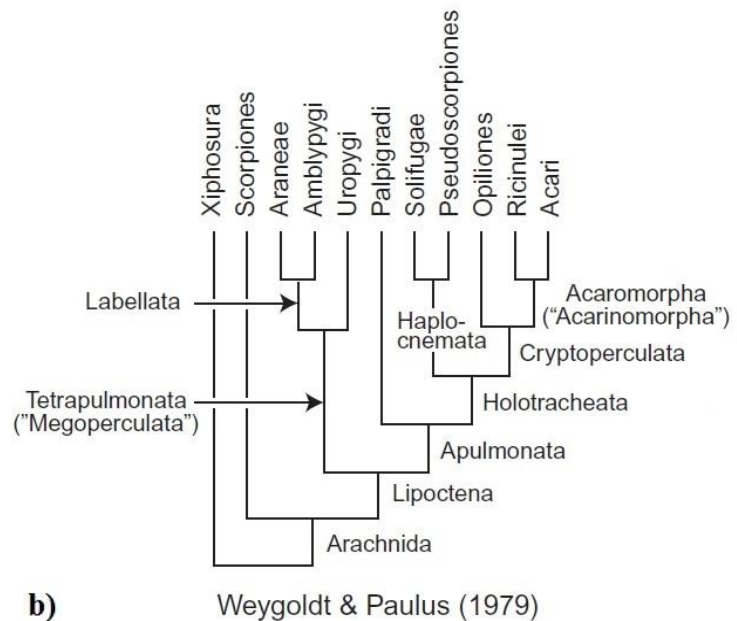
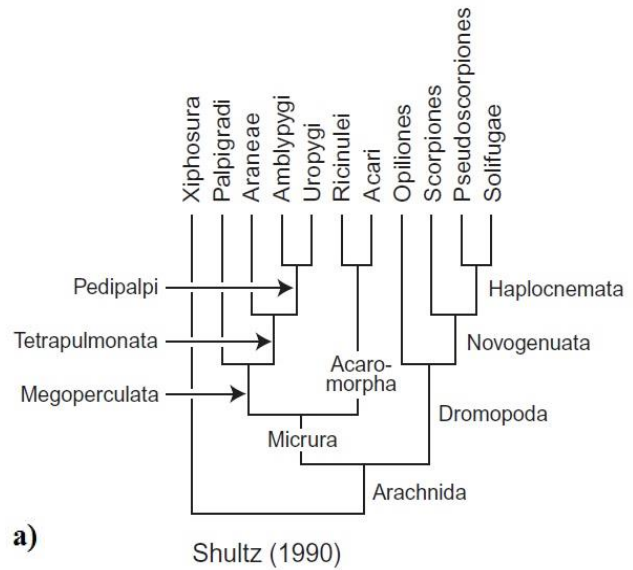
3.1. Tetrapulmonátní pavoukovci

Jak bylo řečeno v úvodu, moje diplomová práce je zaměřena na cytogenetiku tetrapulmonátních pavoukovců (Tetrapulmonata). Tito pavoukovci dostali svůj název podle toho, že mají dva páry plicních vaků. Dalšími společnými znaky tetrapulmonátů jsou dvoučlánkové chelicery umístěné ventrolaterálně a neobvyklé uspořádání mikrotubulů uvnitř bičíku jejich spermií (FAHREIN et al. 2009). Do této skupiny patří řády bičovci (*Amblypygi*), bičnatci (*Uropygi*), krátkochvosti (*Schizomida*), pavouci (*Araneae*) a patrně i trigonotarbidí (*Trigonotarbida*), což je vyhynulá skupina pavoukovců, která se vyskytovala v paleozoiku (SHEAR et al. 1987; SELDEN et al. 1991). Mezi tetrapulmonátní pavoukovce řadí někteří autoři i roztočovce (*Ricinulei*), kteří se jeví jako blízce příbuzní trigonotarbidům (DUNLOP 1996).

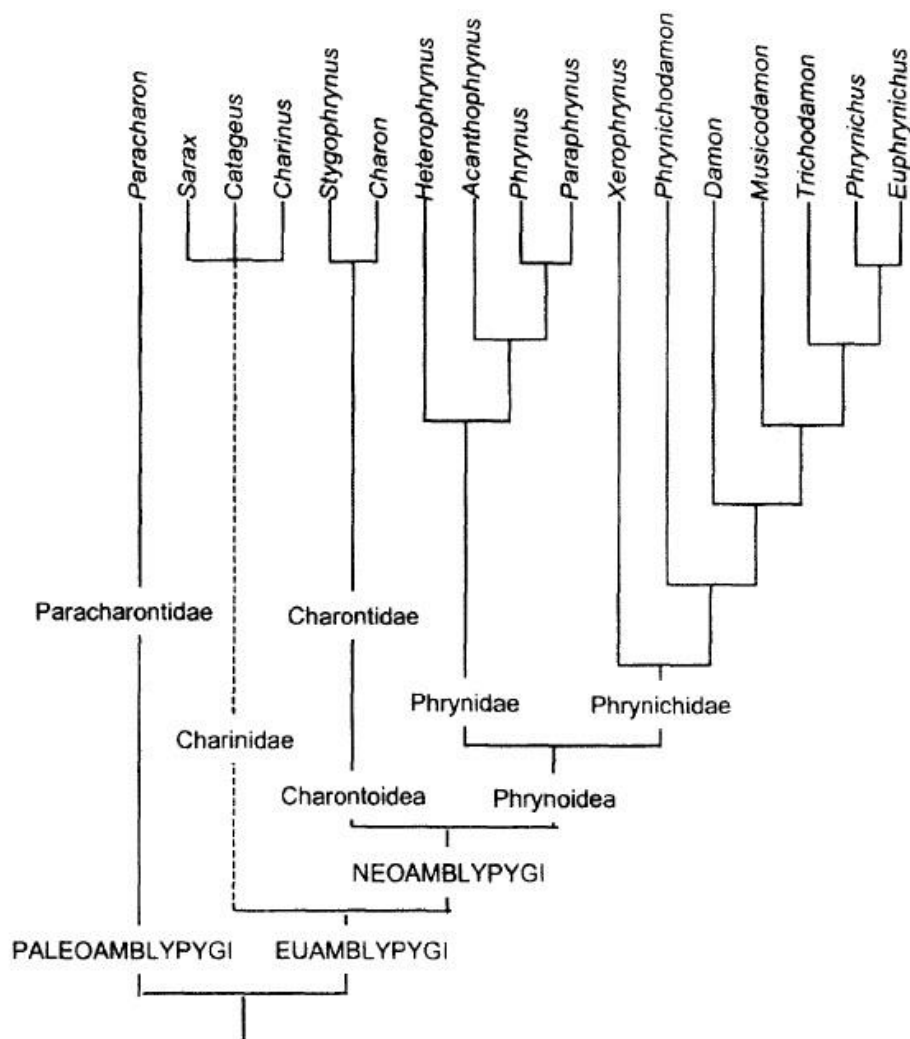
Existuje několik hypotéz o tom, jaký je fylogenetický vztah mezi jednotlivými řády tetrapulmonátů (viz obr. 1). Jedna z hypotéz říká, že bičnatci jsou sesterskou skupinou bičovců, což je podpořeno společnými znaky, jako jsou loupeživé pedipalpy a přeměna prvního páru kráčivých končetin ve smyslové orgány (SHEAR et al. 1987; SHULTZ 1989; SHULTZ 1990). Oba řády se označují jako pedipalpidi (*Pedipalpi*). Další hypotéza předpokládá, že bičovci jsou sesterskou skupinou pavouků, protože obě skupiny mají postcerebrální hltan a stopku mezi hlavohrudí a zadečkem (PETRUNKEVITCH 1955; WEYGOLDT & PAULUS 1979; AX 1996). V této hypotéze tvoří pavouci a bičovci tzv. labeláty (*Labellata*). Obě hypotézy zdůrazňují blízkou příbuznost krátkochvostů a bičovců.

Bičovci jsou malou skupinou suchozemských pavoukovců s dorzoventrálně zploštělým tělem, loupeživými pedipalpami a extrémně prodlouženými prvními končetinami, které jsou modifikovány a slouží jako smyslové orgány pro orientaci v prostoru. Vyskytují se v tropickém a subtropickém pásu, a to hlavně ve vlhkých oblastech (WEYGOLDT 2000). Taxonomicky je můžeme rozdělit na dvě podskupiny. První z nich jsou paleoamblypygidi, reprezentováni jediným žijícím druhem, kterým je slepý *Paracharon caecus* (HANSEN 1921) o velikosti několika milimetrů. Druhou podskupinou jsou euamblypygidi, kteří mají až několik centimetrů a jsou rozděleni do čtyř čeledí se šestnácti rody a 157 popsányými druhy (viz obr. 2) (HARVEY 2002, 2003, 2007).

Ob. 1: Hypotézy o příbuznosti jednotlivých skupin tetrapulmonálních pavoukovců
 (a) hypotéza Schultze (1990)
 (b) hypotéza Weygoldta a Pauluse (1979)
 (převzato z SHULTZ 2007)



Bičnatci jsou několik centimetrů velcí tropičtí dravci s mohutnými pedipalpami a článkovaným ocáskem, do jehož báze ústí anální žlázy, jejichž páchnoucí obsah používají k zastrašení nepřítele (EISNER et al. 1961). Sekret, který takto produkují, má často druhově specifické složení. Většinou se jedná o kyselinu octovou nebo kaprylovou, která je obohacena o různé ketony, alkoholy nebo estery (EISNER et al. 1961; HAUPT et al. 1988; HAUPT et al. 1993). V současné době je známo 103 druhů, rozdělených do 16 rodů (HARVEY 2002).

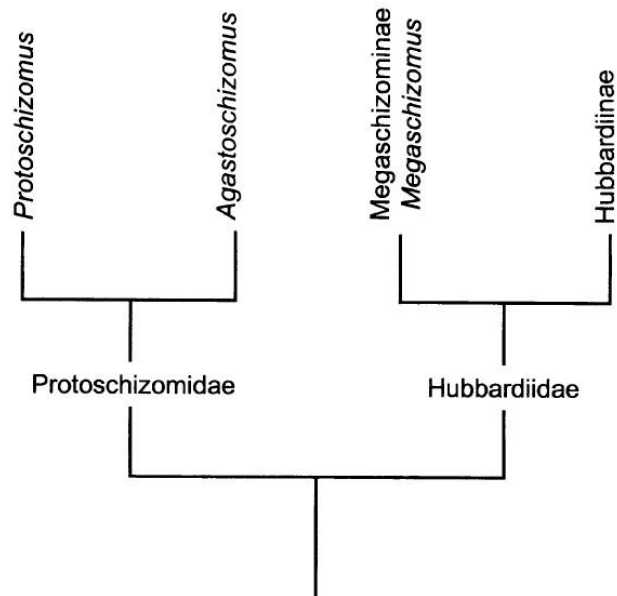


Obr. X: Systematické členění bičovců (převzato z HARVEY 2002)

Krátkochvosti jsou pavoukovci o velikosti jen několika málo milimetrů, kteří se vyskytují převážně v tropických pralesích v hrabance nebo jeskyních (HARVEY 2002). Vyznačují se dlouhými předními končetinami s hmatovou funkcí, díky nimž se orientují v prostředí a které jim umožňují velmi rychlý pohyb na krátké vzdálenosti. Jejich abdomen je tvořen 12 články. Poslední z nich je zakončen bičíkem, který je mnohem kratší než u bičovců a nemá více než 4 články. Pro krátkochvosty je typický pohlavní dimorfismus, kdy bičík u samců je nápadně zvětšený, zatímco u samic nikoliv (STURM 1958). Krátkochvosti jsou nepříliš probádanou skupinu pavoukovců. Jak bylo již řečeno, nejčastěji jsou považováni za sesterskou skupinu bičovců a dělí se do dvou čeledí (viz obr. 3) s 34 rody a více než 180 druhy (HARVEY 2002).

Roztočovci jsou starobylou skupinou pavoukovců, která se vyskytovala už ve svrchním karbonu, a proto jsou označováni jako žijící fosílie. V dnešní době se nacházejí v tropickém pásu Afriky a Ameriky (HARVEY 2002). Oproti ostatním pavoukovcům mají

Obr. 3: Schématické znázornění klasifikace krátkochvostů do dvou čeledí (převzato z HARVEY 2002 podle COKENDOLPHER & REDDEL 1992)

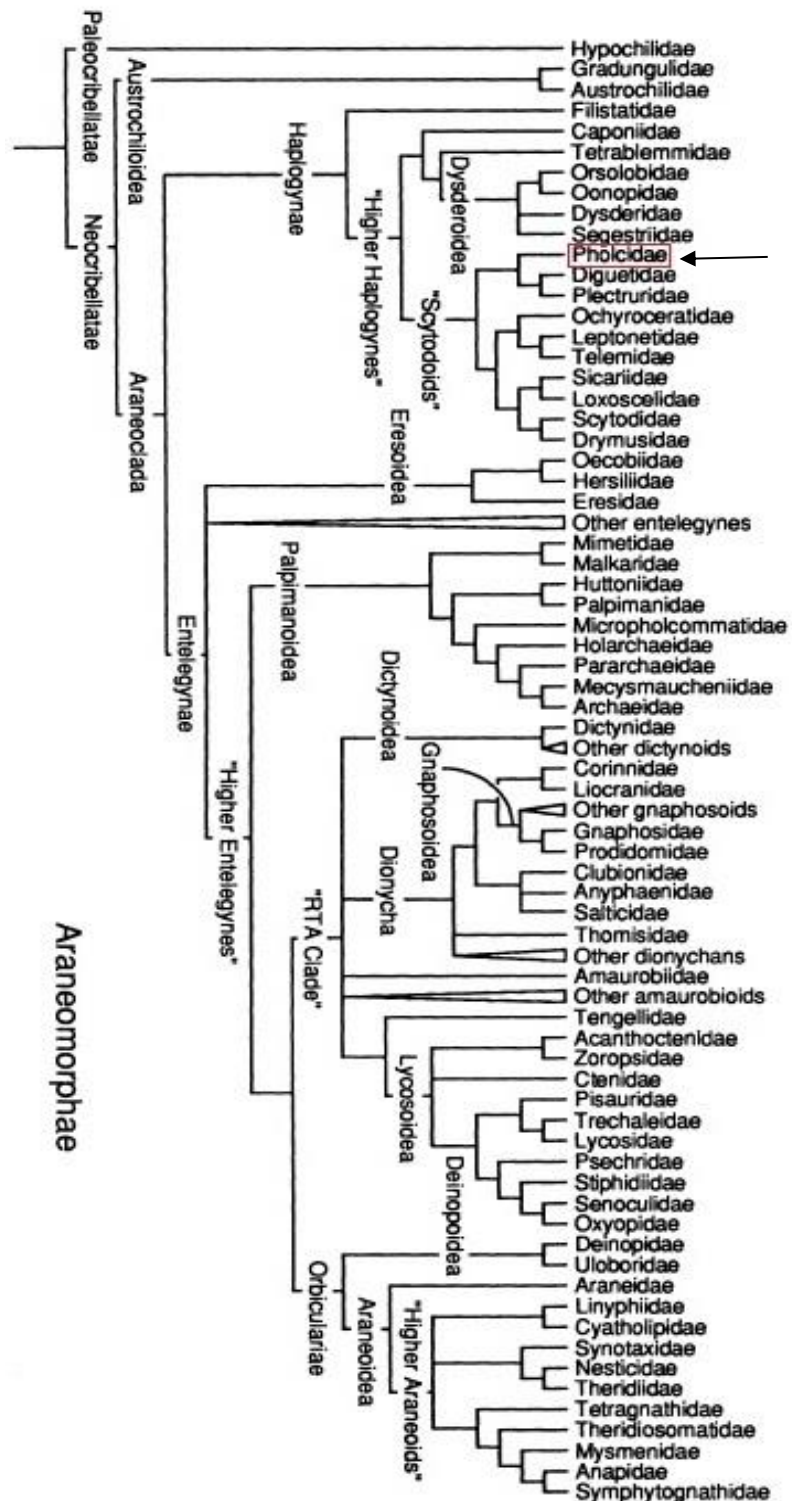


mnoho modifikací zahrnující velký počet autapomorfí, což jsou unikátní znaky typické pro určitou skupinu. Mezi ně patří zvláštní ochranný štít hlavy, způsob přenosu spermií modifikovaným párem končetin a modifikované pedipalpy (SELDEN et al. 1991). Roztočovci jsou obvykle označováni za sesterskou skupinu roztočů, některými autory jsou ale považováni za sesterskou skupinu trigonotarbidů (SHULTZ 1990; WEYGOLDT & PAULUS 1979; DUNLOP 1996). V současné době jsou rozděleni do tří rodů s více než 55 druhy (HARVEY 2002).

Pavouci jsou v této práci zastoupeni podřádem sklípkošů (Mesothelae) a dvouplicnými pavouky (Araneomorphae), kteří spolu se sklípkanými (Mygalomorphae) tvoří podřád Opisthothelae. Sklípkoši jsou stejně jako roztočovci považováni za živoucí fosílie a mají řadu morfologických znaků typických pro původní předky všech pavouků. Jedná se o tergity (hřbetní destičky) a sternity (břišní destičky) na zadečku, dorsoventrální svalovinu zadečku a čtyři páry snovacích bradavek umístěných v přední části zadečku (CODDINGTON & LEVI 1991). Tito pavouci obývají Čínu, Japonsko, jihovýchodní Asii a Sumatru a dělí se do několika rodů s více než 80 druhy (PLATNICK 2013). Dvouplicní (též araneomorfní) pavouci bývají často označováni jako „praví“ pavouci. Jedná se o velmi diverzifikovanou skupinu, která se vyskytuje celosvětově a člení se do mnoha skupin (viz obr. 4). V rámci této skupiny jsme studovali zástupce čeledi Pholcidae (KOCH 1851), kteří patří mezi haplogynní pavouky. Tito pavouci se vyznačují tím, že jim na rozdíl od tzv. entelygynních araneomorfů

chybí epigyna, což je sklerotizovaná genitální destička u samic (CODDINGTON & LEVI 1991).

Obr. 4: Schéma taxonomického členění infrařádu dvouplicných pavouků (Araneomorphae) se zvýrazněnou čeledí Pholcidae, jejímž zástupcem se zabývám. (převzato z CODDINGTON & LEVI 1991)



3.2. Pohlavní chromozomy

Pohlavní chromozomy jsou zvláštním typem více nebo méně nehomologických chromozomů, které většinou vznikly z páru autozomů (CHARLESWORTH 1996, RICE 1996). Jsou označovány písmeny X, Y, Z a W v závislosti na tom, o jaký typ

chromozomového určení pohlaví se jedná. Základní typy chromozomového určení pohlaví jsou savčí typ (= typ *Drosophila*) a ptačí typ (= typ *Abraxas*). V prvním případě jsou samci heterogametičtí (XY) a samice homogametické (XX). Ve druhém případě je tomu naopak, samice jsou heterogametické (ZW) a samci homogametičtí (ZZ) (BULL 1983). Nepárové pohlavní chromozomy neboli alozomy (Y nebo W) se začnou diferencovat tehdy, kdy jeden chromozom z původně homologického páru autozomů získá určitý dominantní faktor, který určuje pohlaví (RICE 1996). Na druhém chromozomu se začnou hromadit faktory výhodné pro druhé pohlaví a dojde k supresi rekombinace mezi těmito místy. Alosom se tak postupně stává geneticky izolovaným, hromadí se na něm mutace a kumulují se transponovatelné elementy (STEINEMANN & STEINEMANN 2005). Mezi procesy, které zodpovídají za degeneraci nepárových pohlavních procesů, patří Mullerova rohatka, genetické svezení se a selekce na pozadí (FELSENSTEIN 1974; BACHTROG 2008; CHARLESWORTH & CHARLESWORTH 2000; ELLEGREN 2011). Poslední fází degenerace alosomu může být až jeho úplná ztráta, tak vznikají systémy X0 a Z0 (STEINEMANN & STEINEMANN 2005). Dalším způsobem vzniku pohlavních chromozomů je vznik neopohlavních chromozomů, nejčastěji Robertsonovou translokací mezi původním pohlavním chromozomem a autozomem (CHARLESWORTH & CHARLESWORTH 2005). Pohlavní chromozomy mohou vznikat i z B chromozomů, což jsou nadpočetné chromozomy, které se snaží různými způsoby udržet v genomu. Jedním z nich může být i získání schopnosti párovat a segregovat s X chromozomem, což může například z původního systému ♂X0/♀XX vytvořit systém ♂XY/♀XX (CARVALHO et al. 2009). Mezi další možnosti, jak mohou vznikat pohlavní chromozomy, patří i rozpad původních pohlavních chromozomů nebo nenáhodná segregace některých autozomů s původními pohlavními chromozomy (WHITE 1973; KUBAI & WISE 1981; SCHWANDER & BEUKEBOOM 2011).

V počátečních fázích vzniku od sebe pohlavní chromozomy nejsou odlišitelné morfologicky, označují se jako homomorfní a rozdíly mezi nimi lze detekovat pouze na molekulární úrovni např. metodou CGH (TRAUT et al. 1999). S postupující diferenciací je lze rozlišit i na základě morfologie (tzv. heteromorfní pohlavní chromozomy). Podrobnostmi o vzniku a evoluci pohlavních chromozomů jsem se zabývala ve své bakalářské práci. V diplomové práci se proto zaměřím hlavně na pohlavní chromozomy u pavoukovců, kteří mají mnoho různých typů určení pohlaví.

3.2.1. Pohlavní chromozomy u pavouků

U většiny pavouků se vyskytuje neobvyklý systém pohlavních chromozomů X_1X_20 (BENAVENTE & WETTSTEIN 1980). To znamená, že samice mají celkem čtyři chromozomy X ($X_1X_1X_2X_2$) a samci dva chromozomy X (X_1X_2). Absence alozomu se označuje symbolem 0 (HACKMAN 1948). U pavouků se jedná pravděpodobně o systém fylogeneticky původní systém, protože se objevuje i u primitivních pavouků jako jsou sklípkoši (Mesothelae) a sklípkani (Mygalomorphae) (ARAÚJO et al. 2005; SUZUKI 1945). Existují dvě hypotézy o tom, jak tento zvláštní typ chromozomového určení pohlaví vznikl. První z nich předpokládá, že na počátku byl $\text{♂}X0/\text{♀}XX$ systém, ze kterého se nondisjunkcí a diferenciací nově vzniklého X stal systém X_1X_20 (WHITE 1940; POSTIGLIONI & BRUM-ZORRILLA 1981). Tato hypotéza má však háček v tom, že nondisjunkcí chromozomu X může být narušena rovnováha mezi samčími a samičími pohlavními faktory. U některých rodů pavouků nalzáme systémy $X_1X_2X_30$, $X_1X_2X_3X_40$ nebo i systémy s vyšším počtem chromozomů X (KRÁL et al. 2013), u nichž se rovněž předpokládá, že se vznikly nondisjunkcí podobně jako systém X_1X_20 (POSTIGLIONI & BRUM-ZORRILLA 1981; DATTA & CHATTERJEE 1988). Tato hypotéza je podpořena faktem, že občas bývá pozorována nondisjunkce X chromozomů ve spermatocytech některých druhů pavouků s X_1X_20 systémem (SUZUKI 1954) a dále zvláštním chováním chromozomů X v meióze samic (KRÁL 2007). U samic pavouků se vyvinula v profázi I inaktivace chromozomů X, která pravděpodobně zamezuje rekombinaci mezi různými páry chromozomů X (KRÁL 2007). Tento mechanismus je obdobný inaktivaci diferencovaných pohlavních chromozomů během profáze I u heterogametického pohlaví, která byla pozorována u různých živočichů a která také zabraňuje rekombinaci nehomologických pohlavních chromozomů (JABLONKA & LAMB 1988). Jednotlivé chromozomy X vzniklé nondisjunkcí se tak mohly dále rozrůžňovat zamezením rekombinace mezi nimi. Inaktivace chromozomu X redukovala také negativní působení duplikovaného chromozomu X na tvorbu bivalentů v samičí meióze. Supresí rekombinace u samic pavouků došlo nakonec k tomu, že se původně stejné X chromozomy stále více rozrůžňovaly, až bylo jejich párování omezeno pouze na oblast centromery, což zajišťuje modifikovaný synaptonemální komplex (KRÁL 2007). Druhá hypotéza je založena na tom, že akrocentrické chromozomy X_1 a X_2 vznikly rozpadem buď původního metacentrického X chromozomu (BOLE-GOWDA 1950; WHITE 1973) anebo aberantního dicentrického chromozomu X (PATAU 1948; SUZUKI 1945). U pavouků jsou také časté neopohlavní systémy chromozomů, které vznikají přestavbami mezi původními pohlavními chromozomy a autozomy (ŘEZÁČ et al. 2006; KRÁL et al. 2006).

3.2.2. Pohlavní chromozomy dalších skupin pavoukoců

Jak bylo řečeno výše, pavoukocí mají mnoho různých typů určení pohlaví. U sekáčů (Opiliona) se vyskytuje převážně typ *Drosophila* XY/XX, avšak u dvou čeledí byl zjištěn systém *Abraxas* (♀ZW/♂ZZ), který u pavoukoců není obvyklý (TSURUSAKI & COKENDOLPHER 1990; TSURUSAKI 2007). U štírků (Pseudoscorpiones) se vyskytují systémy XY/XX nebo X0/XX, přičemž se oba typy mohou objevit i v rámci jednoho rodu, méně často se zde setkáváme s nepohlavními systémy (TROIANO 1990; ŠTÁHLAVSKÝ et al. 2006). Pro řád štírů (Scorpiones) nebylo dodnes publikováno příliš mnoho informací o jejich karyotypech, dosavadní výsledky ukazují na absenci diferencovaných pohlavních chromozomů, samci i samice vykazují stejný počet chromozomů. U některých štírů se vyskytuje thelytokie, což je způsob partenogeneze kdy se z neoplozeného vajíčka vyvíjí pouze samice (SCHNEIDER & CELLA 2010; JAFFE 2004). V rámci roztočů (Acari) se opět vyskytuje několik typů určení pohlaví, jedná se o systémy ♂XY/♀XX, ♂X0/♀XX, neopohlavní systémy, velmi časté jsou různé typy partenogeneze (haplodiploidie a thelytokie) (KAHN & QUART 1964; OLIVER 1977; NORTON et al. 1993). Předběžné výsledky u řádů solifugy (Solifugae), krátkochvosti (Schizomida), roztočovci (Ricinulei) a bičovci (Amblypygi) ukazují na absenci morfologicky diferencovaných pohlavních chromozomů (KRÁL et al. 2008). Diplomová práce Sembera, v níž byla k detekci pohlavních chromozomů použita metoda CGH, naznačuje, že u bičovců čeledi Phryniidae a Phrynichidae by se mohl vyskytovat systém ♂XY/♀XX v počátečním stádiu diferenciace (SEMBER 2010). U většiny bičnatců (Uropygi) se také diferencované pohlavní chromozomy nevyskytují, výjimku tvoří druh *Thelyphonus sepiaris*, u něhož byl popsán systém ♂XY/♀XX (KATSURI & PATHASARATHY 1957).

3.3. Nukleolární organizátory a rDNA

3.3.1. Stavba jadérka

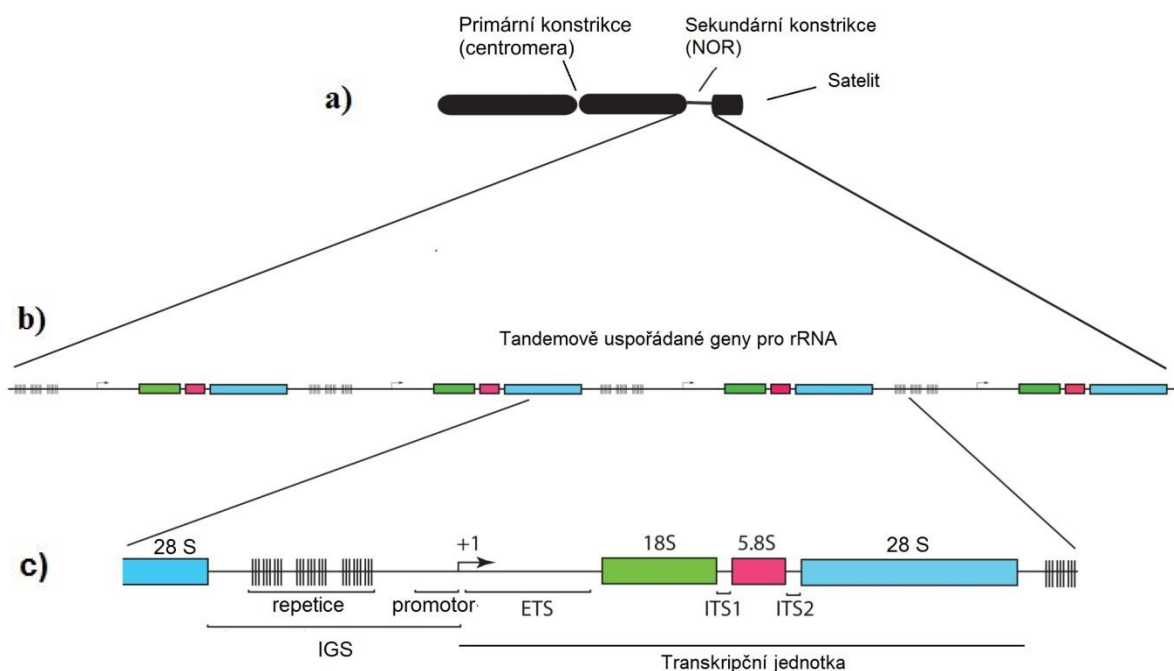
Jadérko pozoroval již v roce 1781 Fontana. Název získalo v roce 1839, kdy si Valentin všiml, že většina buněk má sekundární jádro neboli „jádro v jádře“ (SWARZACHER & WACHTLER 1983). V interfázním jádře je to největší a nejnápadnější struktura, která se může skládat ze dvou nebo tří morfologicky odlišitelných částí. Velmi dobře bylo popsáno jadérko u vyšších eukaryot, kde je tvořeno fibrilárním centrem (FC), které obklopuje hustá fibrilární složka (DFC) a granulární složka (GC) (HADJIOLOV 1985). U nižších eukaryot je v jadérku jen jediná fibrilární část, která se pravděpodobně rozrůznila až v průběhu evoluce na FC a DFC (THIRY & LAFONTAINE 2005). Fibrilární centrum je

tvořeno jemnými vláknitými strukturami obsahující rDNA, nově vznikající pre-rRNA, RNA polymerázu I, upstream binding factor (UBF) a DNA polymerázu I. V husté fibrilární složce se nachází opět nově vznikající pre-rRNA a UBF, dále zde nalezneme proteiny nucleolin a fibrillarin, který je součástí malých jadérekových snoRNP podílejících se na modifikaci RNA. Granulární složka, která tvoří vnější vrstvu jádérka, je tvořena ribonukleoproteiny partikulami (RNP) a skládá se z nucleolinu, ribosomálního proteinu S1 a ribocharinu (THIRY & LAFONTAINE 2005).

3.3.2. Nukleolární organizátory a rDNA

3.3.2.1. Stavba nukleolárních organizátorů a rDNA

Jadérko se formuje okolo specifických míst na chromozomech, která se nazývají nukleolární organizátor (NOR) (HEITZ 1931; MCCLINTOCK 1934). V metafázi mitotického dělení NORy vytvářejí na chromozomech nápadnou konstrikcí. U velké části organismů se tato tzv. sekundární konstrikcí nachází v blízkosti konců chromozomů, kde odděluje krátkou oblast chromozomu označovanou jako satelit (viz. obr. 6). Například u člověka nalzáme NORy v blízkosti konců krátkých ramének akrocentrických chromozomů (SCHWARZACHER 1978). NORy obsahují tandemově uspořádané repetice genů pro rRNA (tzv. transkripční jednotky). U většiny organismů obsahuje každá transkripční jednotka 18S, 5.8S a 28S kódující sekvenci, vnitřní a vnější mezerník (ITS a ETS). Transkripční jednotky jsou odděleny také mezerníky (viz obr. 6) (FATICA & TOLLERVEY 2002; HADJIOLOV 1985). Repetice genů pro 5S rRNA se nachází v jiné části genomu. Délka kódujících sekvencí pro jednotlivé rRNA je většinou podobná u různých organismů. Výjimkou jsou např. rostliny, kde se místo 18S a 28S genů vyskytují 17S a 25S geny, nebo prvok *Tetrahymena*, která má místo 28S genu 26S gen. Mnohem větší variabilita je pozorována ve struktuře a délce mezerníků, u netranskribovaného mezerníku oddělujícího jednotlivé transkripční jednotky byly pozorovány odlišnosti dokonce u stejných NORů (LEBOVSKY & BENSIMON 2005). Vysoce variabilní je také počet kopií transkripčních jednotek ribosomálních genů, který se pohybuje od méně než sta u protist, hub a některého hmyzu až po desítky tisíc kopií u některých rostlin a žab (LONG & DAWID 1980).



Obr. 5: Schématické znázornění stavby nukleolárního organizátoru. (a) sekundární konstriktce s NORem odděluje od ostatního chromozomu tzv. satelit. (b) tandemově uspořádané geny pro rRNA.(transkripční jednotky). (c) transkripční jednotka se skládá z ETS (vnější přepisovaný mezerník), ITS1 a 2 (vnitřní přepisované mezerníky) a geny pro 18S, 5.8S a 28S rRNA. Transkripční jednotky jsou odděleny mezigenovými mezerníky (IGS) obsahujícími repetitivní DNA a promotor. (upraveno podle TUCKER et al. 2010)

3.3.2.2. Fylogenetické studie založené na výzkumu rDNA

Sekvence rDNA jsou již po desetiletí srovnávány a používány pro odhalování příbuznosti mezi různými skupinami organismů (MALLATT et al. 2010). Studium rDNA je pro fylogenetické studie důležité hlavně proto, že různé sekvence repetitivní rDNA se vyvíjejí rozdílnou rychlostí a vysoce konzervované sekvence, které nacházíme u většiny genů pro rRNA, jsou vhodné pro konstrukci primerů. Tyto sekvence můžeme posléze využít pro sekvenování jak rRNA, tak i rDNA po amplifikaci daného místa pomocí PCR nebo z nich mohou být vyráběny sondy (KOCHER et al. 1989; HILLIS et al. 1990; SIMON et al. 1990). Nejlépe prostudovány jsou geny pro 18S rRNA malé ribozomální podjednotky. Jedná se o nejpomaleji se vyvíjející sekvenci, a proto se velmi hodí např. pro studium evolučních událostí, které se staly v období prekambria před 300 až 400 miliony lety při rozrůžňování mnohobuněčných organismů (HILLIS & DIXON 1991). Naopak geny, jejichž rRNA jsou začleněny do velké ribozomální podjednotky, jsou mnohem variabilnější a využívají se ke studiu fylogenetických událostí odehrávajících se v prvohorách, druhohorách a případně i třetihorách (HILLIS & DIXON 1989; LARSON & WILSON 1989; DE SÁ & HILLIS 1990;

HILLIS et al. 1991; GUTELL & FOX 1988). Geny pro 5.8S rRNA jsou konzervativní podobně jako geny pro 18S rRNA, ale pro jejich malou velikost nejsou efektivní pro vyvození fylogenetických vztahů v rámci delšího časového úseku (NAZAR et al. 1976). Geny pro 5S rRNA jsou pak ještě kratší než pro 5.8S rRNA, takže jsou pro fylogenetické studie spíše méně vhodné (HALANYCH 1991; STEELE et al. 1991).

Pro určení příbuznosti blízké příbuzných druhů živočichů, jejichž linie se oddělily v průběhu posledních 50 milionů let, je možné využít mezerníky mezi rRNA geny. Netranskribované mezerníky se vyvíjejí nejrychleji, naopak transkribované mezerníky jsou víceméně konzervované (HOSHIKAWA et al. 1983; FURLONG & MADEN 1983).

3.3.2.3. Detekce nukleolárních organizátorů

Nukleolární organizátory mohou být lokalizovány pomocí různých postupů. Jedna z často používaných starších technik je detekce pomocí dusičnanu stříbrného, tzv. stříbření (HOWELL & BLACK 1980). Tato metoda deteguje specifické proteiny, které jsou asociovány s NORy a je schopná ukázat pouze ty NORy, které byly aktivní v předchozí interfázi (SUMNER 1990; WACHTLER & STAHL 1993). Mezi hlavní problémy při stříbření patří špatná reprodukovatelnost výsledků. Menší nebo slabě obarvené NORy jsou snadno zaměnitelné s obarvenými granulemi cytoplazmy. Dalším problémem je postupné vyblednutí nastříbřených NORů na starších preparátech (COGHILL et al. 1990; GRIFFITHS et al. 1989; KOREK et al. 1991; MCLEMORE & LORD 1991; NIKICICZ & NORBACK 1991). Proto se dnes mnohem častěji k vizualizaci NORů používá FISH (fluorescenční hybridizace in situ). Tato metoda je mnohem specifičtější a NORy odhalí bez ohledu na jejich aktivitu. Jako sonda slouží při této FISH rDNA (SUMNER 2003).

3.3.2.4. Nukleolární organizátory u pavoukvců

Pro pavoukovce prozatím neexistuje podrobnější fylogenetická studie o evoluci NORů. Informace o NORech u pavouků jsou prozatím vzácné, tyto struktury byly dosud vizualizovány převážně metodou stříbření (ARAÚJO et al. 2005). Informace o výskytu NORů máme pouze u některých sklípkanů (KRÁL et al. 2013), haplogynních a entelygenních dvouplícných pavouků (ARAÚJO et al. 2005; KRÁL et al. 2006; RODRIGUEZ-GIL et al. 2007; ARAÚJO et al. 2008). U haplogynních dvouplícných pavouků je častý výskyt NORů na pohlavních chromozomech (KRÁL et al. 2006). U entelygenních pavouků se naopak NORy na pohlavních chromozomech vyskytují vzácně (KRÁL et al. 2011, 2013). Pro entelygenní větev se zdá být původní lokalizace NORů na dvou párech autozomů, protože se zde tento znak objevuje u více čeledí (DOLEJŠ et al. 2011). Obecně se u dvouplícných

pavouků NORy vyskytují v distální nebo subdistální oblasti chromozomů a zahrnují jeden nebo dva páry NORů. Stejně tak je tomu i u sklípkanů což naznačuje, že distální poloha a nízký počet NOR jsou symplesiomorfiemi (vývojově původnější znak sdílený alespoň dvěma skupinami) sklípkanů a dvouplicných (KRÁL et al. 2013).

Studiem NORů u bičovců a bičnatců se ve své diplomové práci zabýval A. Sember. U většiny bičovců objevil jeden nebo dva páry NOR, a to většinou v terminální nebo subterminální oblasti chromozomů. Výjimečně detegoval vyšší počet NOR nebo pericentrickou polohu NOR. NORy se do pericentrické oblasti mohly dostat pericentrickou inverzí z terminální oblasti. Podobně jako u pavouků by tedy mohl být původním znakem jeden nebo dva páry NORů lokalizovaných v blízkosti konců chromozomů, což podporuje i teorii, že pavouci a krabovci jsou blízce příbuznými skupinami (SEMBER 2010). U bičnatců byly detekovány 3 páry NORů, a to většinou v terminální nebo subterminální oblasti (SEMBER 2010).

Pokud vezmeme v potaz všechna data, která byla získána u různých skupin pavoukoců jak metodou tzv. stříbření, tak pomocí FISH, je pravděpodobné, že původním znakem pavoukoců je jeden pár NORů (KRÁL et al. 2008; SCHNEIDER & CELLA 2010; KRÁL et al. 2013).

3.3.3. Funkce jadérka

Primární funkcí jadérka je syntéza rRNA a její formování do preribosomů, což bylo poprvé prokázáno již v roce 1964 pokusem Browna a Gurdon, kteří zbavili žabí embrya jadérka, a to nebylo schopno vytvářet nové ribozomy poté, co vyčerpalo zásoby od matky (BROWN & GURDON 1964). Během syntézy rRNA je v prvním kroku RNA polymerázou I přepsán dlouhý polycistronní prekurzor (pre-rRNA), který obsahuje ribozomální geny, ITS a ETS. Tento prekurzor je různě chemicky modifikován a váže se na něj guide RNA, která patří mezi malé nukleolární RNA (snoRNA) a navádí enzymy modifikující RNA na příslušná místa nebo napomáhá štěpení pre-rRNA (ELICERI 1999; KISS 2002). Pre-rRNA je naštěpena endo- a exonukleázami na 18S rRNA pro malou ribozomální podjednotku a 5.8S a 28SrRNA pro velkou podjednotku ribozómu. Repetice genů pro 5S rRNA, která náleží také k velké podjednotce, jsou transkribovány nezávisle RNA polymerázou III a do jadérka musí být transportovány (DECHAMPESME et al. 1999). Dalším krokem utváření ribozomů je asociace rRNA s příslušnými ribozomálními proteiny (DECHAMPESME et al. 1999; GERBI & BOROVIJAGIN 2004). Ribozomální proteiny jsou transkribovány RNA polymerázou II a

je zajímavým faktem, že mnohé snoRNA jsou kódované sekvencemi v intronech ribozomálních proteinů. Malé a velké ribozomální podjednotky jsou pak individuálně transportovány přes jaderné póry do cytoplazmy (FATICA & TOLLERVEY 2002; TSCHOCHNER & HURT 2003).

Na základě biochemických analýz byly v jadérku objeveny mnohé proteiny, které nesouvisí s biogenezí ribozomů a bylo zjištěno, že se jadérko podílí i na dalších buněčných procesech (OLSON et al. 2002; PEDERSON 1998). Mezi ně patří skládání SRP (signal recognition particle) komplexu, modifikace malých RNA, editace RNA, interakce s telomerázou, transport z buněčného jádra, kontrola buněčného cyklu a role v buněčném stresu (SOMMERVILLE et al. 2005; CIUFO & BROWN 2000; SANSAM et al. 2003; KHURT et al. 2004; BUBBI & MILNER 2003; OLSON et al. 2002). Uvnitř jadérka byly detekovány i proteiny kódované DNA viry, RNA viry a retroviry, které jadérko a jeho proteiny využívají ke zvýšení virové replikace nebo k ovlivňování transkripce a translace hostitelské buňky (HISCOX 2002).

3.3.4. Dynamika jadérka během mitózy a meiózy

V buňkách vyšších eukaryot se jadérko v průběhu mitózy rozpadá, což poprvé pozoroval Pflitzner v roce 1881. Během profáze začíná nejprve klesat transkripce ribozomálních genů až je později úplně umlčena (DIMARIO 2004; LEUNG & LAMOND 2003). Na konci profáze se jadérko úplně rozpadá (GAUTIER et al. 1992; OLSON & DUNDR 2005). Transkripční faktory a několik podjednotek RNA polymerázy I zůstává asociováno s nukleolárními organizátory (CHEN et al. 2005; LEUNG et al. 2004). Zbylé podjednotky RNA polymerázy I a většina faktorů účastnících se úprav rRNA a skládání ribozomů asociují po rozpadu DFC a GC s povrchem chromozomů (HERNANDEZ-VERDUN et al. 1993). V anafázi se část těchto jadérkových proteinů odděluje od povrchu chromozomů do cytoplazmy a mohou se soustřeďovat do tzv. center odvozených z jadérka (NDF = nucleolus-derived foci), v nichž se objevují i molekuly pre-rRNA (DUNDR & OLSON 1998). Poté, co buňka vstoupí do telofáze, je postupně obnovena transkripce rRNA (SIRRI et al. 2000), počet NDF klesá a vznikají tzv. prenukleolární tělíska (PNB), které pravděpodobně obsahují všechny komponenty později přítomné v jadérku (ANGELIER et al. 2005; JIMENEZ-GARCIA et al. 1994; SAVINO et al. 2001). Jadérka se začínají opět kompletovat okolo NORů (SATO 1988) a zároveň se v jejich blízkosti shlukují PNB tělíska, která do nich transportují faktory pro úpravu rRNA i další jadérkové proteiny (ANGELIER et al. 2005).

U nižších eukaryot se jádro v průběhu mitózy nerozpadá a jadérko tedy zůstává v průběhu mitózy zachováno. Tato tzv. persistence jadérka je typická například pro kvasinky (STRUNNIKOV 2005) a obrněnky (SOYER-GOBILLARD & GERAUD 1992). Výjimečně perzistují jadérka během mitózy i u vyšších eukaryot, například u savčích nádorových buněk (SHELDON et al. 1981).

Během meiózy dochází k silnému zvýšení aktivity jadérka v profázi I, a to zejména během pachytene, což může vést i ke vzniku nových jadérek (SCHMID et al. 1982; WACHTLER & STAHL 1993). V rámci spermatogeneze je syntéza rRNA umlčena většinou na konci pachytene (TRES 1975), v oogenezi však pokračuje až do diplotene (MIRE & STAHL 1976). O chování jadérka v meióze existuje pouze několik málo studií, tento jev není prozatím tak dobře prozkoumán. Jisté je, že se jadérko v meióze rozpadá nejpozději na počátku metafáze I (SUMNER 2003). Po rozpadu jadérka obdobně jako v mitóze přechází materiál jadérka do cytoplazmy, asociuje s povrchem chromozomů nebo s NORy (HOFGÄRTNER et al. 1979; SCHMID et al. 1982). Stejně jako v mitóze existují i v meióze případy persistence jadérka. To bylo pozorováno např. u některých bezobratlých živočichů, jako jsou brouci a cvrčci (SATYA-PRAKASH & PATHAK 1984).

3.4. Telomery

3.4.1. Stavba a funkce telomerické DNA

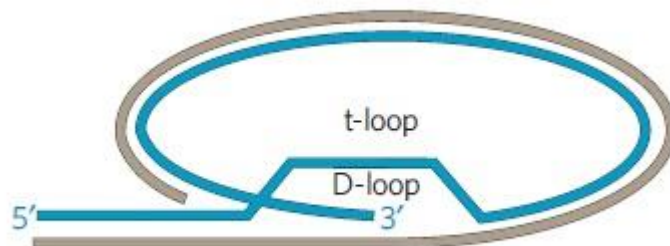
Telomery jsou koncové části chromozomů u eukaryot, mají několik zásadních biologických funkcí. První z nich byla objevena již v první polovině 20. století, kdy byly telomery definovány jako funkční struktury udržující stabilitu chromozomů a zabraňující zlomům jejich konců (MULLER 1938; MCCLINTOCK 1941). Další podstatnou funkcí telomer je jejich role při buněčné replikaci, díky jejich specifické struktuře může být lineární DNA replikována až do konce (WATSON 1972; OLOVNIKOV 1973). Toto je možné díky enzymu telomeráza, což je reverzní transkriptáza, která přímo obsahuje RNA templát pro syntézu krátkých telomerických repetit, které se nacházejí na koncích DNA (GREIDER & BLACKBURN 1989).

Telomery jsou tvořeny telomerickou DNA a proteiny, které s ní interagují. Telomerická DNA je vysoce konzervovaná struktura obsahující 5-8 pb dlouhé dvouvláknové tandemové repetice, na které navazuje na 3' konci jednovláknový přesah bohatý na G, jehož délka je variabilní, a to od několika desítek po stovky nukleotidů. Tento 3' přesah tvoří zvláštní sekundární strukturu, tzv. G-kvartet, kde guaniny párují podle tzv. Hoogsteenova

pravidla o párování bazí (FANG & CECH 1993a, b). G-kvartety se vrství na sebe a vytvářejí G-kvadruplexy, což jsou helikální struktury, které jsou pravděpodobně stabilizovány chaperony a jejichž tvorba je silně závislá na kationtech draslíku a sodíku (RHODES & GIRALDO 1995). Funkcí těchto G-kvadruplexů může být ovlivňování funkce některých enzymů (např. telomerázy), ochrana a regulace délky konců telomer (LU et al. 2013).

Na koncích telomerické DNA se dále často vytváří smyčky (viz obr. 6). Dvouvláknová telomerická DNA se ohýbá zpět (tzv. T smyčka), přičemž se jednovláknový 3' přesah vnořuje se do dvouvláknové DNA a vytváří v ní tzv. D-smyčku (PALM & LANGE, 2008). Toto zvláštní architektonické uzpůsobení chrání konce DNA před mechanismy, které detekují a opravují poškozenou DNA (GRIFFITH et al. 1999). Velikost T-smyčky není u všech organismů stejná, pohybuje se od 0,3kb u trypanozomy (MUNOZ-JORDAN et al. 2001) až po 50kb u hrachu setého (CESARE et al. 2003). Předpokládá se, že na utváření T-smyčky se podílejí telomerické proteiny. Prozatím není jasné, zda je T-smyčka zachována v průběhu celého buněčného cyklu (PALM & LANGE 2008).

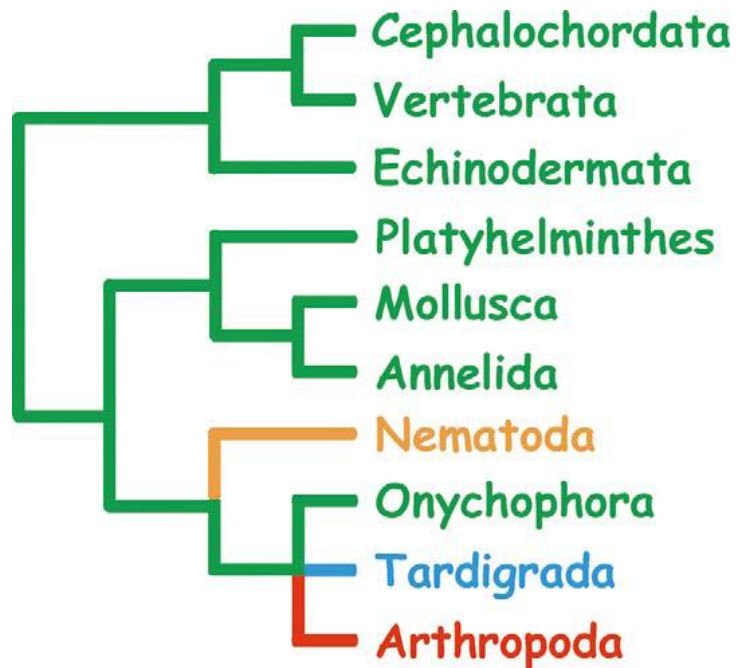
Obr. 6: Schématické znázornění dvouvláknové telomerické DNA zakončené T a D smyčkou (převzato z VERDUN & KARLSEDER 2007)



3.4.1.1. Sekvenční motivy krátkých telomerických repetit

U živočichů (viz obr.7), rostlin, hub a protist byly doposud objeveny různé motivy krátkých telomerických repetit (ZAKIAN 1995). Většinou jsou velmi konzervativní, tj. stabilní v rámci celých velkých fylogenetických skupin. Lidský telomerický motiv představuje sekvenci $(TTAGGG)_n$ (MOYZIS et al. 1998), která byla vzápětí nalezena i u ostatních obratlovců (MEYENE et al. 1989). Hlístice mají konzervovaný motiv $(TTAGGC)_n$ (MULLER et al. 1991; NIEDERMAYER & MORITZ 2000; AHN & WINTER 2006), dalším rozšířeným motivem je $(TTAGG)_n$ sekvence, která je pravděpodobně ancestrální u členovců (OKAZAKI et al. 1993; SAHARA et al. 1999; VÍTKOVÁ et al. 2005). Pro většinu rostlin je typickým motivem $(TTTAGGG)_n$ (COX et al. 1993; FUCHS et al. 1995).

Obr. 7: Fylogeneze telomerických repetic u bilaterií (trojlistých) zastoupenými bezlebečnými (Cephalochordata), obratlovci (Vertebrata), ostnokožci (Echinodermata), ploštenci (Platyhelminthes), měkkýši (Mollusca), kroužkovci (Annelida), hlísticemi (Nematoda), drápkovci (Onychophora), želvuškami (Tardigrada) a členovci (Arthropoda). Zeleně jsou vyznačeny skupiny s převahou (TTAGGG)_n motivu, oranžově skupina s (TTAGGC)_n motivem, červeně skupina s převahou (TTAGG)_n motivu a modře skupina s neznámým telomerickým motivem. (převzato z VÍTKOVÁ et al. 2005)



3.4.1.1.1. „Obratlovčí“ motiv telomerických repetic

Tzv. obratlovčí motiv (TTAGGG)_n je pravděpodobně ancestrálním telomerickým motivem pro všechny živočichy patřící mezi Bilateria (= trojlistí) (VÍTKOVÁ et al. 2005; TRAUT et al. 2007). Kromě obratlovců byl nalezen u mnoha dalších živočišných skupin, jako jsou např. bezlebeční (CASTRO & HOLLAND 2002), pláštenci (LAIRD & WEISSMAN 2004), ostnokožci (PLOHL et al. 2002), ploštenci (HIRAI & LOVERDE 1996; JOFFE et al. 1998), kroužkovci (JHA et al. 1995; VITTURI et al. 2002), měkkýši (VITTURI et al. 2000; WANG & GUO 2001) a drápkovci (VÍTKOVÁ et al. 2005). Další dva motivy vyskytující se u trojlistých, např. (TTAGGC)_n a (TTAGG)_n, se pravděpodobně vyvinuly z „obratlovčího“ motivu (VÍTKOVÁ et al. 2005). Motiv (TTAGGG)_n byl také nalezen u bazálních metazoi, konkrétně u trubének a některých zástupců kmenů dvojlistých - žahavců, žebernatek, vločkovců a houbovců, je tedy možné, že se jedná o ancestrální motiv všech metazoi (TRAUT et al. 2007).

3.4.1.1.2. Telomerické repetice u členovců

Ačkoli se u většiny členovců vyskytuje telomerický motiv (TTAGG)_n, existují i některé výjimky, které jej sekundárně ztratily (TRAUT et al. 2007). Mezi ně patří dvoukřídli, kteří pravděpodobně v průběhu evoluce ztratili geny pro telomerázu a u kterých se tedy musely vyvinout alternativní mechanismy pro prodlužování telomerické DNA (BIESSMANN & MASON 1997). Např. u pakomára rodu *Chironomus* a komára rodu *Anopheles* jsou na koncích chromozomů dlouhé satelitní repetice (RÓSEN & EDSTÖRM 2000; WALTER et al.

2001). U *Drosophila melanogaster* se setkáváme s non-LTR retrotranspozony (MASON & BIESSMANN 1995). (TTAGG)_n motiv byl prozatím v rámci kmene členovců prokázán u zástupců šestinohých (vidličnatky a chvostoskoci), korýšů (rakovci, kapřivci, jazyčnatky a žábronožci), stonožkovců (mnohonožky a stonožky), nohatek a většiny klepítkatců (štírenky, amblypygidi, roztoči, sekáči, štíři, štírci a solifugy) (VÍTKOVÁ et al. 2005). U blíže příbuzných skupin členovců, což jsou želvušky a drápkovci, motiv (TTAGG)_n nalezen nebyl, což by znamenalo, že mohl vzniknout již pozdním prekambriu (VÍTKOVÁ et al. 2005). U pavouků prozatím nebylo zjištěno, co by mohlo tvořit jejich telomerickou DNA. Přítomnost motivu (TTAGG)_n i „obratlovčího“ motivu byla vyloučena u zástupců infrařádů Araneomorphae (SAHARA et al. 1999) a Mygalomorphae (VÍTKOVÁ et al. 2005).

3.4.1.2. Intersticiální telomerické repetice

U některých organismů se mohou telomerické motivy nacházet nejen na koncích chromozomů, ale i v jejich vnitřní části. Tyto telomerám podobné repetice se nazývají intersticiální nebo interchromozomální telomerické sekvence (ITSs). Při prvním pokusu o jejich detekci byly objeveny u 55 ze 100 vybraných druhů savců, ptáků, plazů a obojživelníků (MEYNE et al. 1990). Později byly nalezeny i u dalších eukaryot (SCHUBERT et al. 1995; KILIAN et al. 1999; UCHIDA et al. 2002; TEK & JIANG 2004) a rozděleny do několika typů na základě jejich pozice na chromozomech, délky a způsobu vzniku (BOLZÁN & BIANCHI 2006; LIN & YAN 2008; RUIZ-HERRERA et al. 2008). U člověka byly objeveny tři typy ITSs, a to 1) krátké ITSs s několika málo až dvaceti opakováními, 2) subtelomerické ITSs s několika stovkami párů bazí tandemových repetic, přičemž mnohé z nich mají změnu v jednom nebo více nukleotidech, a 3) fúzní ITSs, které vznikly fúzí chromozomů a vytvořily tak obrácené repetice (AZZALIN et al. 2001).

Z čistě cytogenetického hlediska lze ITSs rozdělit do dvou skupin (RUIZ-HERRERA et al. 2008). První z nich jsou heterochromatinizované ITSs (het-ITSs), které jsou asociovány s konstitutivním heterochromatinem, nachází se většinou v blízkosti centromery a mohou obsahovat až několik stovek tisíc párů bazí DNA, která je podobná telomerické DNA. Jejich přítomnost v genomu může způsobovat chromozomální nestabilitu (BOLZÁN & BIANCHI 2006). Předpokládá se, že mohou vznikat pomocí Robertsonových nebo tandemových fúzí, klouzáním DNA polymerázy, inverzemi a translokacemi. Jejich přítomnost můžeme očekávat také v místech chromozomálních zlomů a rozpadů chromozomů (RUIZ-HERRERA et al. 2008).

Druhou skupinu tvoří krátké ITSs (s-ITSs), které představují telomerické repetice dlouhé od několika málo až do stovek párů bazí. Mohou být rozšířené po celém chromozomu, ale některé s-ITSs vytváří specifické shluky, které se nacházejí v subtelomerické oblasti a jsou v uspořádání head-to-tail, což naznačuje, že mohly být dovnitř chromozomu vloženy pomocí transpozice nebo nasyntetizovány telomerázou při opravě dvouvláknových zlomů (RUIZ-HERRERA et al. 2008).

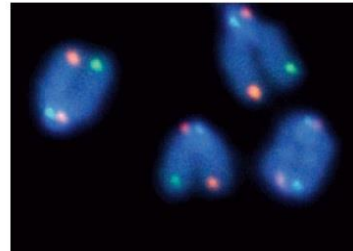
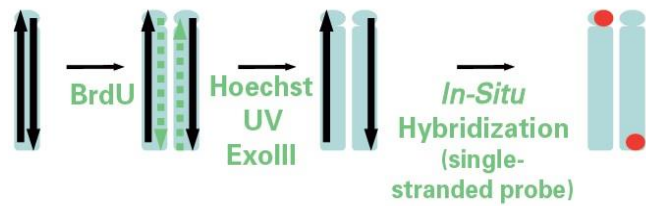
V mnohých studiích bylo dokázáno, že ITSs jsou místem, ve kterých dochází mnohem častěji ke zlomům, rekombinacím, přestavbám a amplifikacím (BERTONI et al. 1994; SLIJEPCEVIC et al. 1996; KILBURN et al. 2001), kromě toho mohou být součástí oprav DNA a regulace genové exprese (GLOVER & STEIN 1988; BALAJEE et al. 1994; TREMOUSAYGUE et al. 1999; RIVERO et al. 2004).

3.4.1.3. Způsoby detekce telomerických repetic

Mezi metody sloužící k detekci a kvantifikaci telomerických repetic patří Southern blot, kvantitativní PCR, průtoková cytometrie, fluorescenční hybridizace in situ (FISH), in situ značení DNA s primerem (PRINS), single telomere length analysis (STELA) a hybridization protection assay (SALDANHA et al. 2003; BAIRD 2005; FAJKUS et al. 2005; LIN & YAN 2005). Ne všechny z těchto metod mohou být použity pro detekci ITSs protože tyto sekvence mohou být někdy velmi krátké a obsahovat nukleotidové záměny (LIN & YAN 2005). K detekci ITSs může být použita klasická FISH, která využívá syntetických oligonukleoproteinových sond (MEYNE et al. 1990). Její velmi citlivou modifikací je PNA-FISH, kde je cukrfosfátová kostra nahrazena polyamidovou kostrou, která je odolná proti DNázám, RNázám, proteinázám a peptidázám (PELLESTOR & PAULASOVÁ 2004) a díky svému neutrálnímu náboji proniká lépe do chromozomu. PNA-FISH může být použita i ke stanovení délky telomerických repetic, a to např. pomocí kvantitativní FISH (Q-FISH) (BAIRD 2005). Orientaci telomerické sekvence na chromozomu lze zjistit pomocí tzv. Chromosome-Orientation FISH (CO-FISH) (princip viz obr. 8) (GOODWIN & MEYNE 1993). Metodou CO-FISH lze odlišit jednotlivé typy telomerických fúzí a detekovat sesterské výměny chromatid v oblasti telomer (T-SCEs) (BAILEY et al. 2004). Alternativní metodou k FISH je detekce telomerických repetic pomocí PRINS. Jako sonda slouží v tomto případě neznačená syntetická DNA komplementární k telomerické repetici, která slouží jako primer pro DNA polymerázu zařazující nukleotidy značené pomocí haptenu nebo fluorochromu (KOCH 2003). Tato metoda je oproti klasické FISH rychlejší a nevytváří nespecifické

hybridizace, proto je velmi vhodná pro detekci telomerických repetic a ITSs (YAN et al. 2004; YAN et al. 2007).

Obr. 8: Detekce telomerických repetic s rozlišením jejich orientace metodou CO-FISH. Buněčná kultura je po dobu jednoho buněčného cyklu pěstována s BrdU (bromdeoxyuridin, analog thymidinu). V mitoze jsou buňky sklizeny a fixovány na sklech s přidáním fluorescenčního barviva Hoechst 33258. Po osvětlení UV světlem se vytvoří jednovláknová přerušeni ve vláknech DNA obsahujících inkorporovaný BrdU, tato přerušeni jsou rozšířena exonukleázou III. Tímto procesem se



odstraní nově syntetizované vlákno DNA a zůstanou dvě původní vlákna, v každé chromatidě chromozomu je nyní jen jedno vlákno DNA. Jednovláknová sonda hybridizuje s komplementární telomerickou DNA. Na každé chromatidě se tak vizualizují pouze dva signály, na rozdíl od klasické FISH, při které pozorujeme čtyři signály. Metoda CO-FISH využívá dvou různě barevných sond, z nichž jedna nasedá na vlákno telomerické DNA bohaté na G, druhá na vlákno telomerické DNA bohaté na C (převzato z BAILEY et al. 2004)

4. Materiál a metody

4.1. Materiál

V této práci jsem studovala dvanáct druhů bičovců, dva druhy bičnatců, po jednom druhu z řádu krátkochvostů a roztočovců a dva zástupce z řádu pavouků (viz tab. 1). Exempláře byly získány od chovatelů, na burzách terarijních zvířat nebo přímým odchytém ve volné přírodě během expedic. Pavoukovci byli chováni v naší laboratoři v přiměřeně velkých plastových boxech, některé tropické druhy jsme umístili do termostatu s regulací teploty. V chovných boxech jsme se snažili imitovat podmínky, které mají jednotlivé druhy ve svém domovském prostředí pomocí substrátu udržujícího vlhkost a listů nebo kůry stromů. Hlavně u bičovců bylo třeba dbát na to, aby měli dostatečně velký kus vertikálně umístěné kůry pro bezproblémové svlékání. Pro sklípkoše zase byla podstatná silná vrstva substrátu, aby si mohli vytvářet podzemní chodbičky.

Řád: BIČOVCI		
Čeleď	Druh	Původ (sběratel)
Phrynidae	<i>Paraphrynus cubensis</i>	Kuba, Havana
	<i>Paraphrynus aff. mexicanus</i>	Mexiko, stát Morelos, Anenecuilco
	<i>Acanthophrynus coronatus</i>	Mexico, stát Morelos, Anenecuilco
	<i>Phrynus whitei</i>	Kostarika, severně od Liberia, Cuajiniquil (V. Šejna)
	<i>Heterophrynus elaphus</i>	Peru
Phrynichidae	<i>Damon medius</i>	Senegal, Zinguinchor (S. Huber)
	<i>Euphrynichus bacillifer</i>	z chovu (M. Seiter)
	<i>Phrynichus ceylonicus</i>	Srí Lanka
	<i>Phrynichus deflersi arabicus</i>	Saudská Arábie
	<i>Phrynichus dhofarensis</i>	z chovu, Omán (P. Weygoldt)
Charontidae	<i>Charon grayi</i>	Filipíny, ostrov Negros (M. Seiter)
Řád: BIČNATCI		
Čeleď	Druh	Původ
Thelyphonidae	<i>Thelyphonus</i> sp.	Indonésie, Lombok
	<i>Typopeltis</i> sp.	Malajsie
Řád: KRÁTKOCHVOSTI		
Čeleď	Druh	Původ
Hubbardiidae	<i>Stenochrus</i> sp.	Mexiko, stát Veracruz, pohoří Los Tuxtlas, biologická stanice UNAM
Řád: ROZTOČOVCI		
Čeleď	Druh	Původ
Ricinoididae	<i>Pseudocellus gertschi</i>	Mexiko, stát Veracruz, pohoří Los Tuxtlas, biologická stanice UNAM
Řád: PAVOUCI		
Čeleď	Druh	Původ
Liphistiidae	<i>Liphistius</i> sp. nov.	Malajsie
Pholcidae	<i>Pholcus phalangioides</i>	ČR, Praha

Tab. 1: Seznam studovaných druhů a jejich lokality resp. země původu.

Exempláře pro výrobu preparátů jsem vybírala pokud možno v subadultním nebo adultním stádiu. Většina druhů postrádala pohlavní dimorfismus nebo byl dimorfismus nezřetelný, bylo tudíž obtížné odlišit samce od samic. Pohlaví bylo tedy spolehlivě určeno až při samotné pitvě podle typu gonád. U samců bylo možné v subadultním a adultním stádiu zachytit meiotické dělení.

4.2. Metody

4.2.1. Výroba chromozomových preparátů

Chromozomové preparáty byly připraveny modifikovanou roztěrovou metodou (TRAUT 1976). Pavoukovci byli nejprve usmrceni, a to tak, že byli vloženi na několik minut (v závislosti na jejich velikosti) do mrazničky. Poté z nich byly pod stereolupou (Nikon) ve fyziologickém roztoku pro motýly rodu *Ephestia* (LOCKWOOD 1961) vypitvány gonády, střeva a případně i další orgány s vysokou frekvencí dělících se buněk jako jsou např. přídatné žlázy u některých bičovců. Tkáň se následně hypotonizovala 15 až 20 minut v 0,075M roztoku KCl p.a. (Lachema) a poté třikrát fixovala v čerstvě připravené směsi methanolu p.a. (Merck) nebo ethanolu p.a. (Sigma-Aldrich) a kyseliny octové p.a. (Merck) v poměru 3:1. Doba první fixace byla 6 min, druhé 10 min a třetí minimálně 20 min. Po fixaci byl na vyčištěné podložní sklíčko přenesen přiměřeně velký kousek tkáně a pasterkou se k němu přidaly 3-4 kapky disociačního roztoku (60% kyselina octová). Pod stereolupou byla pomocí wolframových jehel z tkáně vytvořena suspenze buněk a sklíčko bylo přeneseno na histologickou ploténku o teplotě 40 °C. Suspenze buněk byla roztírána po povrchu sklíčka pomocí wolframové jehly do té doby, než se téměř odpařila a její zbytek byl sklepnut na filtrační papír. Kvalita preparátů byla kontrolována pod fázovým kontrastem v mikroskopu (Olympus). Tkáň pro preparáty určené k C-pruhování byla fixována vždy směsí methanolu a kyseliny octové a preparáty byly vyráběny na histologické ploténce o nižší teplotě (35 °C), aby bylo minimalizováno poškození chromatinu.

Preparáty se mohly barvit až další den, a to 27 min 5% roztokem Giemsky (Merck) v Sørensenově pufru (pH = 6,8), nebo byly uskladněny v ledničce pro další experimenty jako C-pruhování či stříbření. Vysoce kvalitní skla určená pro FISH a CGH byla odvodněna v ethanolové řadě (70%, 80%, 96%) a uskladněna v hlubokomrazícím boxu při -75°C.

Preparáty obarvené Giemsou a preparáty po stříbření byly pozorovány mikroskopem Olympus BX 50. Vhodné figury byly fotografovány pod imerzním objektivem 100x CCD kamerou DP71 a programem CellD (Olympus). Fluorescenčně značené preparáty byly

pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu Olympus IX81 a fotografovány vysoce citlivou CCD kamerou (Hamamatsu) v programu Cell[^]R (Olympus). Fluorescenčně pruhované preparáty byly pozorovány ve fluorescenčním mikroskopu Olympus AX70 a fotografovány CCD kamerou. Získané snímky byly upraveny v programech Adobe Photoshop Elements 5.0 a Corel PHOTO-PAINT X5.

U některých skupin tetrapulmonátů nejsou v metafázi mitotického dělení zřetelné primární konstriktce, které jsou důležité pro stanovení morfologie chromozomů. Karyotypy byly tedy sestaveny z metafází druhého meiotického dělení, a to v programu Corel Photo Paint X5. U některých druhů se ale nevyskytovaly ani vhodné figury v metafázi II, proto u nich uvádím pouze diploidní počet chromozomů a jejich přibližnou morfologii. U druhů s vhodnými metafázemi II byly v programu ImageJ (Levan plugin) měřeny 4 reprezentativní figury, přičemž chromozomy každé z nich byly proměřovány třikrát. Tímto způsobem byla zjištěna relativní délka jednotlivých chromozomových párů a jejich centromerické indexy. Relativní délka chromozomu se vyjadřuje v procentech z celkové délky všech chromozomů v karyotypu. Centromerický index je poměr delšího raménka (q) ke kratšímu raménku (p). V práci byla použita Levanova klasifikace morfologie chromozomů (LEVAN et al. 1964).

4.2.2. Pruhovací techniky

4.2.2.1. Detekce jadérek dusičnanem stříbrným

Tato metoda byla použita pro detekci jadérek. Byla prováděna podle protokolu HOWEL & BLACK (1980) s modifikacemi podle DOLEJŠ (2011). Aplikována byla jak na preparáty obarvené Giemsou, tak i na neobarvené preparáty Na sklíčko byly skleněnou tyčinkou nanесeny tři kapky 2% želatiny (roztok želatiny byl okyselen před použitím 1ml kys. mravenčí) a 7 kapek 50% AgNO₃, které byly smíchány a jemně rozetřeny po celé ploše sklíčka. Preparát se zakryl krycím sklíčkem a přenesl se na histologickou ploténku o teplotě 50 °C, na kterou byly položeny čtyři vrstvy buničiny. Po asi 6 min, když získal preparát cibulově žlutohnědé zbarvení, bylo sklíčko smyto pod proudem studené vody. Po oschnutí jsem skla mohla pozorovat pod mikroskopem.

4.2.2.2. C-pruhování

Metoda C-pruhování se používá k vizualizaci konstitutivního heterochromatinu (SUMNER 1972). Preparáty, které jsou pro tuto metodu použity, by měly být 3-5 dní staré. Prvním krokem bylo vložení preparátů do inkubátoru (60 °C, 1 hod). Po ochlazení na pokojovou teplotu byly ponořeny na 45 min do 0,2M roztoku HCl (Penta) a poté opláchnuty v destilované vodě. Preparáty byly sušeny 2 hod při pokojové teplotě. Následovala

denaturace, při které byla skla ponořena na 3-5 min do kyvety s roztokem Ba(OH)₂ (Lachema) (ve vodní lázni o teplotě 40 °C,). Aby bylo zabráněno vysrážení uhličitanu barnatého na preparátech, byla skla po vyjmutí z roztoku Ba(OH)₂ omyta nejprve v kádince s destilovanou vodou o teplotě 40 °C a poté v kádince s destilovanou vodou o pokojové teplotě. Preparáty byly opět sušeny při pokojové teplotě, a to 2,5 hod. Následovala renaturace chromozomové DNA na sklech: preparáty byly ponořeny do kyvety s 2xSSC ve vodní lázni (75 min, 60 °C). Poté byly znovu omyly v destilované vodě a sušeny přes noc při pokojové teplotě. Skla mohla být barvena nejdříve následující den. K barvení byl použit 5% roztok Giemsy (Merck) v Sørensenově pufru (pH = 6,8) (75 min).

4.2.2.3. Fluorescenční pruhování

Metodou fluorescenčního pruhování byly vizualizovány AT a GC bohaté oblasti DNA chromozomů. V našem případě byl jako GC specifický fluorochrom použit chromomycin A3 (Sigma-Aldrich) a jako AT specifický fluorochrom DAPI (Sigma-Aldrich). Fluorescenční pruhování bylo provedeno podle protokolu MAYR et al. (1985) a SOLA et al. (1992). Preparáty byly nejprve dehydratovány v ethanolové řadě umístěné na ledu (2 min v každé kyvetě). Po oschnutí se byla skla přemístěna na 10 min do pufru McIlvain (roztok kys. citrónové a hydrogenfosforečnanu sodného) obohaceného o MgCl₂ (pH=7). Následně bylo na preparáty nanášeno 150μl chromomycinu A3, skla byla překryta krycími sklíčky a inkubována 15 min ve vlhké komůrce při teplotě 37 °C. V dalším kroku byla skla promyta v čistém pufru McIlvain, poté byla odstraněna krycí sklíčka a preparáty byly ponořeny na 15 min do methylzeleně (35mg methylzeleně v 100ml pufru McIlvain). Po dalším oplachu skel v čistém pufru McIlvain se na skla nanášelo DAPI (5μl DAPI ve 100ml pufru McIlvain). Preparáty byly překryty krycími sklíčky inkubovány ve tmě po dobu 20 min při pokojové teplotě. Skla byla opět omyta v čistém McIlvainově pufru, osušena filtračním papírem. Nakonec na ně bylo nanášeno 40μl glycerolu, který byl použit jako montovací medium. Poté se preparáty překryly krycími skly, roztok pod krycím sklem byl uzavřen lakem na nehty.

4.2.3. Fluorescenční hybridizace in situ (FISH)

Metoda FISH je založena na tom, že hybridizuje značená sonda s cílovou DNA na základě komplementarity bazí.

Sondy pro všechny typy FISH připravoval RNDr. Petr Nguyen z laboratoře molekulární cytogenetiky Entomologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích. Metoda CGH byla prováděna v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AVČR v Liběchově se značným přispěním Mgr. Alexandra Sembera.

4.2.3.1. Detekce NORů pomocí 18S rDNA FISH s nepřímo značenou sondou

Prvním krokem metody fluorescenční hybridizace in situ (FISH) je výroba příslušné sondy. Sonda pro detekci NORů byla připravena z genomické DNA (gDNA) pavouka druhu *Dysdera erythrina*. Pro izolaci gDNA byla použita chloroform/fenol/izoamylalkoholová extrakce (GRAHAM 1978) a izolovaná gDNA poté sloužila jako templát pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR). Primery pro PCR reakci byly na zakázku připraveny firmou Generi Biotech (Hradec Králové, ČR) a měly tyto sekvence: 18S-Araneae-forward primer (5'-CGAGCGCTTTTATTAGACCA – 3') a 18S-Araneae-reverse primer (5'-GGTTCACCTACGGAAACCTT – 3'). PCR reakce o objemu 25µl obsahovala 1x Ex Taq pufr a 2 jednotky TaKaRa Ex Taq HS DNA polymerázy (Takara, Otsu, Japan), 200µmol dNTP/µl mixu, 500nmol každého primeru/µl a 100ng templátové gDNA. PCR reakce proběhla ve 35 cyklech následujícím způsobem: denaturace při 94 °C, 1 min, nasedání primerů při 50 °C, 1 min a prodlužování řetězce při 72 °C, 1 min. Úvodní denaturace byla prodloužena na 3 min a prodlužování řetězce v posledním cyklu bylo prodlouženo na 5 min. Produkt, který vznikl PCR reakcí, byl rozdělen na 1% agarózovém gelu. Poté byl vyříznut proužek, který odpovídal hledané sekvenci, byl extrahován kitem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, GmbH), načež byl použit jako templát pro amplifikaci v další PCR. Výsledný produkt byl označen nick translací, a to pomocí biotin-14-dATP s využitím kitu Bionick Labeling System (Invitrogen, Life Technologies).

K sondě značené 18S rDNA biotinem byla přidána DNA z lososích spermií o koncentraci $c = 10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Sigma-Aldrich), na jeden preparát bylo použito 1µl sondy a 2,5µl DNA lososích spermií. V dalším kroku bylo nutné sondu precipitovat, což bylo zajištěno přidáním předchlazeného Na-acetátu a 96% ethanolu (oba -20°C), směs byla následně uložena v hlubokomrazícím boxu (-75°C). Množství Na-acetátu odpovídalo 1/10V a ethanolu 2,5xV, kde V je součet objemu sondy a DNA lososích spermií. Po jedné hodině byla směs vyndána z boxu a centrifugována při 13 tis. otáček/min po dobu 20 min. Poté byl odstraněn supernatant a přidán 70% ethanol, jehož množství odpovídalo minimálně 4xV. Následovala opět centrifugace, tentokrát 13 tis. otáček/min po dobu 15 min a znovu odstranění supernatantu. Hybridizační směs byla vložena do termomixu o teplotě 37 °C na 3 min, aby se odpařil zbylý ethanol. Po vysušení byla sonda rozpuštěna ve 100% deionizovaném formamidu (Sigma-Aldrich), opět v termomixu o teplotě 37 °C (po dobu 30 min při neustálém třepání). Poté byl přidán 20% dextran sulfát, směs byla krátce centrifugována, vortexována a na 5min vložena do vodní lázně o teplotě 95 °C, kde se denaturovala. Po uplynutí 5 min byla rychle vložena do

ledu, aby nedošlo k její renaturaci. Množství přidaného formamidu a dextran sulfátu bylo totožné, a to 5 μ l na preparát.

Současně s přípravou hybridizační směsi probíhala i příprava skel pro hybridizaci. Preparáty byly odvodněny ve vzestupné ethanolové řadě (70%, 80%, 96%) (Merck) a skla se nechala oschnout. Pro odstranění RNA byly použity na každé sklo 2 μ l RNázy A (c= 10mg/ml) (Biotech), 10 μ l 20xSSC a 88 μ l redestilované vody. Skla byla zakryta krycími sklíčky a inkubována 1 hod při teplotě 37°C. Poté byla omyta 2x v kyvetách s 2xSSC ve vodní lázni o teplotě 37°C po dobu 5 min.

V případě, že bylo zapotřebí ze skel odstranit cytoplazmu (v našem případě konkrétně u krátkochvostů a roztočovců), mohla být kdykoli provedena inkubace v proteináze K. Nejprve byly preparáty vloženy na 4 hodiny do inkubátoru o 65 °C a to z toho důvodu, aby po inkubaci s proteinázou K nedocházelo k uvolnění materiálu ze skel. Poté byla skla přemístěna na 5 min do kyvety s 40ml 1xPBS a 2 μ l proteinázy K (20mg/ml) (Sigma-Aldrich). Následně byla promyta 2x po 5 min v kyvetách s 1x PBS. Všechny tři kyvety byly umístěny ve vodní lázni o 37 °C.

Dalším krokem bylo vložení skel na 30 min do kyvety s 6ml 50x Denhardtova činidla a 54ml redestilované vody. Kyveta byla ve vodní lázni o 37°C se zapnutým třepáním. Následně byla skla přemístěna do kyvety s 28ml formamidu FLUKA p.a. (Sigma-Aldrich), 4ml 20xSSC a 8ml redestilované vody, která byla ve vodní lázni o teplotě 68°C. Po třech minutách byla skla rychle vložena na 1 min do 70% ethanolu, který byl vychlazen na -20 °C a dále odvodňována v 80% a 90% ethanolu po 30 s. Když byly preparáty oschlé, na každý z nich bylo aplikováno 10 - 20 μ l hybridizační směsi. Preparáty byly následně překryty krycím sklíčkem. Okraje krycího skla byly přitmeleny k podložnímu sklu Rubber cementem (Marabu). Preparáty byly jeden den inkubovány ve tmě při teplotě 37 °C v hybridizační komůrce s filtračním papírem napuštěným 2x SSC.

Následující den byl odstraněn Rubber cement a na každý preparát bylo použito asi 500 μ l 2,5% BSA (Fluka)/ 4x SSC, aby došlo k vyblokování nespecifických vazebných míst pro následně aplikované protilátky. Poté byl preparát překryt krycím sklíčkem a vložena na 20 min do hybridizační komůrky s filtračním papírem napuštěným 2x SSC. Následně byla krycí sklíčka odstraněna. Na každé sklo bylo přidáno 100 μ l směsi obsahující 0,1 μ l streptavidin-Cy3 (Jackson Immuno Research Laboratories) ve 100 μ l 2,5% BSA/4x SSC. Po 30 min inkubace v hybridizační komůrce byly preparáty vloženy do kyvet s 0,1% Tween 20/4x SSC, inkubace

probíhala ve vodní lázni (37 °C) za neustálého třepání po dobu 3x 3 min. Opět následovalo zablokování reakce pomocí 2,5% BSA v 4x SSC po dobu 20 min. Poté bylo na každé sklo přidáno 52μl směsi obsahující 50μl 2,5% BSA v 4x SSC a 2μl biotinylovaného antistreptavidinu (Vector Labs, Inc.) z důvodu zesílení intenzity primárního signálu. Inkubace s antistreptavidinem probíhala v 37 °C po dobu 20 min. Následně opět proběhlo promývání v kyvetách s 0,1% Tween 20, reakce na sklech byla znovu zablokována pomocí BSA. Následovalo opětovné zesílení signálu pomocí streptavidinu a opětovná inkubace skel v Tween 20. Po oschnutí byly chromozomy na preparátech podbarveny pomocí DAPI procesem, který zahrnoval promývání v sérii roztoků v kyvetách ve vodní lázni za neustálého třepání. Nejprve byly preparáty vloženy do kyvety s 1% Triton X (Sigma-Aldrich)/1x PBS po dobu 5 min. Poté byly na 8 min přemístěny do kyvety s roztokem, který obsahoval 100μl DAPI (Sigma-Aldrich) v 40ml 1% Triton X/1x PBS. Následně byla skla promyta po dobu 2-5 min v 1% PhotoFlo (Sigma-Aldrich)/1x PBS. Nakonec byla vložena na 1 min do kyvety s roztokem 1% PhotoFlo/redestilovaná voda. Po oschnutí bylo na preparáty přidáno 20-25μl antifade DABCO (Sigma-Aldrich, vyrobené podle protokolu MEDIOUNI et al. 2004), preparáty byly překryty krycím sklíčkem. Přebytky byly vytlačeny pomocí filtračního papíru, okraje krycího skla byly přitmeleny k podložnímu sklu lakem na nehty. Poté bylo možné skla prohlížet pod fluorescenčním mikroskopem.

4.2.3.2. Telomerická FISH s nepřímou značenou sondou

Sonda pro detekci telomerického motivu (TTAGG)_n byla připravena metodou beztemplátové PCR podle SAHARA et al. (1999). Pro tuto metodu byly navrženy dva primery, 5'-TAGGTTAGGTTAGGTTAGGT-3' a 5'-CTAACCTAACCTAACCTAAC-3', které na zakázku připravila firma Generi Biotech (Hradec Králové, ČR). Vzhledem k tomu, že primery obsahují několik tandemově uspořádaných repetice telomerické sekvence, s velkou pravděpodobností na sebe nasednou nerovnoměrně za vytvoření duplexu s přesahujícími jednovláknovými úseky DNA. Díky tomu je vytvořen přímo komplex primer:templát. PCR reakce o objemu 20μl obsahovala 50 mmol/μl KCl, 10 mmol/μl Tris-HCl (pH 8.3), 1,5 mmol/μl MgCl₂, 200 μmol/μl každého typu dNTP, 0,5 μmol/μl každého z primerů a 2 jednotky Taq DNA polymerázy (GibcoBRL, Life Technologies Inc.). Počáteční cyklus, kdy denaturace probíhala 90 s při teplotě 94 °C, byl následován 30 cykly, každý se skládal z denaturace při 94 °C po dobu 45 s, nasedání primerů při teplotě 52 °C po dobu 30 s a prodlužování řetězce při 72 °C po dobu 1 min. Závěrečné prodloužení řetězce pak trvalo 10 min. Výsledným produktem byla heterogenní směs molekul DNA o délce okolo 1kb. Sonda

byla značena nepřímo, s využitím biotinylovaného dATP (biotin-14-dATP) metodou nick translace s využitím kitu Bionick Labeling System (Invitrogen, Life Technologies) podle protokolu výrobce. Následná FISH probíhala totožným způsobem jako FISH pro detekci NORů.

4.2.3.3. Telomerická FISH s přímo značenou sondou

Příprava přímo značené sondy se liší pouze tím, že při nick translaci místo biotinylovaných nukleotidů použijeme nukleotidy s přímo navázaným fluorochromem, v našem případě dCTP-Cy3 (Amersham Life Science) s využitím kitu Nick Translation Mix (Roche Diagnostics GmbH) podle protokolu výrobce.

Hybridizační směs se připravuje stejně jako v předchozích případech. Příprava skel však byla mnohem jednodušší. Nejprve byly preparáty odvodněny vzestupnou alkoholovou řadou (70 %, 80 %, 96 %) a poté se nechaly oschnout. Následná denaturace preparátů proběhla v 70% formamidu/2xSSC ve vodní lázni (68°C, 3,5 min.). Skla byla poté ihned přenesena do vychlazeného 70% ethanolu (1 min.) a poté do 80% a 90% ethanolu (30 s, RT). Po oschnutí skel bylo možné nanést na ně hybridizační směs, překrýt je krycím sklíčkem a jeho okraje uzavřít Rubber cementem. Inkubace probíhala 3 dny ve tmě v 37 °C v hybridizační komůrce s filtračním papírem napuštěným 2x SSC.

Po třech dnech byl odstraněn Rubber cement a skla byla inkubována v kyvetách s 1% roztokem Triton X-100/0 v1x SSC. První kyveta byla v pokojové teplotě, druhá ve vodní lázni o teplotě 62 °C. Inkubace v první kyvetě usnadnila odstranění Rubber cementu, v druhé byla skla ponechána po dobu 5 min za neustálého třepání. Následovalo barvení stejným způsobem jako při FISH pro detekci NORů nebo telomerické FISH s nepřímo značenou sondou.

4.2.3.4. CGH

Použitá metoda CGH byla kombinací několika protokolů (TRAUT et al. 1999, 2001; BI & BOGART 2006) s několika modifikacemi. Nejprve byla izolována gDNA obou pohlaví pomocí chloroform/fenol/izoamylalkoholové extrakce (GRAHAM 1978). Pro získání většího množství kvalitnější DNA byly při této metodě použity eppendorfky s Phase Lock Gelem (PLG) (5 Prime). Kontrola kvality a koncentrace izolované DNA byla provedena na fluorimetru (Qubit) a spektrofotometricky na NanoDropu (ND-1000 Spectrophotometer). Pokud byla kvalita DNA vyhovující, byla z DNA připravena sonda a případně i kompetitor. Sondy byly značeny nepřímo, a to nick translací pomocí Roche Nick Translation Mix (Roche)

podle protokolu výrobce. Modifikovaný nukleotid biotin-16-dUTP (Roche) byl detegován protilátkou streptavidin-FITC (fluorescein isothiokyanát) (Invitrogen Life Technologies) a značil samičí pohlaví. Digoxigenin-11-dUTP (Roche) byl detegován protilátkou anti-digoxenin-rhodamin (Roche) a značil samčí pohlaví. Nick translace probíhala tak dlouho, dokud sondy neměly požadovanou velikost 100-500bp (obvykle v rozsahu 6-9 hod.). Aby nedocházelo k nespecifické hybridizaci, byla z genomové DNA obou pohlaví připravena také specifická kompetitivní DNA. Ta byla z důvodu omezeného množství vstupního izolátu DNA amplifikována pomocí kitu Illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit (GE, Healthcare) a následně sonikována sonikátorem Sonopuls HD 2070 (Bandelin Electric), dokud délka výsledných fragmentů nebyla stejná nebo menší než délka fragmentů naznačené sondy. Hybridizační směs na jeden preparát obsahovala: 1 µg sondy každého hybridizovaného genomu, 10-20 µg neznačené sonikované kompetitivní DNA genomu opačného pohlaví než bylo pohlaví exempláře na preparátu s kterým jsme pak směs hybridizovali a 100 µg nespecifické kompetitivní DNA z lososích spermií. Tato směs byla nejprve precipitována 96% ethanolem, poté promyta 70% ethanolem, vysušena na vzduchu a resuspendována ve 25-30 µl CGH mixu, který obsahoval 50% formamid, 10% dextran sulfát, 2x SSC, 0,04M NaPO₄ pufr, 0,1% SDS a Denhardtovo činidlo.

Preparáty pro hybridizaci byly připraveny následujícím způsobem. Nejprve byla skla dehydratována v 70%, 80% a 96% ethanolu, v každém po dobu 3 min. Po uschnutí byly preparáty umístěny na 3 hod do termoboxu (37 °C) - tzv. stárnutí skel. Aby nedocházelo k přílišnému narušení chromozomů proteinázou (viz dále), byla skla na dalších 30 min umístěna na ploténku o 60°C. Poté byly preparáty na 5 min vloženy do kyvety s roztokem 2xSSC. V dalším kroku byla skla inkubována při teplotě 37 °C ve 200ng/ml RNáze A (Top Bio) ve 2xSSC po dobu 90 min. Po omytí skel ve 2xSSC, byly preparáty opět dehydratovány v ethanolové řadě, poté byla skla inkubována 5 min v 1x PBS. Cytoplazma byla odstraněna inkubací v roztoku pepsinu (50µl pepsinu, 99ml 1N HCl a 99ml redestilované vody, při 37 °C, po dobu 3 min). Poté se preparáty vložily na 1 min do 1xPBS a znovu byly dehydratovány v ethanolové řadě. Následně byly preparáty umístěny na 30-60 min do termoboxu (37 °C). Preparáty byly denaturovány v 75% formamidu/2xSSC (74-75 °C, 3 min) a poté opět dehydratovány v ethanolové řadě (vymražený 70% ethanol, 3 min; 80% a 96% ethanol RT, 3 min.) Hybridizační směs byla denaturována při teplotě 86 °C po dobu 6 min a poté ihned vložena na led minimálně na 10 min. Na každé sklo byla použita celá daná hybridizační směs, tedy 25-30 µl. Preparát byl překryt krycím sklem, které bylo k preparátu

přítmeleno Rubber cementem. Hybridizace byla prováděna ve tmě po 3 dny, při teplotě 37 °C v hybridizační komůrce napuštěné 2xSSC. Po uplynutí této doby byl odstraněn Rubber cement i krycí sklíčka a preparáty byly dvakrát omyty v 50% formamidu/2xSSC (10 min) ve vodní lázni (42 °C), poté třikrát v 1xSSC (7 min v každé) při stejné teplotě a nakonec v 2xSSC po dobu asi 20 s při pokojové teplotě. Tvorba nespecifických signálů byla redukována následujícím způsobem. Na každý preparát bylo nanášeno 500μl roztoku obsahujícího 3xBSA (Baria) v 4xSSC/ 0,01% Tween 20. Skla s tímto roztokem byla inkubována 20 min při 37 °C. Sondy byly detekovány pomocí protilátek, a to konkrétně anti-digoxigeninem konjugovaným s rhodaminem a nebo streptavidinem konjugovaným s FITC. Detekce probíhala postupně, nejdříve jedna protilátka a v dalším kole druhá. Složení směsi s konkrétní protilátkou v objemu na jeden preparát byla následující: 10μl anti-dig-rhodaminu ve 150μl 0,5% BSA/ PBS, respektive 2μl streptavidin-FITC v 200μl 10% FBS/ PBS (= fetal bovine serum). Po nanášení roztoku první protilátky na preparát proběhla následně inkubace v termostatu po dobu 60 min při 37 °C. V dalším kroku byla skla promyta 4x7 min v kyvetách se 4xSSC/0,01% Tween 20 ve vodní lázni o teplotě 42 °C. Poté byl znovu aplikován roztok 500μl 3% BSA v 4xSSC/0,01% Tween 20 po dobu 20 min v termostatu (37 °C) a následovala detekce s druhou protilátkou. Po opětovném promytí preparátů 4x7 minut v kyvetách 4xSSC/0,01%Tween bylo na skla nanášeno DAPI v montovacím mediu (Cambio). Preparáty byly překryty krycími sklíčky, roztok pod krycím sklem byl uzavřen přítmelením krycího skla k preparátu lakem na nehty.

5. Výsledky

5.1. Řád bičovci (Amblypygi) (THORELL 1883)

5.1.1. Čeleď Phryniidae (BLANCHARD 1899)

5.1.1.1. Rod *Paraphrynus* (MORENO 1940)

V rámci tohoto rodu jsem se zabývala druhem *P. cubensis* (QUINTERO 1983) a dále dosud nepopsaným druhem příbuzným *P. mexicanus*, který ve své práci označuji jako *P. aff. mexicanus*.

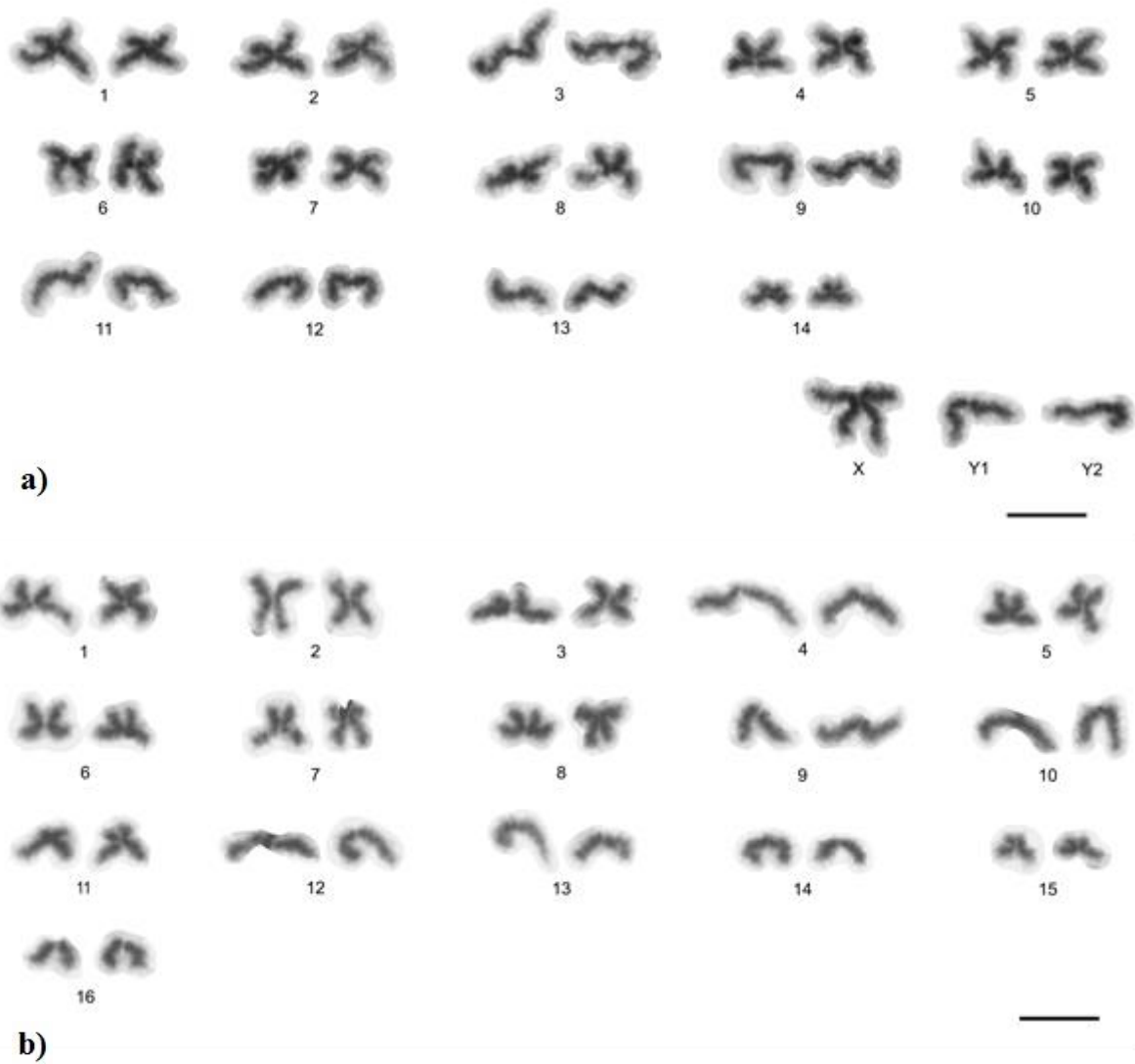
Všechny exempláře *P. aff. mexicanus* pochází ze stejné lokality v mexickém státě Morelos. Přesto jsme u samců získali dva různé karyotypy. První je tvořen 31 chromozomy, karyotypová data pro jeho sestavení poskytl A. Sember (viz obr 9). Obsahuje 28 autozomů, 9 párů je metacentrických resp. submetacentrických a 4 submetacentrické popř. akrocentrické. Pohlavní chromozomy byly zastoupeny metacentrickým X, submetacentrickým Y₁ a akrocentrickým Y₂ (viz tab. 2). Segregace pohlavních chromozomů byla pravidelná. V anafázi I a metafázi II jsme pozorovali chromozom X v jiné sesterské figuře než chromozomy Y₁ a Y₂. Poměr velikostí pohlavních chromozomů X:Y₁:Y₂ je přibližně 2:1,1:1, kdy velikost chromozomu X je přibližně součtem velikostí chromozomů Y₁ a Y₂. Druhý karyotyp je tvořen 32 chromozomy (viz obr 9). Morfologie chromozomů je podobná jako v prvním případě, karyotyp se skládá z 9 metacentrických případně submetacentrických párů a 7 submetacentrických popř. akrocentrických párů (viz tab. 3). V tomto karyotypu nebyly diferencovány heteromorfní pohlavní chromozomy. Samice mají 30 chromozomů. Detekce rDNA pomocí FISH ukazuje u obou typů samců NOR umístěný v pericentrické oblasti dlouhého raménka chromozomového páru se submetacentrickou morfologií (Obr. 10). U typu s morfologicky diferencovanými pohlavními chromozomy byly pomocí přímo i nepřímo značené telomerické FISH detekovány (TTAGG)_n repetice na koncích všech chromozomů a v subdistální oblasti jednoho chromozomu (i když se repetice ve skutečnosti pravděpodobně vyskytuje u obou chromozomů z daného páru) (viz obr. 11). U tohoto typu byla použita také metoda CGH. Na preparátech ze samce byl v diakinezi a diplotene na trivalentu XY₁Y₂ odhalen krátký úsek, specifický pro samčí pohlaví (viz obr. 12). Na metafázi II bylo patrné, že tento úsek je pouze na jenom z submetacentrických nebo akrocentrických Y chromozomů a to na jeho koncích (viz obr. 13). Kromě toho se však vizualizoval i další úsek specifický pro samčí pohlaví, který byl mnohem delší a byl dobře patrný ve všech mitotických a meiotických fázích. Tento úsek byl vizualizován i při použití kompetitivní DNA. Umístěn byl na bivalentu,

v místě slabě barveném DAPI (viz obr. 12). V metafázi II byl tento signál pozorován v pericentrické části metacentrického chromozomu (viz obr. 11). Na preparátech ze samice byl větší počet samčích i samičích signálů, nejvýraznější signál specifický pro samice pak byl pouze na jednom chromozomu z chromozomového páru (viz obr. 12). Fluorescenční pruhování u obou typů samců odhalilo několik distálních a subdistálních bloků bohatých na GC páry. Při porovnání výsledků fluorescenčního pruhování se CGH bylo u samců s trivalentem XY_1Y_2 zjištěno, že místo na bivalentu specifické pro samce se barví o něco slaběji DAPI než chromomycinem A3, což značí oblast bohatou spíše na GC páry (viz obr. 13).

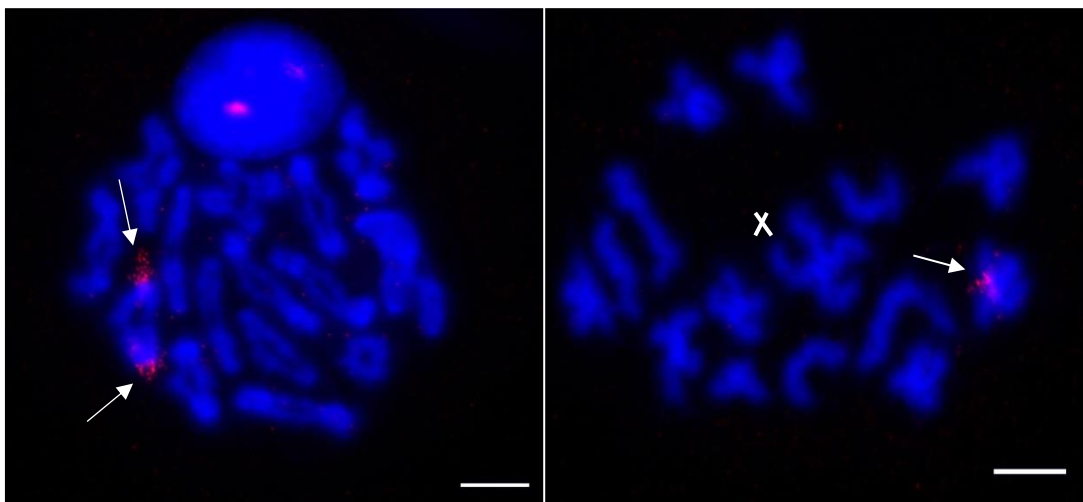
Pár č.	Průměrná relativní délka páru popř. chromozomu	Průměrný centromerický index	Morfologický typ
1	3,84	1,45	M
2	3,72	1,40	M
3	3,71	12,18	A
4	3,45	1,08	M
5	3,45	1,13	M
6	3,40	1,23	M
7	3,34	1,08	M
8	3,34	1,42	M
9	3,27	13,47	A
10	2,87	1,17	M
11	2,57	11,62	A
12	2,51	8,61	A
13	2,31	6,24	ST
14	2,25	1,52	M
X	5,61	1,33	M
Y ₁	3,37	6,98	ST
Y ₂	2,92	12,12	A

Pár č.	Průměrná relativní délka páru	Průměrný centromerický index	Morfologický typ
1	3,82	1,38	M
2	3,69	1,22	M
3	3,69	1,55	M
4	3,62	16,16	A
5	3,46	1,14	M
6	3,39	1,30	M
7	3,34	1,29	M
8	3,33	1,13	M
9	3,19	6,66	ST
10	3,01	21,69	A
11	3,01	11,62	A
12	3,00	1,89	SM
13	2,72	11,08	A
14	2,50	11,33	A
15	2,16	1,61	M
16	2,10	7,14	A

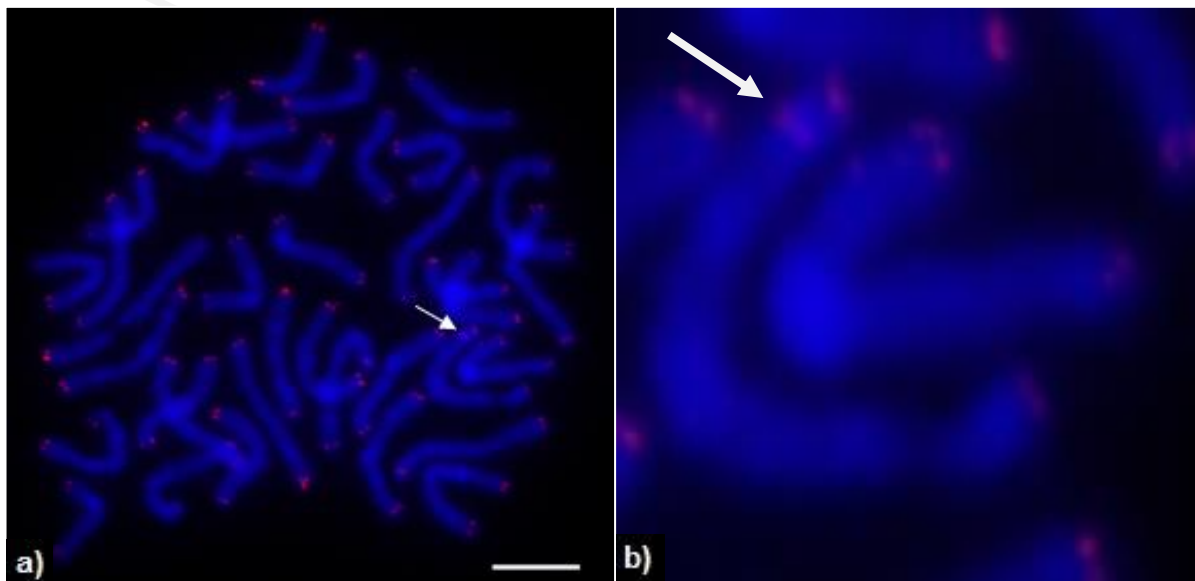
Tab. 2 a 3: Charakteristika karyotypu samců *P. aff. mexicanus* (první typ) a (druhý typ). Morfologie chromozomů: M – metacentrický, SM – submetacentrický, ST – subtelocentrický, A - akrocentrický



Obr. 9: Karyotypy samiců *Paraphrynus aff. mexicanus* (a) první typ, (b) druhý typ. Měřítka - 10 μm.

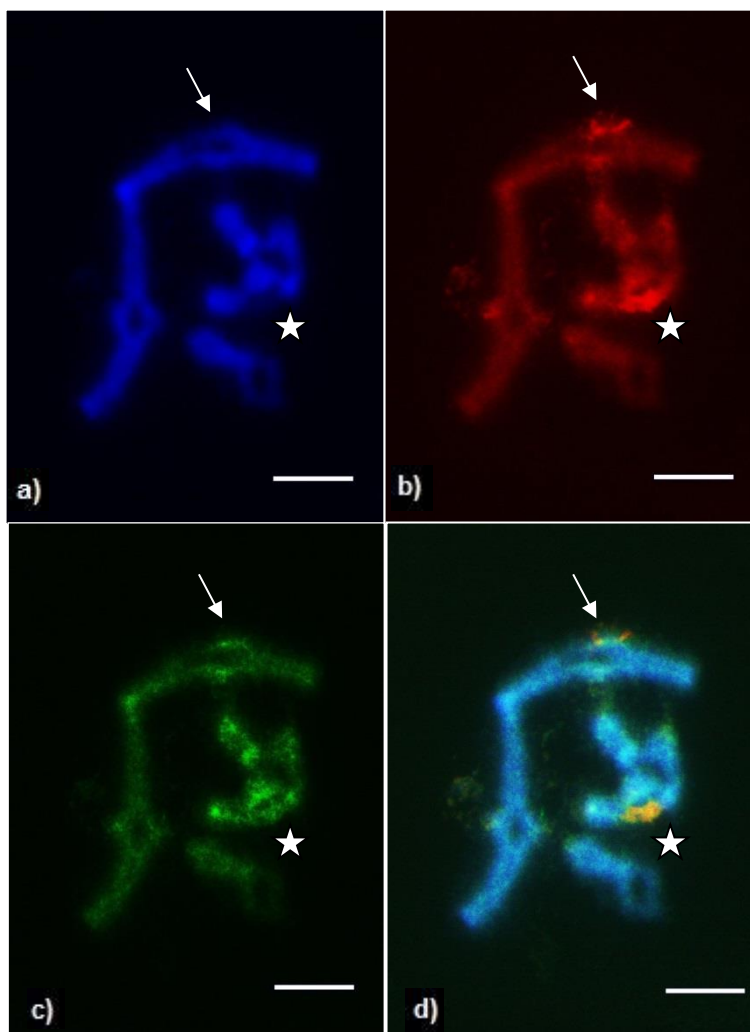


Obr. 10: Detekce NOR u samce *Paraphrynus aff. mexicanus* (první typ, tj. s trivalentem XY_1Y_2) pomocí FISH se 18S rDNA sondou. šipky označují hybridizační signály. (a) diakineze, signály na jednom bivalentu. (b) sesterská figura metafáze II s X chromozomem. NOR v pericentrické oblasti na dlouhém raménku metacentrického autozomu. Měřítka - 10 μm.

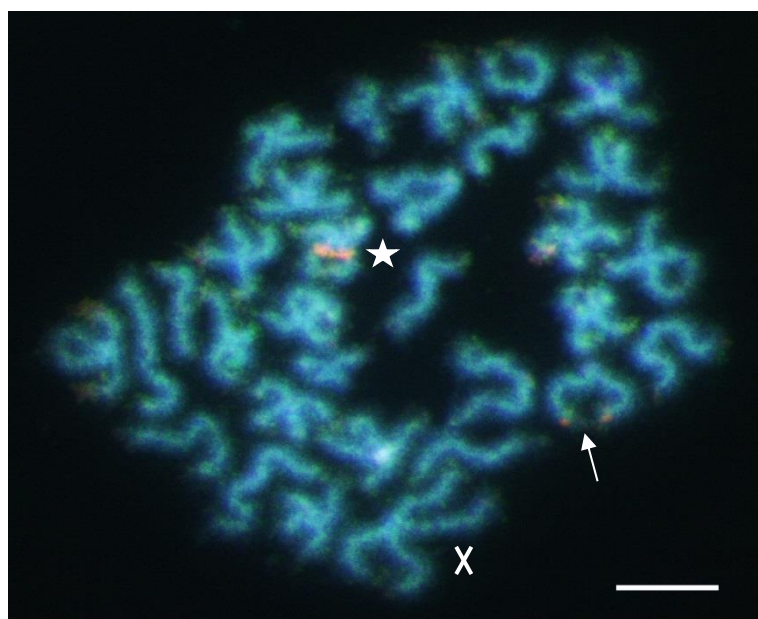


Obr. 11: Detekce telomerických repetic u samce *Paraphrynus aff. mexicanus* (první typ) pomocí telomerické FISH s přímo značenou sondou. Mitotická metafáze. Šipka označuje místo kde došlo pravděpodobně k vizualizaci intersticiálních telomerických repetic.(b) je zvětšením (a) v místě výskytu intersticiálních telomerických repetic. Měřítko - 10 μ m.

Obr. 12: Detekce samčích specifických signálů metodou CGH u *Paraphrynus affinis mexicanus* (první typ), preparát ze samce, diplotene. Šipka označuje signál specifický pro samce na trivalentu XY₁Y₂. Hvězdička označuje místo specifické pro samce na bivalentu. (a) DAPI - je patrné, specifický pro samce umístěný na bivalentu se barví slaběji. (b) Rhodamin – samčí sonda. (c) FITC – samičí sonda (d) Složený obrázek. Měřítko - 10 μ m.

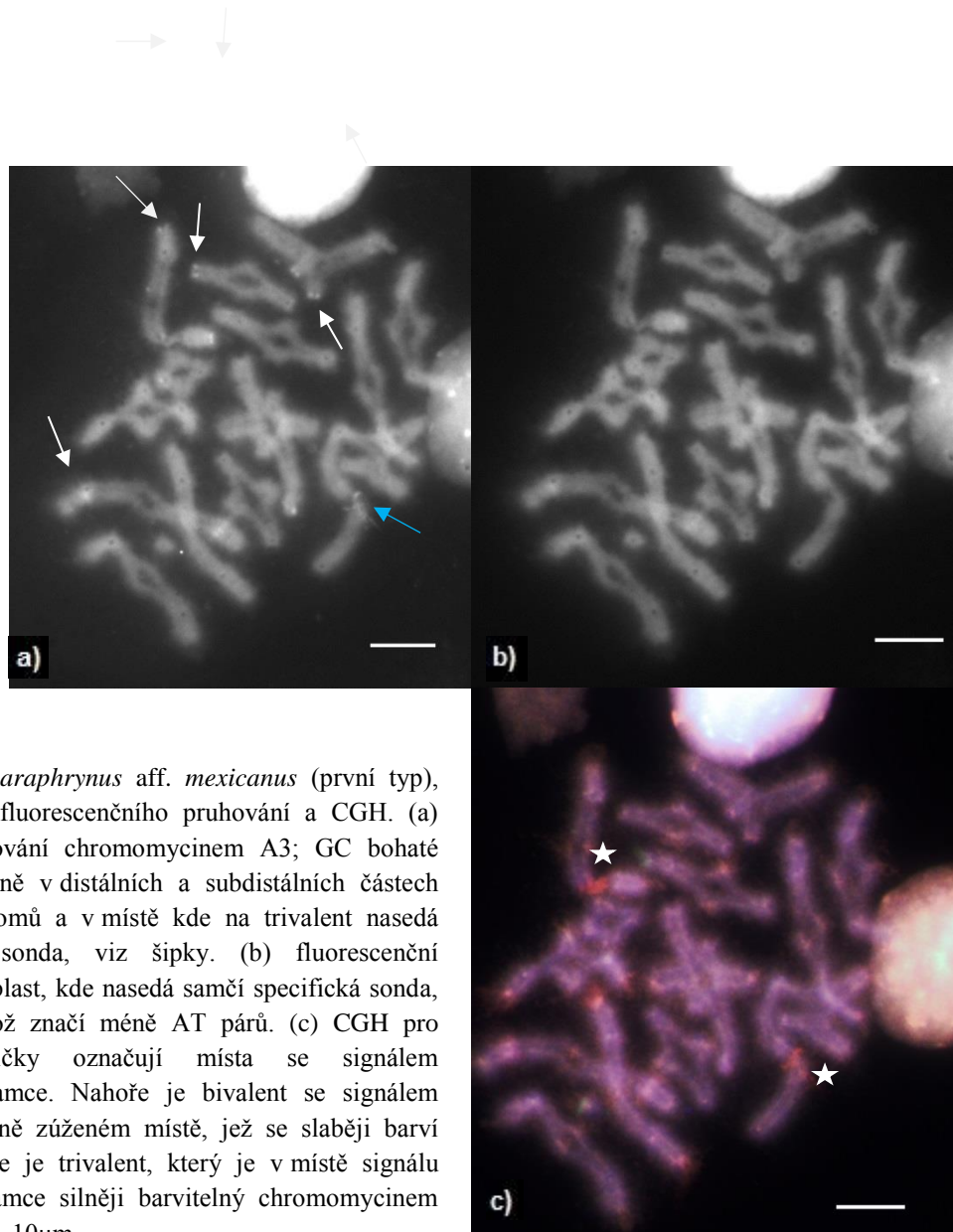


Obr. 13: Detekce samčích specifických signálů metodou CGH u *Paraphrynus affinis mexicanus* (první typ). Preparát ze samce, metafáze II. Šipka označuje velmi slabý signál specifický pro samce na koncích subtelocentrického resp. akrocentrického chromozomu. Tento chromozom velikostně odpovídá kratším raménkům chromozomu X (dole) a proto je patně jedním z Y chromozomů. Hvězdička označuje samčí specifický signál v pericentrické oblasti metacentrického chromozomu. Měřítko - 10 μ m.



Obr. 14: CGH na samičím preparátu u *Paraphrynus aff. mexicanus*, mitotická prometáfáze. Šipka označuje signál specifický pro samice v místě v pericentrické oblasti. Měřítko - 10 μ m.



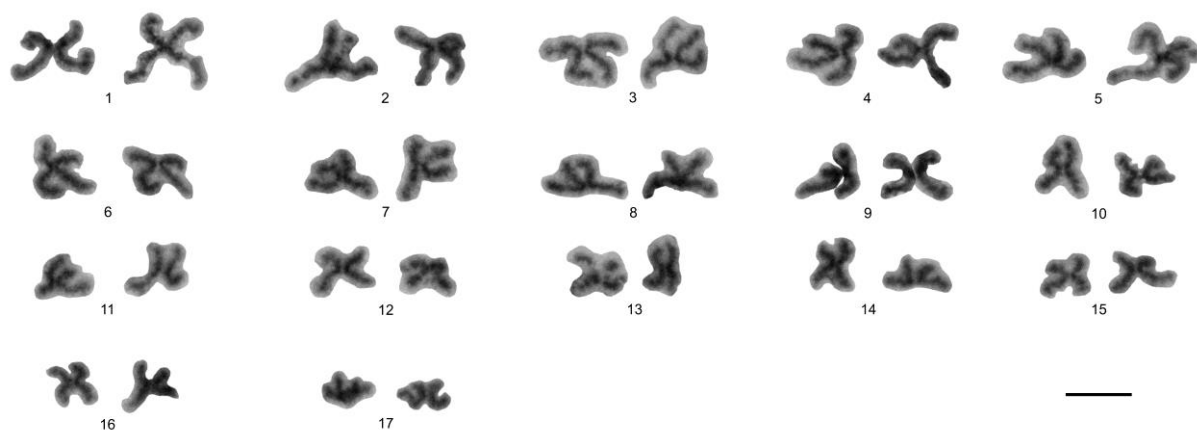


Obr. 15: Samec *Paraphrynus* aff. *mexicanus* (první typ), srovnání výsledku fluorescenčního pruhování a CGH. (a) fluorescenční pruhování chromomycinem A3; GC bohaté oblasti jsou převážně v distálních a subdistálních částech některých chromozomů a v místě kde na trivalent nasedá samčí specifická sonda, viz šipky. (b) fluorescenční pruhování DAPI; oblast, kde nasedá samčí specifická sonda, se barví slaběji, což značí méně AT párů. (c) CGH pro porovnání, hvězdičky označují místa se signálem specifickým pro samce. Nahoře je bivalent se signálem umístěným v nápadně zúženém místě, jež se slaběji barví DAPI (viz b). Dole je trivalent, který je v místě signálu specifického pro samce silněji barvitelný chromomycinem A3 (viz a). Měřítko - 10 μ m.

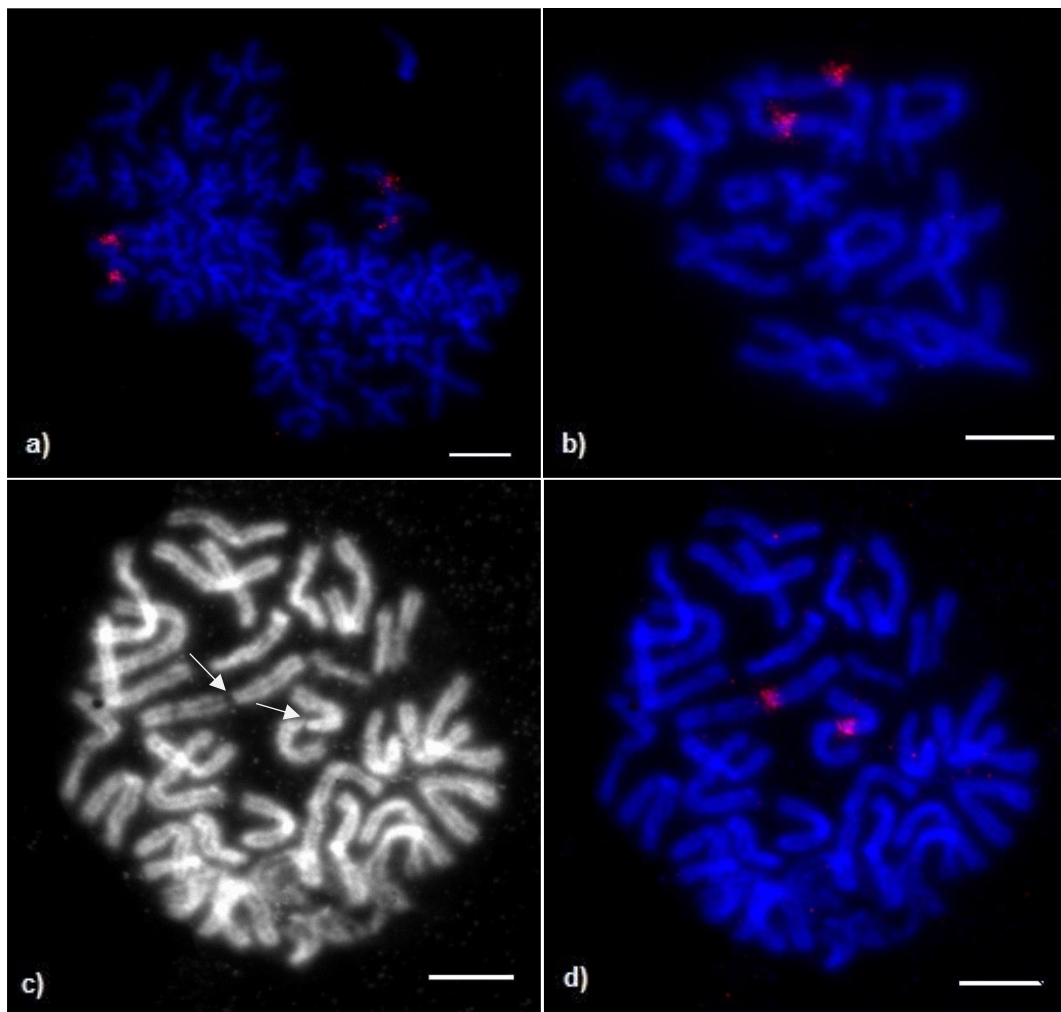
Karyotyp samce druhu *P. cubensis* obsahuje 34 metacentrických chromozomů (viz tab. 4 a obr. 16). Metoda rDNA FISH ukazuje jeden pár NOR umístěný v pericentrické oblasti zdánlivě delšího raménka. V diplotene a diakinezi byl NOR přítomný vždy na kruhovém bivalentu, v mitotické metafázi byly v místě NOR pozorovány sekundární konstriktce (viz obr. 17). U tohoto, ani žádného dalšího z níže uvedených druhů bičovců nebyly pozorovány heteromorfní pohlavní chromozomy.

Tab. 4: Charakteristika karyotypu samců *Paraphrynus cubensi*. Morfologie chromozomů: M – metacentrický.

Tabulka 4: Charakteristika karyotypu samců <i>Paraphrynus cubensis</i>			
Pár č.	Průměrná relativní délka páru	Průměrný centromerický index	Morfologický typ
1	3,95	1,45	M
2	3,78	1,08	M
3	3,61	1,15	M
4	3,58	1,25	M
5	3,56	1,22	M
6	3,33	1,64	M
7	2,96	1,15	M
8	2,89	1,18	M
9	2,77	1,67	M
10	2,55	1,14	M
11	2,53	1,42	M
12	2,50	1,17	M
13	2,47	1,24	M
14	2,43	1,18	M
15	2,34	1,52	M
16	2,25	1,25	M
17	2,24	1,39	M



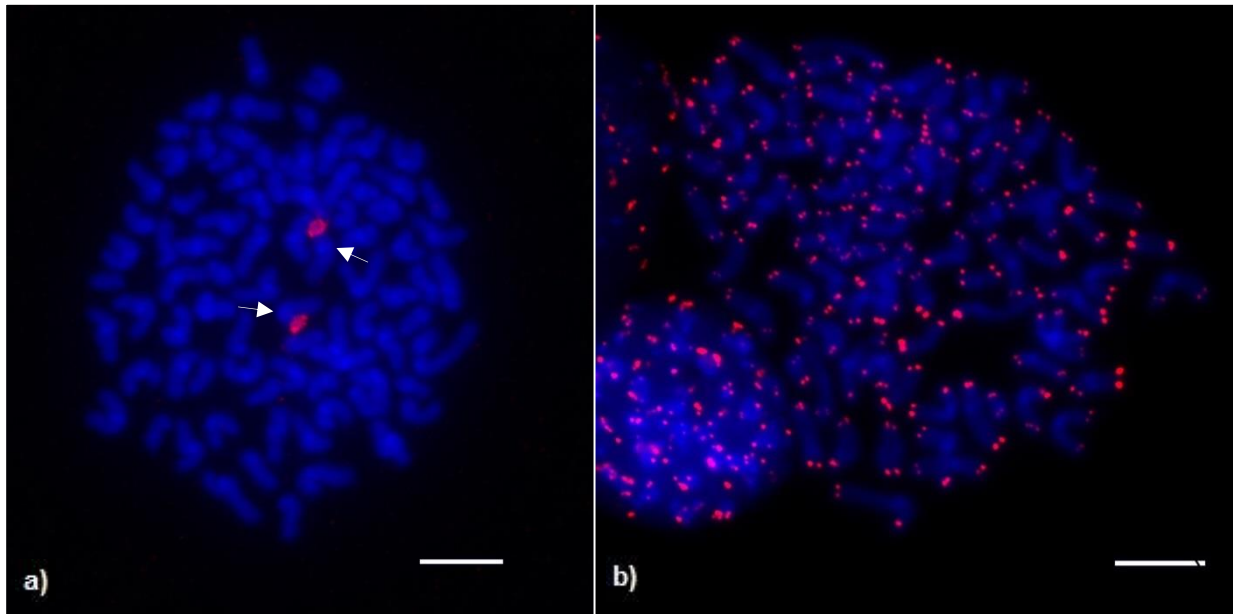
Obr. 16: Karyotyp samce *Paraphrynus cubensis*. Měřítko - 10 μ m.



Obr. 17: Detekce NOR u samce *Paraphrynus cubensis* (a,b,d) FISH se 18S rDNA sondou, (c) DAPI. (a) metafáze II, signály umístěné v pericentrické oblasti delších ramének jednoho chromozomového páru (tento pár má ve figuře zdánlivě submetacentrickou morfologii, podle měření z více figur jsou ale všechny páry metacentrické (viz tab. 4). (b) neúplná diplotene, signály jsou na kruhovém bivalentu. (c,d) časná mitotická metafáze, signály z FISH (d) kolokalizují s konstrikcemi uprostřed chromozomového páru (c, viz šipky). Měřítka - 10 μ m.

5.1.1.2. Rod *Acanthophrynus* (KRAEPELIN 1899)

Z rodu *Acanthophrynus* jsem měla k dispozici druh *A. coronatus* (BUTLER 1873). Karyotyp samce je tvořen 86 velmi malými chromozomy, přičemž většina z nich je dvouramenných (SEMBER 2010). Metodou rDNA FISH byl vizualizován jeden pár NOR na konci krátkého raménka subtelocentrického chromozomového páru (viz obr. 18). Telomerická FISH odhalila telomerické repetice, které vyskytovaly se jen na koncích chromozomů (obr. 18).

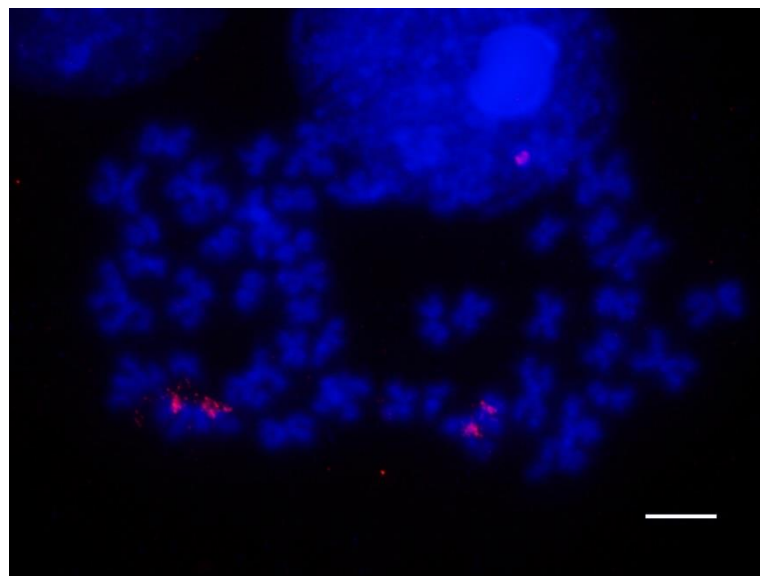


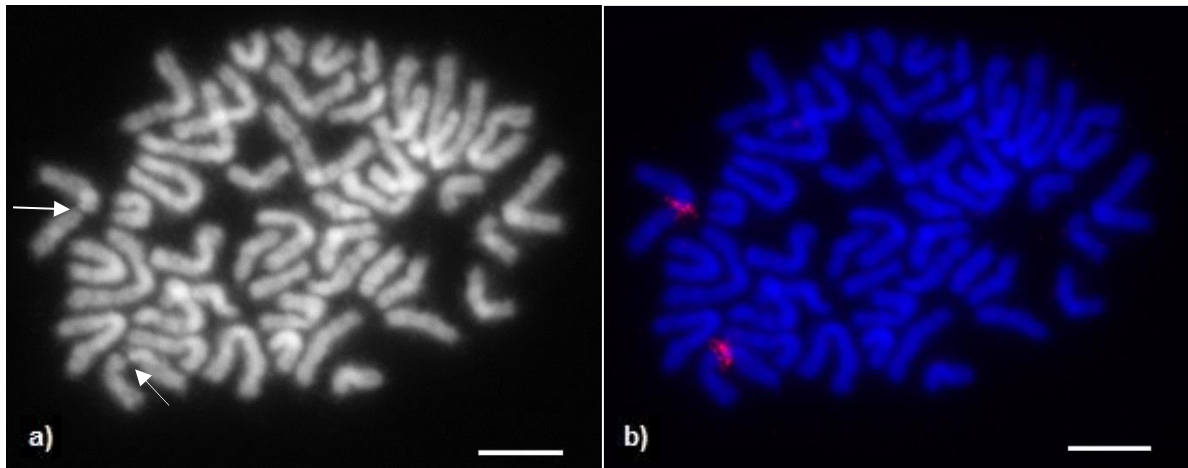
Obr. 18: Samec *Acanthophrynus coronatus*, detekce NOR a telomerických repetic. (a) rDNA FISH, mitotická metafáze, 1 pár NOR na krátkých raménkách subteloцентрических chromozomů, centromery jsou více obarveny DAPI viz šipky. (b) telomerická FISH, mitotická metafáze, signály umístěny na koncích všech chromozomů. Měřítka - 10 μ m.

5.1.1.3. Rod *Phrynos* (LAMARCK 1801)

Jako zástupce rodu *Phrynos* jsem pro experimenty využila druh *P. whitei* (GERVAIS 1842). Karyotyp samce je tvořen 46 výhradně dvouramennými chromozomy (SEMBER 2010). Metodou rDNA FISH byl vizualizován NOR v pericentrické oblasti delšího raménka metacentrického chromozomového páru (viz obr. 19). V diplotene a diakinezi byl NOR přítomný vždy na kruhovém bivalentu a v mitotické metafázi byla v místě NORu pozorována sekundární konstriktce (viz obr. 20). Telomerická FISH prokázala přítomnost telomerických repetic (TTAGG)_n pouze na koncích chromozomů (viz obr. 21).

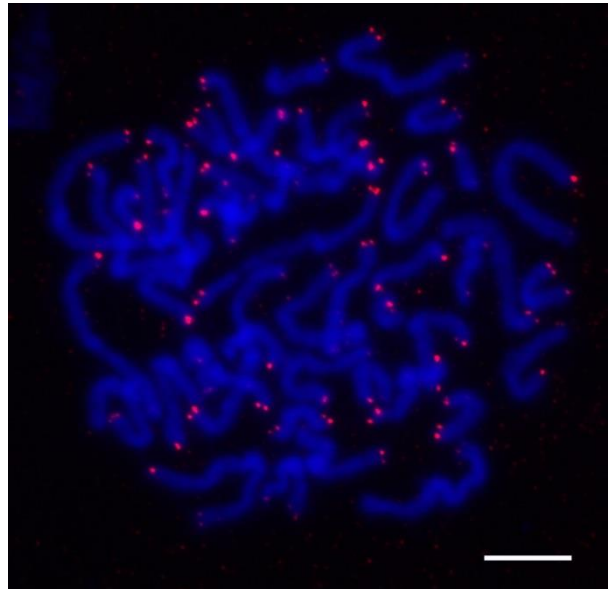
Obr. 19: Detekce NOR u samce *Phrynos whitei*, metafáze II, signály v pericentrických oblastech delších ramének metacentrických chromozomů. Měřítka - 10 μ m.





Obr. 20: Detekce NOR u samce *Phrynus whitei*, časná metafáze. (a) DAPI, sekundární konstriktce kolokalizují s výskytem NOR. (b) složený obrázek z rDNA FISH, na obr. je patrný 1 pár chromozomů s NORy v pericentrické oblasti metacentrických chromozomů. Měřítka -10 μm .

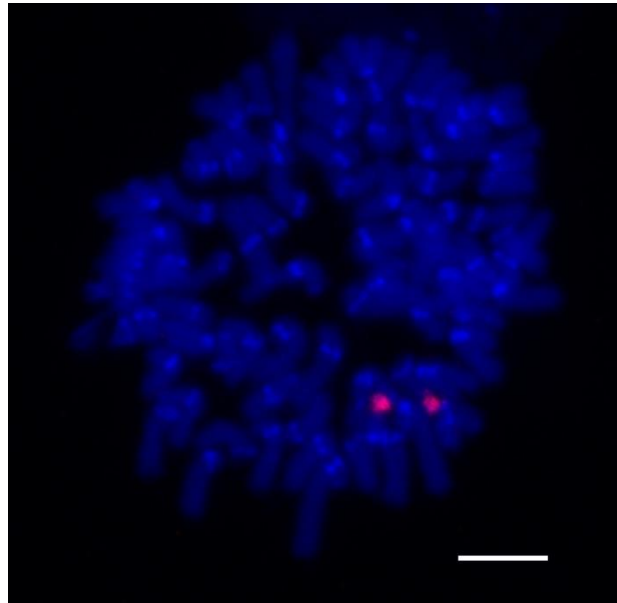
Obr. 21: Detekce telomerických repetice u samce *Phrynus whitei*, mitotická prometafáze, signály jsou jen na koncích chromozomů. Měřítka - 10 μm .



5.1.1.4. Rod *Heterophrynus* (POCOCK 1894)

Zástupcem rodu *Heterophrynus* byl *H. elaphus* (POCOCK 1903). Karyotyp samce měl pravděpodobně 76 drobných chromozomů s převahou dvouramenných. Všechny chromozomy v metafázi II byly bohužel vysokého stupně kondenzace, takže nebylo možné stanovit přesněji jejich morfologii a sestavit karyotyp. Metodou rDNA FISH byl vizualizován NOR na koncích ramének jednoho drobného páru akrocentrických chromozomů (viz obr. 22).

Obr. 22: Detekce NORů u samce *Heterophrynus elaphu*, raná mitoza, DAPI zvýrazňuje centromery proto můžeme orientačně odečíst morfologie chromozomů, NOR leží na koncích ramének malého akrocentrického páru chromozomů. Měřítka - 10 μ m.

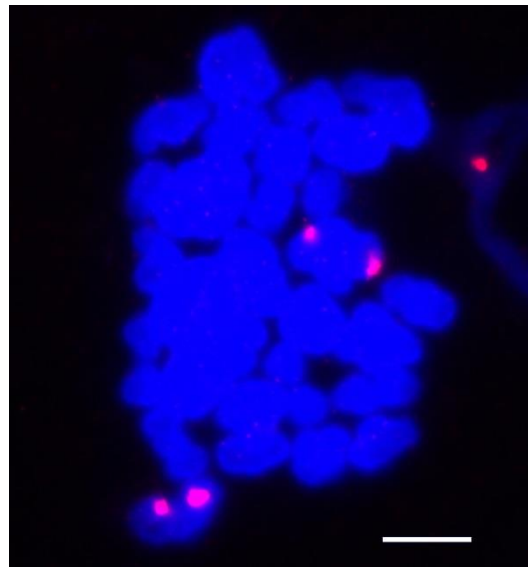


5.1.2. Čeleď Phrynichidae (SIMON 1892)

5.1.2.1. Rod *Damon* (KOCH 1850)

V rámci tohoto rodu jsem měla k dispozici druh *D. medius* (LICHTENSTEIN & HERBST 1797). Karyotyp samce je tvořen 70 chromozomy s převahou dvouramenných (SEMBER 2010). Metodou rDNA FISH byly odhaleny 2 páry chromozomů s NORy (viz obr. 23).

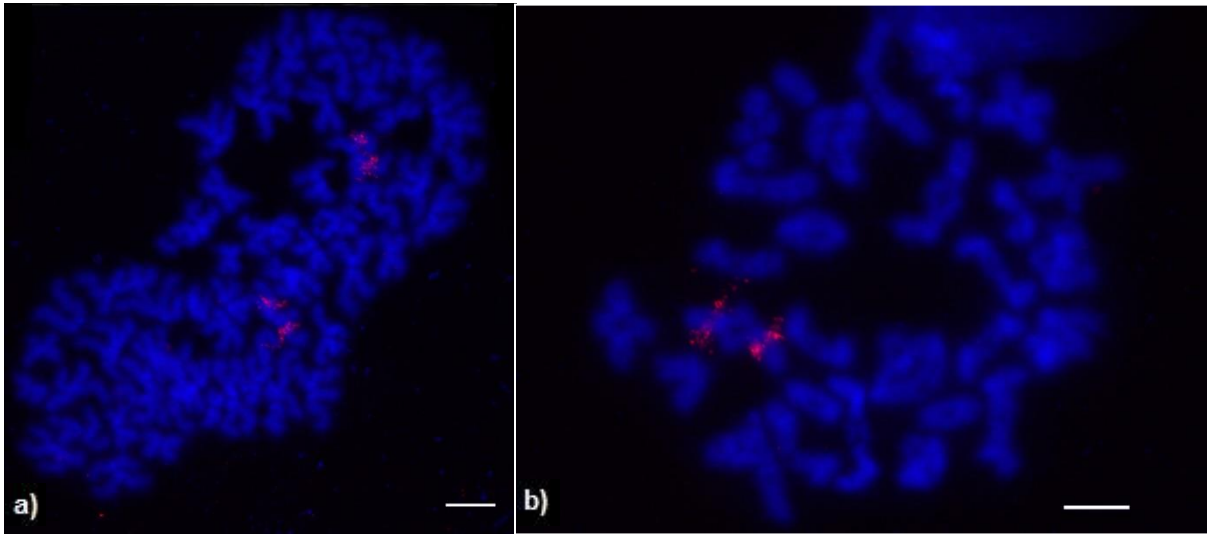
Obr. 23: Detekce NOR u samce *Damon medius*, metafáze I, sonda nasedá na dva bivalenty. Měřítka - 10 μ m.



5.1.2.2. Rod *Euphrynichus* (WEYGOLDT 1995)

Z rodu *Euphrynichus* jsem se zabývala druhem *E. bacillifer* (GERSTAECKER 1873). Karyotyp samce tohoto druhu je tvořen 56 chromozomy (SEMBER 2010). Metodou rDNA FISH byl odhalen 1 pár NOR v pericentrické oblasti delšího raménka metacentrického

chromozomového páru. V diplotene a diakinezi se se tento pár vyznačoval různou polohou chiazmat - tvořil různé typy bivalentů (viz obr. 24).



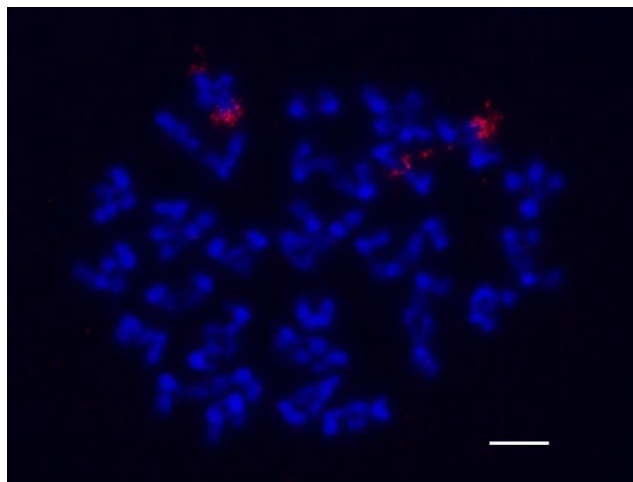
Obr. 24: rDNA FISH u samce *Euphrynichus bacillifer*. (a) metafáze II, signály leží v pericentromerických oblastech delších ramének metacentrických chromozomů. (b) diakineze se signálem na bivalentu s jedním chiazmatem. Měřítko - 10 μ m.

5.1.2.3. Rod *Phrynichus* (KARSCH 1879)

Z tohoto rodu jsem studovala druhy *P. ceylonicus* (KOCH 1843), *P. deflersi arabicus* (WEYGOLDT 2003), *P. dhofarensis* (WEYGOLDT et al. 2002) a *P. orientalis*. (WEYGOLDT 1998). Výsledky naší laboratoře ukázaly, že karyotypy tohoto rodu jsou velmi diverzifikované z hlediska diploidních počtů a morfologie chromozomů.

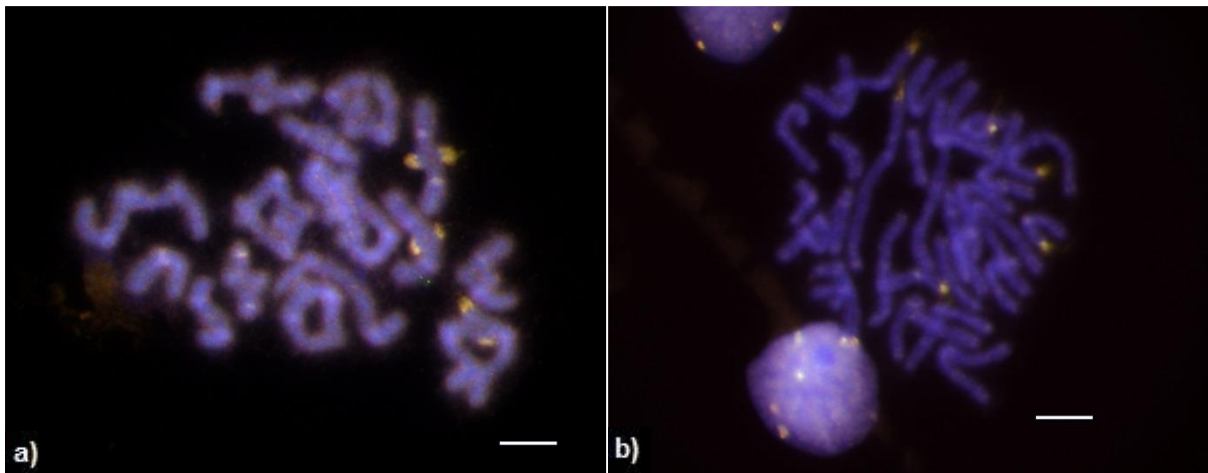
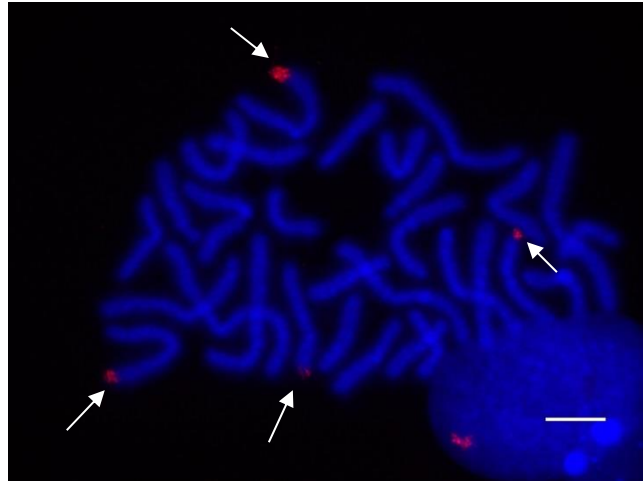
Karyotyp druhu *P. ceylonicus* je tvořen 52 chromozomy s převahou dvouramenných (SEMBER 2010). Metodou rDNA FISH byly odhaleny NORy na koncích krátkých ramének tří párů submetacentrických chromozomů (viz obr. 25).

Obr. 25: rDNA FISH u samce *Phrynichus ceylonicus*, diakineze, vizualizace NOR na třech bivalentech s jedním chiazmatem. Každý z těchto bivalentů nese jeden pár NOR.



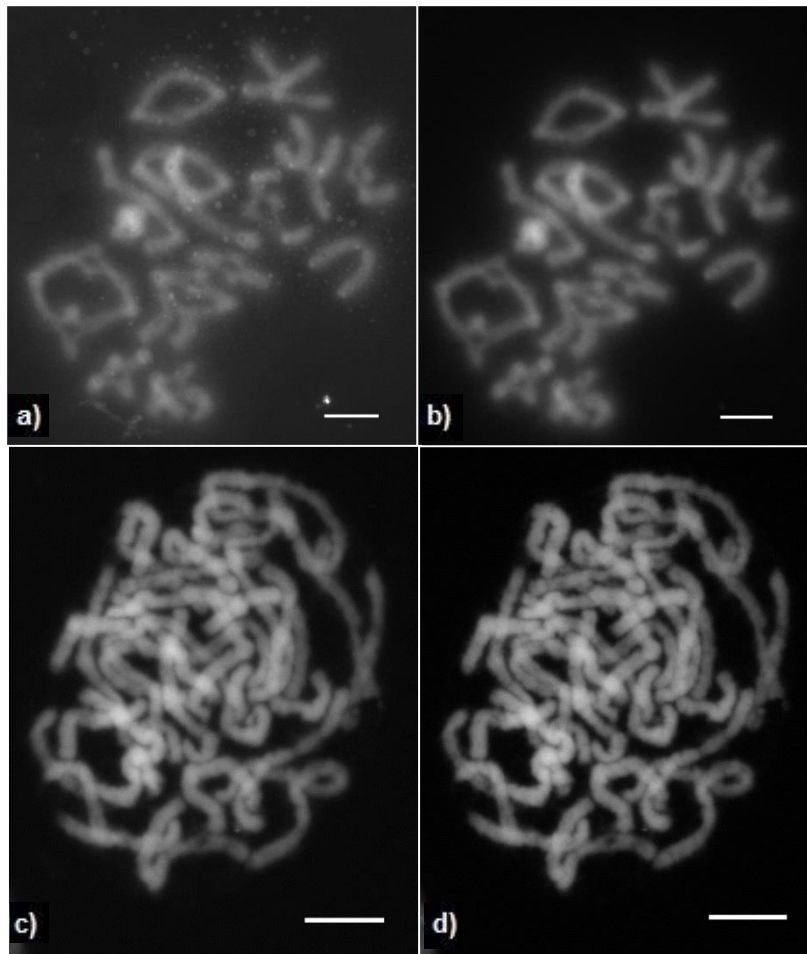
Karyotyp *P. deflersi arabicus* se skládá z 30 chromozomů s převahou dvouramenných. Metodou rDNA FISH byly vizualizovány NORy na koncích krátkých ramének dvou párů submetacentrických chromozomů (viz obr. 26). Při metodě CGH nasedaly sondy na samčí i samičí preparáty rovnoměrně, s tím že u tří párů chromozomů byla přítomna v distálních částech chromozomů zvýšená koncentrace obou sond a to bez ohledu na to, jestli byla použita kompetitivní DNA nebo nikoliv (obr. 27). Fluorescenční pruhování neukázalo ani u jednoho pohlaví výraznější AT nebo GC bohaté bloky (obr. 28).

Obr. 26: rDNA FISH u samce *Phrynichus deflersi arabicus*, mitotická metafáze. Šipky označují signály na jednom z konců chromozomů dvou submetacentrických párů. Měřítka - 10 μ m.

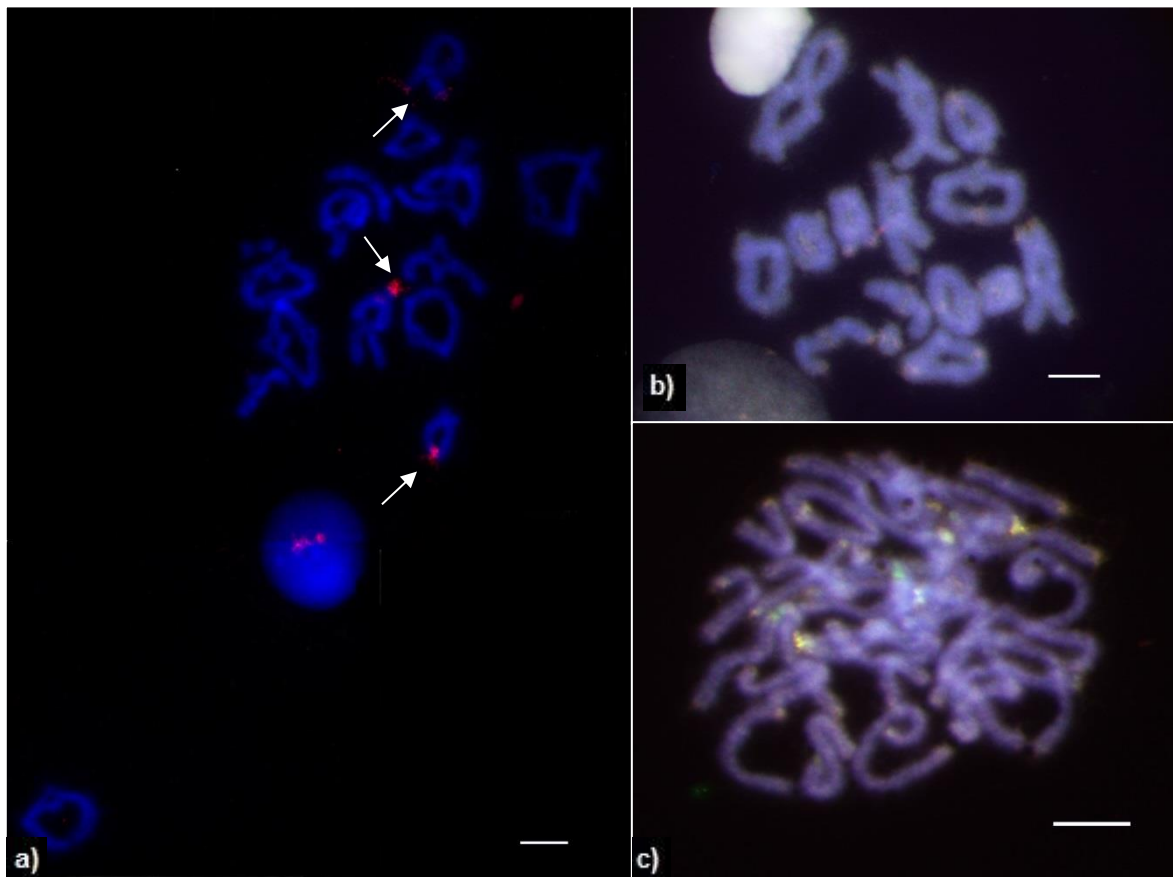


Obr. 27: CGH u *Phrynichus deflersi arabicus*. (a) preparát ze samce, diakineze, samčí i samičí sonda je rozložena rovnoměrně na všech chromozomech, na třech bivalentech nápadná akumulace obou typů sond na koncích chromozomů. (b) preparát ze samice, mitotická časná metafáze, samčí i samičí sonda je rozložena rovnoměrně, na koncích tří párů chromozomů je výrazná akumulace obou sond. Měřítka – 10 μ m.

Obr. 28: : Fluorescenční pruhování u *Phrynichus deflersi arabicus*. (a,b) samčí preparát, diplotene. (a) chromomycin A3 (b) DAPI. (c,d) samičí preparát, mitotická prometáfáze (c) chromomycin A3 (d) DAPI. Ani jedno pohlaví nevykazuje výskyt AT nebo GC bohatých oblastí. Měřítko - 10 μ m.



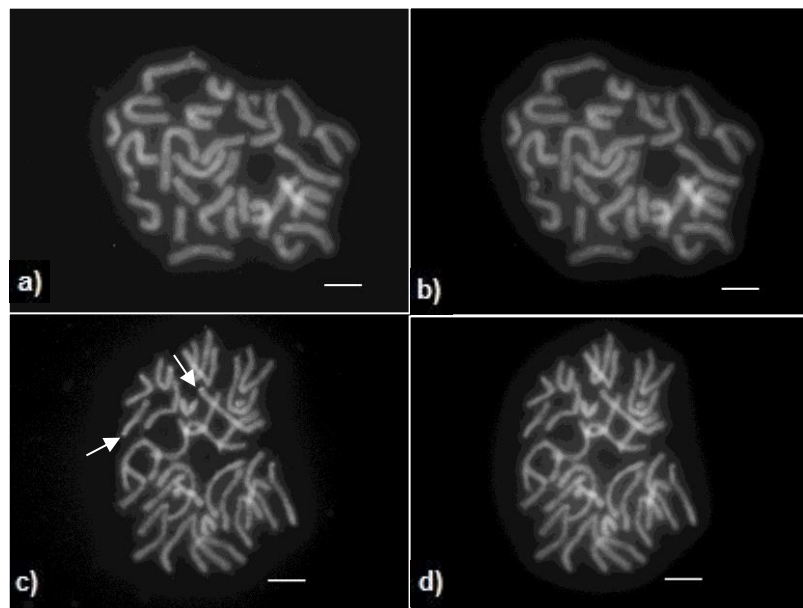
Karyotyp samce druhu *P. dhofarensis* je tvořen opět 30 chromozomy převážně dvouramennými (SEMBER 2010). Metodou rDNA FISH byly odhaleny NORy na koncích krátkých ramének tří párů submetacentrických chromozomů (viz obr. 29). Metodou CGH nebyl odhalen ani u samce ani u samice žádný chromozomový úsek specifický pro pohlaví, sondy obou pohlaví nasedaly na chromozomy rovnoměrně (viz obr. 29). Fluorescenční pruhování u samce neukazuje na přítomnost AT nebo GC bohatých bloků, u samice jsou velmi malé GC bohaté oblasti na koncích některých chromozomů, obzvláště nápadné jsou na chromozomovém páru, jehož délka je mnohem menší než délka ostatních párů (viz obr. 30).



Obr. 29: *Phrynichus dhofarensis*, detekce NOR a komparativní genomová hybridizace. (a) rDNA FISH, diplotene, šipky ukazují, že tři bivalenty nesou NOR (každý jeden pár). Z morfologie bivalentů lze dedukovat, že se NORy nachází vždy na koncích chromozomů. (b) CGH na samčím preparátu, diplotene, obě sondy nasedají rovnoměrně. (c) CGH na samičím preparátu, mitotická prometáfaze, sondy nasedají na chromozomy rovnoměrně, u některých chromozomů se sondy akumulují na jejich koncích. Měřítko - 10 μ m.

Obr. 30: Fluorescenční pruhování u *Phrynichus dhofarensis* (a,b) samčí preparáty (a) chromomycin A3, (b) DAPI).

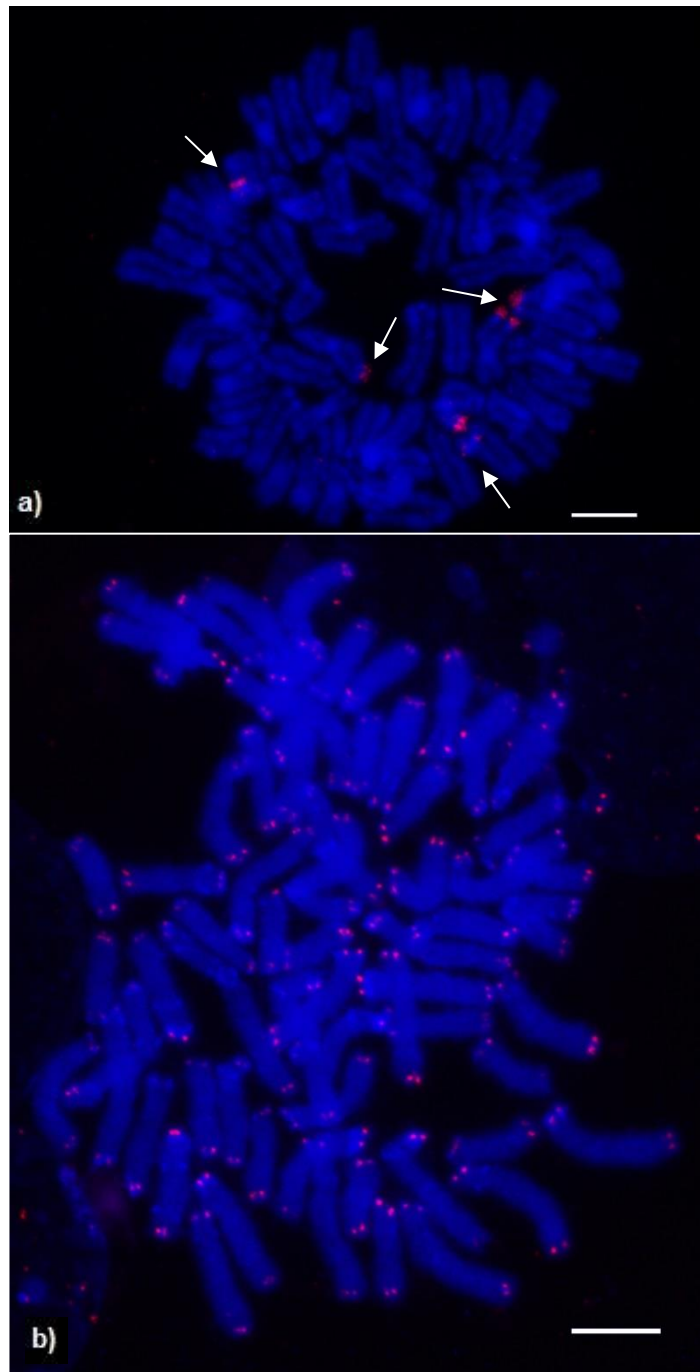
(c,d) samičí preparáty; (c) chromomycin A3, šipky ukazují na distální GC bohaté oblasti, (d) DAPI. Měřítko - 10 μ m



Karyotyp samce *P. orientalis* obsahuje 64 chromozomů (SEMBER 2010). Metodou rDNA FISH byly vizualizovány NORy na koncích krátkých ramének tří párů submetacentrických

chromozomů (viz obr. 31). Telomerickou FISH byly detekovány $(TTAGG)_n$ repetice, leží pouze na koncích chromozomů (viz obr. 31).

Obr. 31: Samec *Phrynichus orientalis*, detekce NOR a telomerických repetic. (a) rDNA FISH, mitotická metafáze, šipky označují všechny NOR na jednom z konců chromozomů tří submetacentrických párů. (b) telomerická FISH, mitotická metafáze, signály jsou na koncích všech chromozomů. Měřítko - 10 μ m.



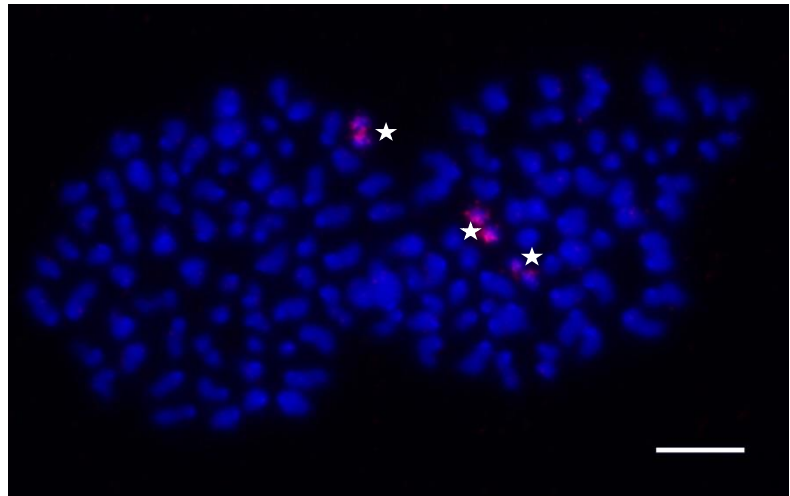
5.1.3. Čeleď Charontidae (SIMON 1892)

5.1.3.1. Rod *Charon* (KARSCH 1879)

Zástupcem tohoto rodu byl *C. grayi* (GERVAIS 1842). Jeho karyotyp je tvořen 70 chromozomy (SEMBER 2010). Metodou rDNA FISH byl odhalen 1 pár s NOR a 1 nepárový

NOR na velmi drobných chromozomech, u nichž je tudíž obtížné stanovit jejich morfologii, z nichž jeden je pravděpodobně metacentrik (viz obr. 32).

Obr. 32: rDNA FISH u samce *Charon grayi*, dvě sesterské metafáze II, v jedné metafázi je signál přítomen pouze na jednom chromozomu, v druhé na dvou chromozomech, viz hvězdičky. Měřítko – 10 μ m.



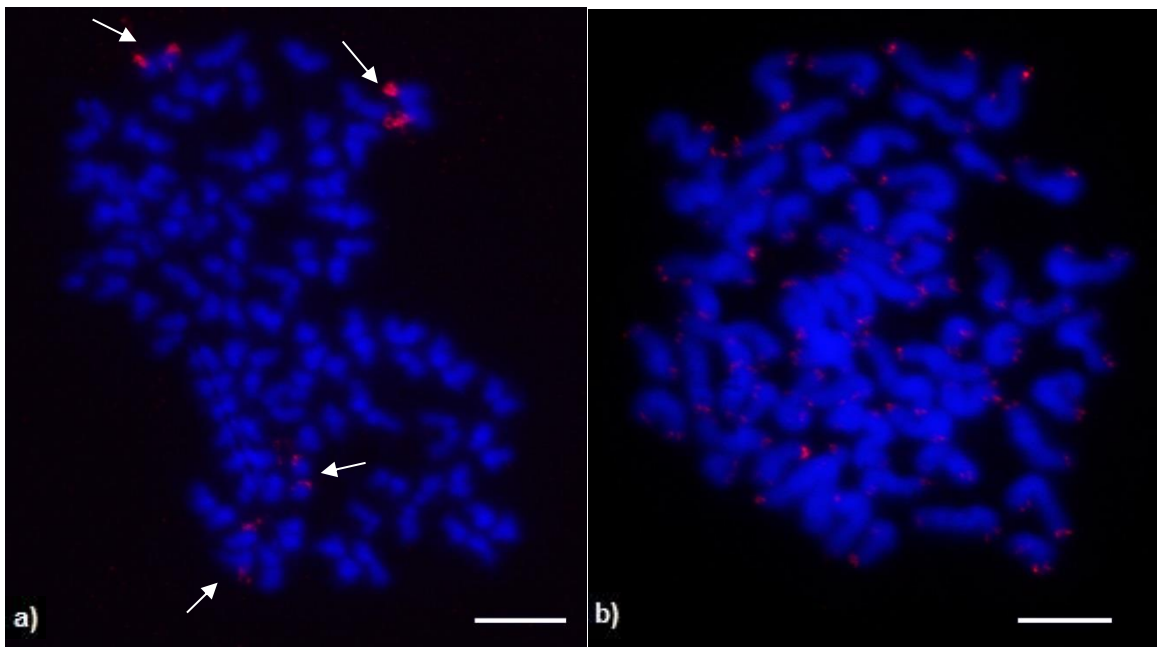
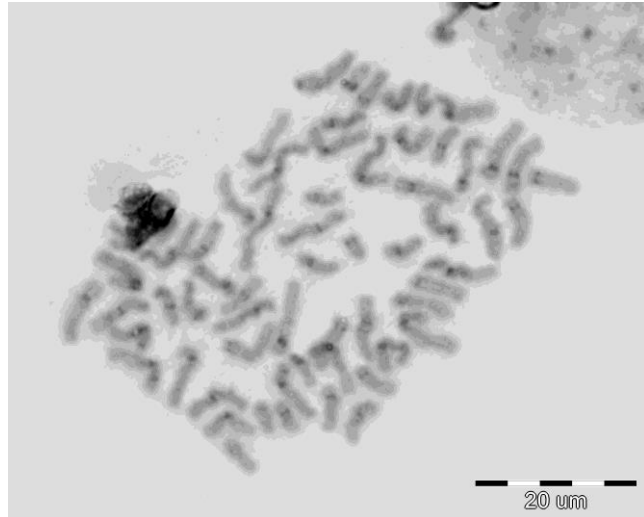
5.2. Řád bičnatci (Uropygi)

5.2.2. Čeleď Thelyphonidae (LUCAS 1835)

5.2.2.1. Rod *Thelyphonus* (LATREILLE 1802)

Z tohoto rodu jsem měla k dispozici blíže neurčený druh (*Thelyphonus* sp.), karyotyp samce měl 66 chromozomů. Všechny chromozomy v metafázi II byly bohužel vysoce kondenzované, takže nebylo možné stanovit přesně morfologii všech chromozomových párů a karyotyp. Pro stanovení morfologie chromozomů nebylo možno použít ani mitotické metafáze, primární konstriktce nejsou u amblypygidů většinou na chromozomech dobře patrné. Pro získání přesnější představy o morfologii chromozomů v karyotypu jsem tedy použila C-pruhování. Vycházela jsem z poznatku, že centromerické oblasti jsou většinou tvořeny blokem konstitutivního heterochromatinu, který je možno detegovat mikroskopicky. Metodou C-pruhování byl odhalen konstitutivní heterochromatin, který se většinou nacházel (viz obr. 33). Metodou rDNA FISH byly odhaleny 2 páry NOR, a to na koncích kratších ramének submetacentrického a metacentrického chromozomového páru (viz obr. 34). Telomerickou FISH byl vizualizován hmyzí telomerický motiv, vyskytuje se pouze na koncích chromozomů (viz obr. 34).

Obr. 33: C-pruhování u samce *Thelyphonus* sp., časná metafáze. Tmavé pruhy na chromozomech představují konstitutivní heterochromatin, který je převážně v oblastech, kde se nacházejí centromery. Měřítko - 20 μ m.



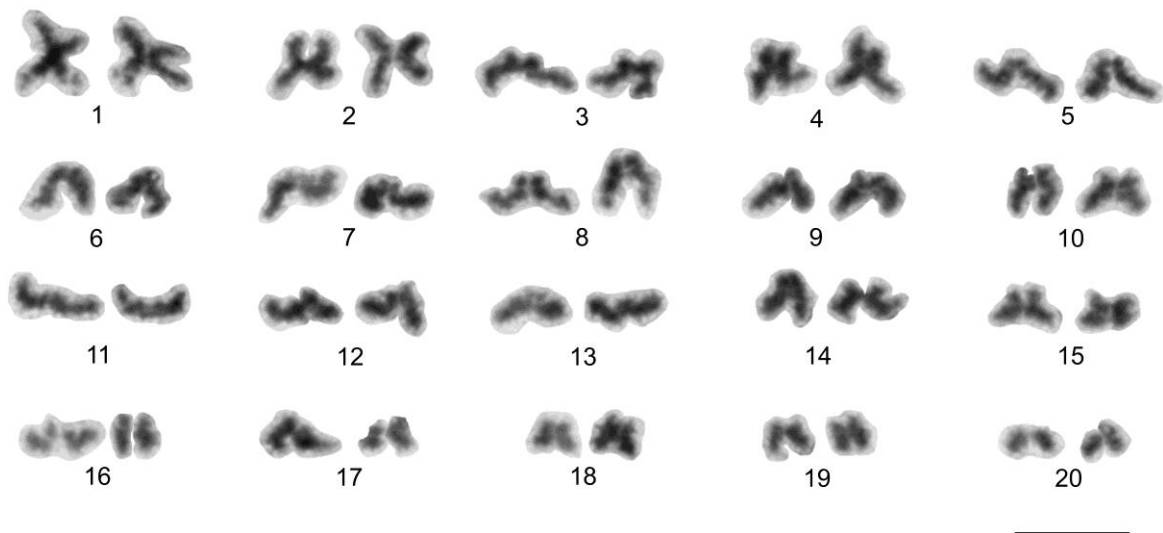
Obr. 34: Samec *Thelyphonus* sp., detekce NOR a telomerických repetic. (a) rDNA FISH, metafáze II, šipky označují signály na jednom z konců menších submetacentrických a metacentrických chromozomů, (b) telomerická FISH, mitotická prometáfaze, vizualizace telomerických repetic na koncích chromozomů. Měřítko - 10 μ m.

5.2.2.2. Rod *Typopeltis* (POCOCK 1894)

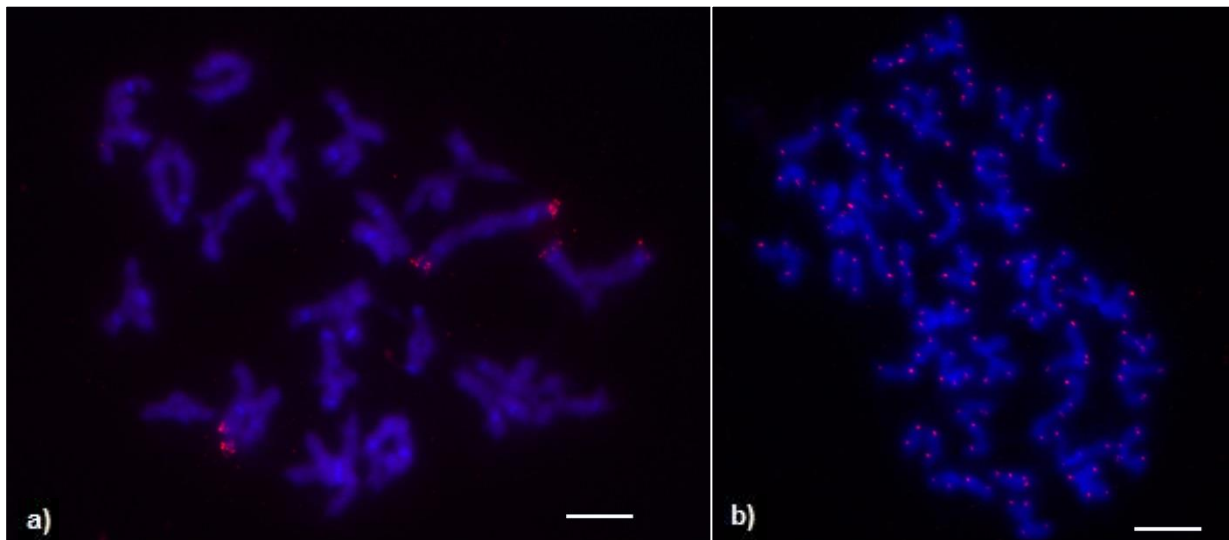
Zástupcem tohoto rodu byl blíže neurčený druh (*Typopeltis* sp.). Karyotyp samce obsahoval 40 chromozomů, z čehož 12 párů bylo submetacentrických, 5 metacentrických a 3 subtelocentrické (viz tab. 5). Karyotyp neobsahoval žádný heteromorfní chromozomový pár (viz obr. 35). Metodou rDNA FISH byly odhaleny 3 páry NOR na koncích krátkých ramének jednoho subtelocentrického a dvou submetacentrických chromozomů (obr. 36). Telomerickou FISH byly detekovány telomerické repetice, a to pouze na koncích chromozomů (viz obr. 36) Metodou C-pruhování byl odhalen konstitutivní heterochromatin, který většinou odpovídal polohám centromer (viz obr. 37).

Tab. 5: Charakteristika karyotypu samců *Typopeltis* sp.. Morfologie chromozomů – zkratky viz tab. 2 a 3.

Tabulka 5: Charakteristika karyotypu samců <i>Typopeltis</i> sp.			
Pár č.	Průměrná relativní délka páru	Průměrný centromerický index	Morfologický typ
1	3,61	1,23	M
2	3,33	1,10	M
3	2,97	2,96	SM
4	2,96	1,52	M
5	2,70	3,89	ST
6	2,67	2,78	SM
7	2,65	3,79	SM
8	2,64	3,16	SM
9	2,62	2,20	SM
10	2,50	1,95	SM
11	2,46	4,07	ST
12	2,43	2,61	SM
13	2,39	3,21	ST
14	2,38	2,12	SM
15	2,25	1,78	SM
16	2,13	2,26	SM
17	2,11	1,98	SM
18	1,89	1,35	M
19	1,78	1,57	M
20	1,55	2,28	SM

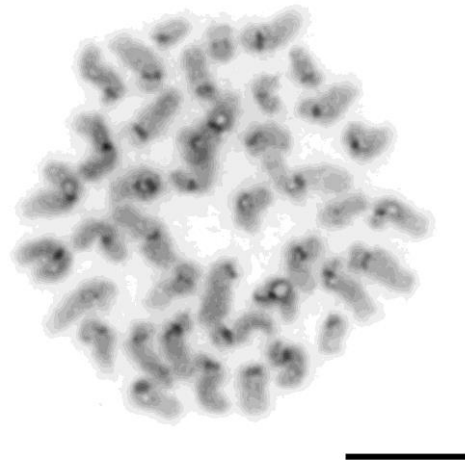


Obr. 35: Karyotyp samce *Typopeltis* sp. Měřítko - 10 μ m.



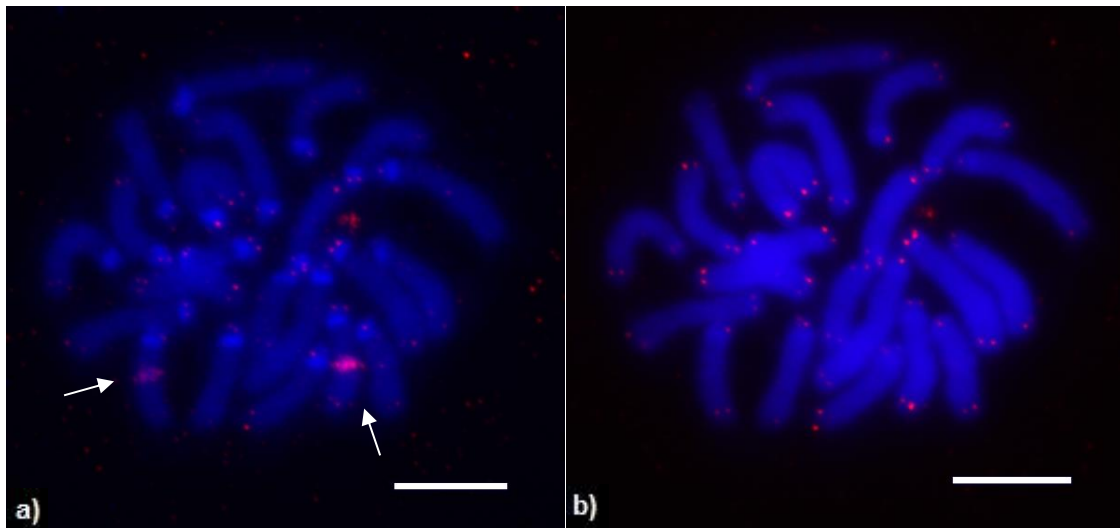
Obr. 36: Samec *Typopeltis* sp., detekce NOR a telomerických repetic. (a) rDNA FISH, diakineze, detekce signálů na 3 bivalentech. Signály se vyznačují terminální polohou. (b) telomerická FISH, sesterské metafáze II, signály byly na koncích všech chromozomů. Měřítko - 10 μ m.

Obr. 37: C- pruhování u samce *Typopeltis* sp., mitotická metafáze, tmavé pruhy na chromozomech představují bloky konstitutivního heterochromatinu. Většina těchto bloků zřejmě odpovídá svou polohou centromerám. Měřítko - 10 μ m.



5.3. Řád krátkochvosti (Schizomida)

Tuto skupinu pavoukoců reprezentuje zástupce rodu *Stenochrus* (*Stenochrus* sp., Hubbardiidae), který byl získán během expedice v Mexiku. Na preparátech ze zadečku samce byly pozorovány jen mitotické figury. Karyotyp obsahuje 22 chromozomů. Po aplikaci FISH a obarvení chromozomů DAPI bylo možno pozorovat vyšší intenzitu fluorescence na jednom konci každého chromozomu (viz obr. 38). Tyto oblasti by mohly odpovídat satelitní DNA v oblasti centromer. V tomto případě by byly všechny chromozomy akrocentrické, čemuž odpovídá i absence konstrikcí na chromozomech. Metodou rDNA FISH byl odhalen 1 pár NOR (viz obr. 38). Telomerickou FISH byl potvrzen výskyt hmyzího motivu u této skupiny (viz obr. 38), signály byly jen na koncích chromozomů. Bohužel se nepodařilo získat dostatek samčích preparátů a preparáty samice pro případnou detekci homomorfních pohlavních chromozomů metodu CGH.

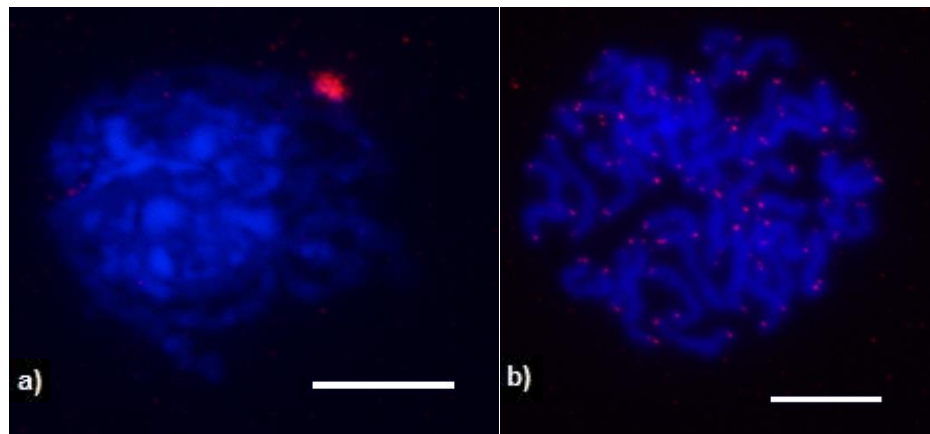


Obr. 38: Samec *Stenochrus* sp., detekce NOR a telomerických repetic, mitotická metafáze. (a) rDNA FISH vizualizuje NOR v interkalární poloze na jednom chromozomovém páru (šipky); DAPI výrazněji barví centromery. Ty se nacházejí u všech chromozomů na konci, což ukazuje, že se jedná o akrocentrické chromozomy. (b) telomerická FISH detekující tzv. hmyzí telomerický motiv na koncích chromozomů. Měřítka - 10 μ m.

5.4. Řád roztočovci (Ricinulei)

Z této skupiny jsem měla k dispozici pouze druh *Pseudocellus gertschi* (MÁRQUEZ & CONCONI 1974) z rodu *Pseudocellus* (PLATNICK 1980). Karyotyp samce má okolo 40 drobných chromozomů. Metodou rDNA FISH byl odhalen 1 pár NOR na koncích chromozomů (viz obr. 39). Telomerickou FISH byl potvrzen výskyt hmyzího motivu u této skupiny (viz obr. 39), signály byly jen na koncích chromozomů.

Obr. 39: Samec *Pseudocellus gertschi*, vizualizace NOR a telomerických repetic. (a) zygotene nebo pachytene, rDNA FISH detekující 1 pár NOR. (b) časná mitotická metafáze, telomerická FISH vizualizující tzv.



hmyzí telomerický motiv na koncích všech chromozomů. Měřítka - 10 μ m.

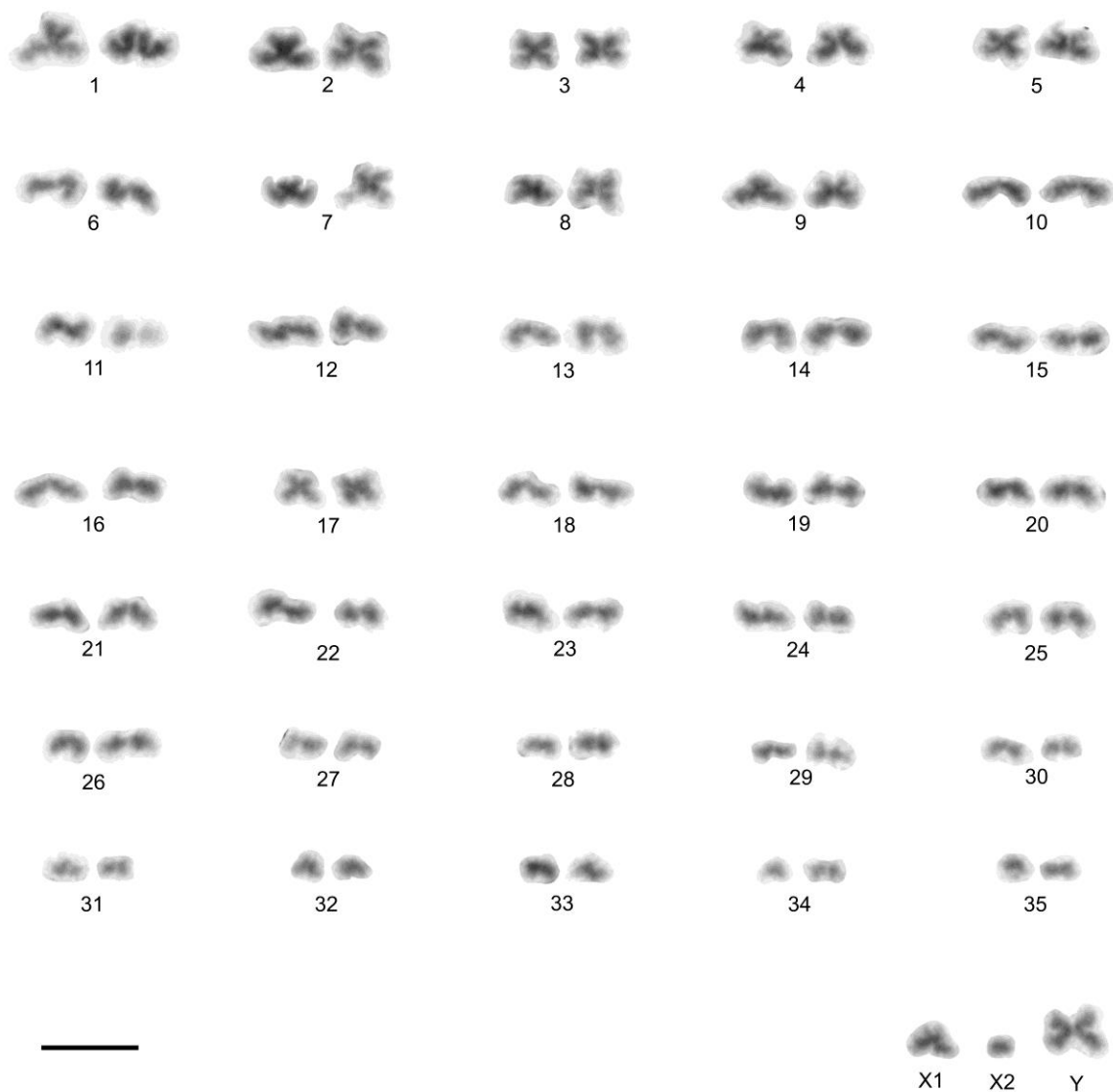
5.5. Řád pavouci (Araneae)

5.5.1. Podřád sklípkoši (Mesothelae)

Zástupcem této skupiny pavoukvců byl dosud nepopsaný zástupce rodu *Liphistius* (SCHIODTE 1849) v této práci označovaný jako *Liphistius* sp. nov. Karyotyp samce pravděpodobně obsahuje 73 chromozomů (viz tab. 6). Samice mají 74 chromozomů (viz obr. 41). Sestavení karyogramu samce bylo velmi obtížné. Metafáze II byly často neúplné. Karyotyp obsahuje velké množství malých chromozomů, u nichž nelze určit přesně morfologii (viz obr. 40). V karyotypu předpokládáme přítomnost pohlavních chromozomů X_1 , X_2 a Y , které tvoří v pozdní profázi I (diplotene a diakinezi) a metafázi I trivalent. Poměr velikostí chromozomů $X_1 : X_2 : Y$ je přibližně 3:1:3,5. Pohlavní chromozom X_1 je středně velký metacentrik a je poměrně snadno odlišitelný od ostatních chromozomů. Problém je však s určením pohlavních chromozomů X_2 a Y . Chromozom Y je metacentrický a má obdobnou velikost i morfologii jako chromozomy párů č. 1-5, chromozom X_2 je drobný chromozom s neznámou morfologií, který byl vybrán prakticky náhodně z malých chromozomů menších než pár č. 25. Metodou rDNA FISH, kterou jsme aplikovali na samčí i samičí preparáty, byl zjištěn autozomový pár s NOR a 1 NOR na pohlavním chromozomu X_1 u samce (viz obr. 42). Tomu odpovídá přítomnost dvou párů NOR u samice (viz obr. 42). Oba páry NOR jsou lokalizovány na kratších raménkách, v případě autozomů se jedná pravděpodobně o pár č. 9. Telomerickou FISH nebyla u tohoto druhu zjištěna přítomnost tzv. hmyzího motivu (viz obr. 43). Metodou CGH byl detekován na samčích preparátech signál specifický pro samce v trivalentu (viz obr. 44) na chromozomu Y . Na samičí preparáty nasedaly obě sondy rovnoměrně (viz obr. 44). Fluorescenční pruhození na samčích preparátech ukazuje na některých autozomech GC bohaté oblasti v distálních a subdistálních místech chromozomů. Na trivalentu pohlavních chromozomů se nachází GC bohatá oblast v koncové části X_2 chromozomu, na opačné straně trivalentu je oběma fluorochromy zvýrazněná oblast, kde se nachází X_1 chromozom (viz obr. 45).

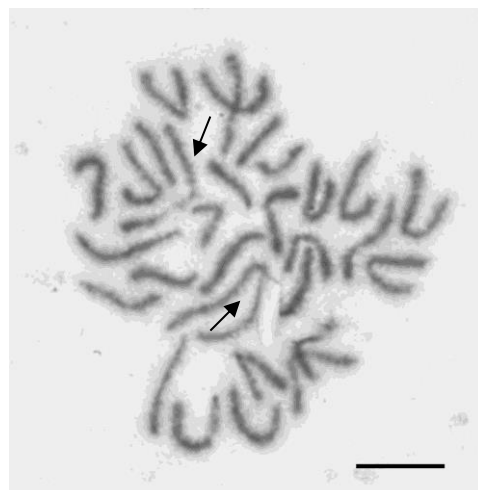
Tab. 6: Charakteristika karyotypu samců *Liphistius* sp. nov. Morfologie chromozomů – viz zkratky u tab 2 a 3.

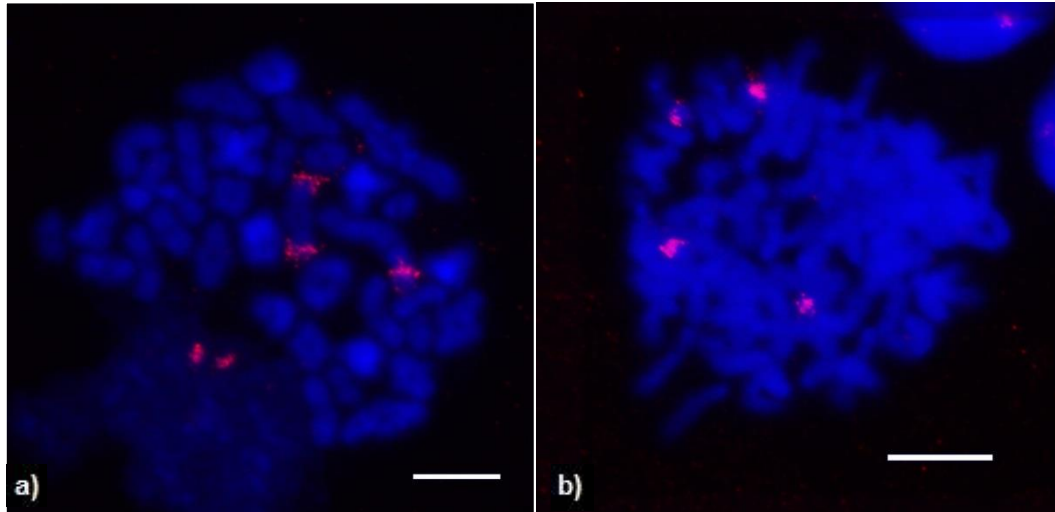
Tabulka X: Charakteristika karyotypu samců <i>Liphistius</i> sp. nov.			
Pár č. popř. pohlavní chromozom	Průměrná relativní délka páru/chromozomu	Průměrný centromerický index	Morfologický typ
1	2,41	1,51	M
2	2,12	1,56	M
3	1,91	1,13	M
4	1,84	1,68	M
5	1,81	1,26	M
6	1,72	10,06	A
7	1,71	1,93	SM
8	1,69	1,41	M
9	1,68	2,08	SM
10	1,57	11,50	A
11	1,54	4,17	ST
12	1,51	7,54	A
13	1,51	6,46	ST
14	1,44	11,80	A
15	1,41	6,05	ST
16	1,39	6,38	ST
17	1,39	1,50	M
18	1,33	5,76	ST
19	1,30	7,61	A
20	1,29	5,76	ST
21	1,29	3,68	ST
22	1,23	8,52	A
23	1,22	5,83	ST
24	1,20	9,56	A
25-35	1,18 – 0,56	?	?
X1	1,53	1,57	M
X2	?	?	?
Y	2,31	1,1	M



Obr. 40: Karyotyp samce *Liphistius* sp. nov. Chromozomové páry 1-5 jsou metacentrické a mají přibližně stejnou velikost, obdobnou velikost a morfologii má i pohlavní chromozom Y. Pohlavní chromozom X₂ je určitě velmi drobný, nelze jej spolehlivě odlišit morfologicky od nejmenších autozomů (počínaje chromozomovým párem č. 25 nemůžeme určit přesně morfologii chromozomů); byl tedy vybrán prakticky náhodně z nejmenších chromozomů. Měřítko - 10μm.

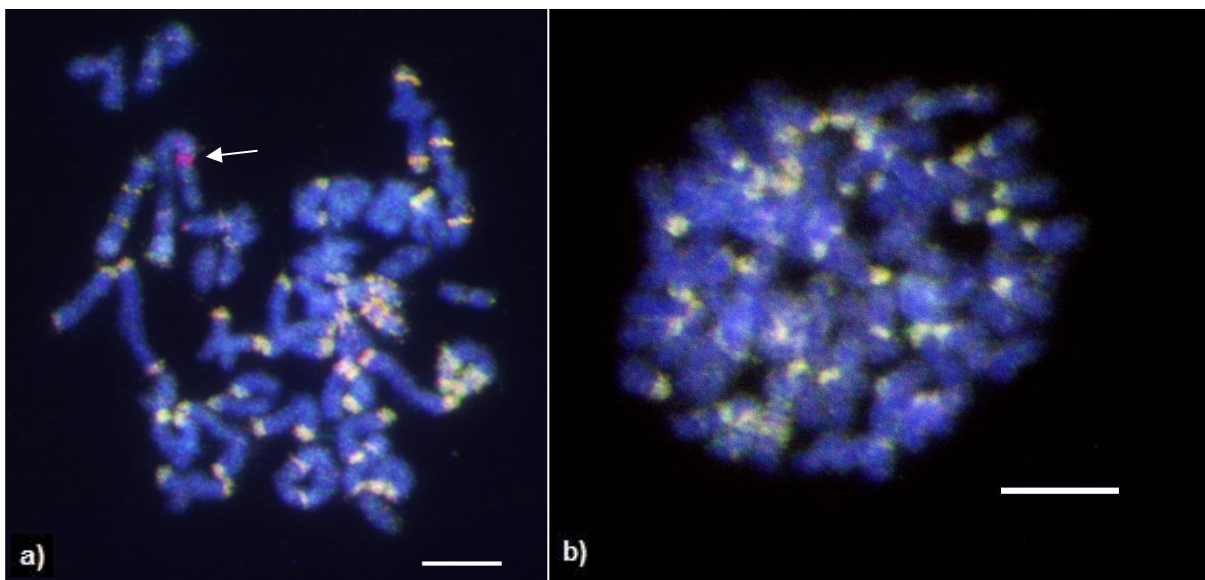
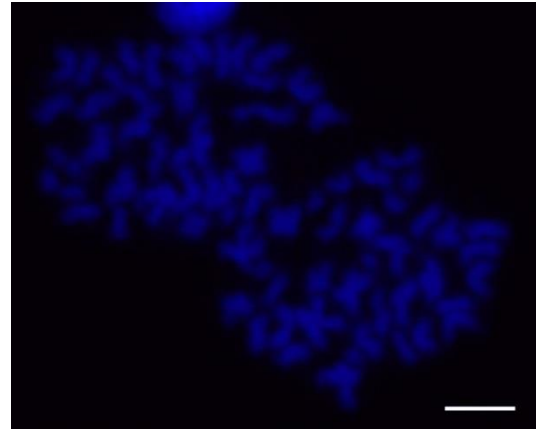
Obr. 41: Samice *Liphistius* sp. nov. s 30 chromozomy, šipky míří na dva X chromozomy, které jsou výrazně větší než ostatní autozomy. Měřítko - 10μm.



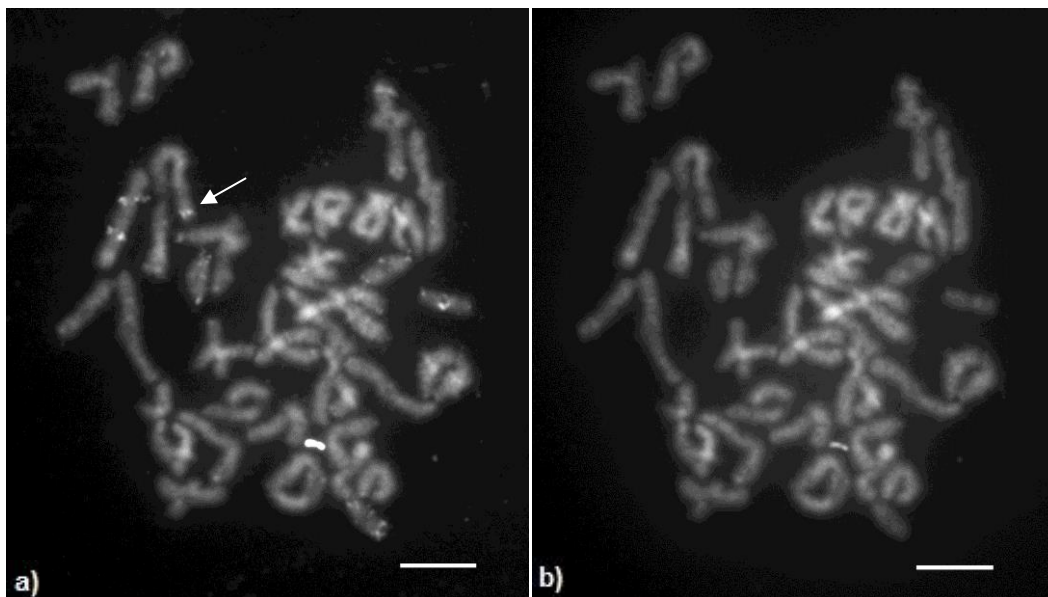


Obr. 42: rDNA FISH u *Liphistius* sp.nov (a) samčí preparát, diakineze, vizualizace 1 páru NOR na bivalentu a 1 NOR na trivalentu v oblasti odpovídající chromozomu X₁. (b) samičí preparát, mitotická metafáze, vizualizace 2 párů NOR. Měřítko - 10µm.

Obr. 43: Telomerická FISH u *Liphistius* sp. nov., samčí preparát, metafáze II. Nejsou detekovány telomerické repetice (TTAGG)_n. Měřítko - 10µm.



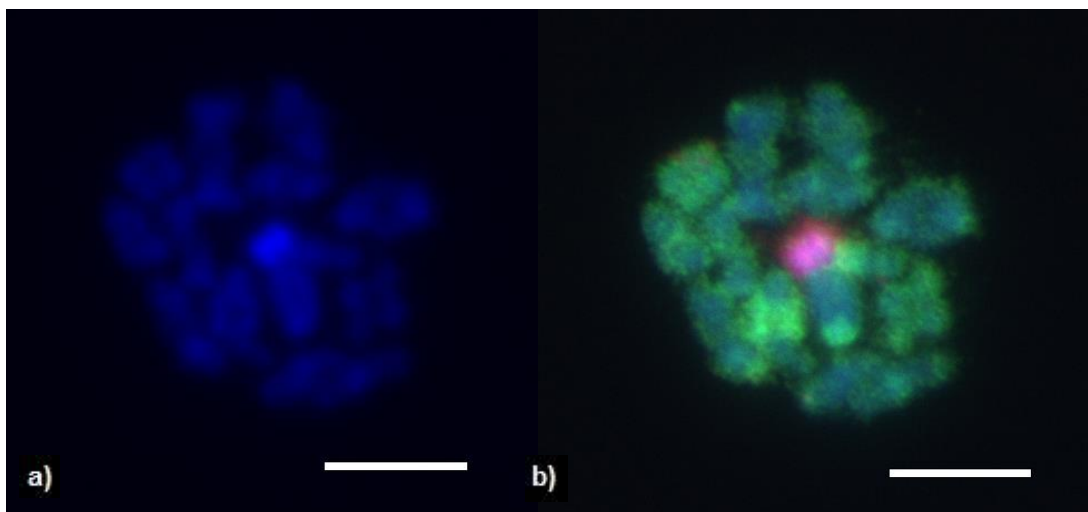
Obr. 44: CGH u *Liphistius* sp.nov. (a) samčí preparát, diplotene. Vizualizace samčího specifického signálu na trivalentu v oblasti chromozomu Y (šipka). (b) samičí preparát, mitotická metafáze, rovnoměrné nasedání obou sond, výrazně zvýšená koncentrace sond zejména na koncích chromozomů. Měřítko - 10µm.



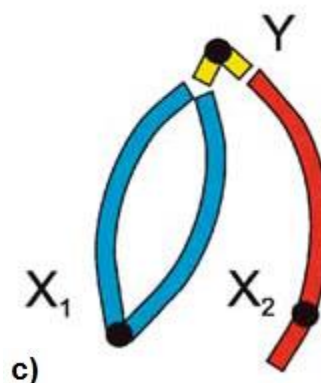
Obr. 45: Fluorescenční pruhování u *Liphistius* sp.nov., samčí preparát, diplotene (figura z obrázku X). (a) chromomycin A3, šipka ukazuje na GC bohatou oblast na chromozomu X₂. (b) DAPI. Měřítko - 10μm.

5.5.2 Podřád dvouplicní (Araneomorphae)

U některých čeledí araneomorfních pavouků se vyskytuje značně diferencovaný systém pohlavních chromozomů X₁X₂Y se zvláštním achiasmatickým párováním v meiotickém dělení samce. Tyto čeledě tvoří patrně monofyletickou skupinu. U těchto pavouků se vyskytuje značně diferencovaný chromozom Y, vyznačující se vysokým obsahem konstitutivního heterochromatinu a/nebo malou velikostí (KRÁL et al. 2006). Zástupce této skupiny pavouků jsme proto zvolili jako pozitivní kontrolu v experimentech CGH, jednalo se o běžně se vyskytující, synatropní druh *Pholcus phalangioides* (Pholcidae). Diploidní počet chromozomů u samců tohoto druhu je 25. Metodou CGH byl samčí specifickou sondou vizualizován chromozom Y. Ten je v tak vysokém stádiu diferenciaci, že je celý tvořený DNA specifickou pro samce (viz obr. 46).



Obr. 46: CGH u samce *Pholcus phalangioides*, samčí preparát, diakineze. (a) barvení DAPI - fluorochrom nejvíce zvýrazňuje vysoce kondenzovaný Y. (b) samčí specifická sonda nasedá na celý chromozom Y. Měřítko - 10 μ m (c) model pohlavních chromozomů, tak jak jsou uspořádány v trivalentu, černé body ukazují polohu centromer. (převzato z KRÁL et al. 2006)



6. Diskuze

6.1. Diploidní počty a morfologie chromozomů

Pavoukovci (Arachnida) patří mezi organismy, u nichž je prozatím relativně málo informací týkající se jejich chromozomů, u některých řádů pavoukovců tyto informace úplně chybí. Dosud byli studováni zástupci devíti řádů, a to pavouci, parazitiformí a akariformní roztoči, štíři, sekáči, štírci, bičovci a bičnatci. V rámci pavoukovců bylo pozorováno velké rozpětí v počtu chromozomů ($2n = 6 - 175$) (DULÍKOVÁ & KRÁL 2007; SCHNEIDER et al. 2009; TSURUSAKI 2007; ŠTÁHLAVSKÝ 2006, SEMBER 2010). Analýza karyotypové evoluce u bičovců (Sember 2010) a sklípkanů (KRÁL et al. 2013) ukazuje na vysoké diploidní počty u ancestrálních tetrapulmonálních pavoukovců. V průběhu evoluce se počty chromozomů postupně snižovaly. V karyotypech ancestrálních tetrapulmonátů byly patrně značně zastoupeny jednoramenné chromozomy. Tyto chromozomy převažují u nejbazálnějších pavouků – sklípkošů (Suzuki 1954, tato práce). Převažují nebo tvoří početnou frakci i u bičovců s vysokým počtem chromozomů, které lze považovat za bližší výchozím formám tohoto řádu (Sember 2010). V karyotypech amblypygidů s nízkým počtem chromozomů nalézáme většinou jen dvouramenné chromozomy (SUZUKI 1954; SEMBER 2010). Tyto chromozomy mohly vzniknout z jednoramenných např. působením Robertsonových translokací (SEMBER 2010).

V rámci práce jsem zjistila počet a morfologii chromozomů u některých druhů bičovců z americké čeledi Phrynidae. Tato čeleď má značné rozpětí počtu počtů chromozomů u této čeledi byli nalezeni jak bičovci s nejnižšími (24), tak i nejvyššími diploidními počty (86) (Sember 2010). Druh *P. aff. mexicanus* je blízce příbuzný *P. mexicanus*, který byl studován v diplomové práci A. Sembera (2010). Diploidní počet chromozomů *P. aff. mexicanus* (druhý typ) je 32 a zahrnuje 9 párů dvouramenných a 7 párů jednoramenných chromozomů. Diploidní počet chromozomů *P. mexicanus* je 24 a obsahuje pouze dvouramenné chromozomy. Pokud budeme předpokládat, že u 6 párů jednoramenných chromozomů u *P. aff. mexicanus* (druhý typ) dojde k Robertsonovým translokacím a zbylý pár jednoramenných chromozomů podstoupí tandemovou fúzi s jedním z dvouramenných chromozomů, dostaneme teoreticky karyotyp s 24 dvouramennými chromozomy, který bude velmi podobný karyotypu u *P. mexicanus*. Dalším studovaným karyotypem v této práci byl karyotyp *P. cubensis*, s 34 páry výhradně metacentrických chromozomů, takže 34 párů je v této skupině relativně nízký počet a proto nám výsledek, který odhalil pouze dvouramenné

chromozomy, koreluje s teorií Suzukiho 1954 a Sembera 2010). Pro studium karyotypu *H. elaphus* nebyly k dispozici na preparátech vhodné metafáze II a diploidní počet chromozomů byl určen z diakinezí a to na 74 chromozomů. Po obarvení chromozomů pomocí DAPI při FISH byly zvýrazněny centromery, byly patrná převaha akrocentrických chromozomů v karyotypu.

Značná diverzita diploidních počtů chromozomů byla pozorována i u bičnatců (36-78), přičemž nejvyšší počet chromozomů mají pravděpodobně opět bazální zástupci. U bičnatců ale neplatí stejný trend vývoje chromozomové morfologie jako u bazálních pavouků a bičovců, u některých druhů s nízkým počtem chromozomů se vyskytuje vyšší počet jednoramenných chromozomů. Ve své práci jsem popsala karyotyp dvou druhů. U *Typopeltis sp.* byl diploidní počet chromozomů 40, což je v rámci prozatím studovaných bičnatců nízký počet. V jeho karyotypu výrazně převládaly dvouramenné chromozomy, což by spíše odpovídalo trendu, který byl pozorován u bazálních pavouků a bičovců. U druhu *Thelyphonus sp.* byl diploidní počet chromozomů určen jako 66. Z důvodu vysoké kondenzace chromozomů v metafázi II nebylo možné sestavit pro tento druh karyotyp, tudíž jsme pro určení morfologie chromozomů použili C-pruhování, které odhalilo bloky centromerického heterochromatinu v mitotických metafázích. Na základě výsledků z C-pruhování je zřejmé, že u tohoto druhu jsou dvouramenné i jednoramenné chromozomy zastoupené přibližně ve stejném poměru. C-pruhování bylo provedeno i u předchozího druhu, což nám potvrdilo jak polohy centromer, tak i výskyt konstitutivního heterochromatinu výhradně v oblastech centromer. C-pruhování je tedy u bičnatců (tato práce) i bičovců (Sember 2010) možno použít jako alternativní metodu stanovení polohy centromer. U těchto skupin není často možné spolehlivě rozeznat primární konstriktce v mitotické metafázi, v metafázi II mohou být zase chromozomy buď příliš kondenzované nebo rozvolněné. U studovaných bičovců se mi však nepodařilo indukovat C-pruhy, použitá varianta C-pruhování nebyla vhodná - chromozomy na preparátech degradovaly.

V rámci své práce jsem získala první cytogenetické údaje o chromozomech krátkochvostů a roztočovců. V obou případech jsem měla k dispozici jen velmi málo materiálu, proto nebylo možné sestavení klasického karyotypu. U krátkochvosta *Stenochrus sp.* byl diploidní počet chromozomů určen jako 22, přičemž se jednalo výhradně o akrocentrické chromozomy. Údaje o morfologii chromozomů byly získány při metodě FISH, DAPI výrazněji obarvilo centromery. U roztočovce druhu *Pseudocellus gertschi* bylo k dispozici ještě méně materiálu než v předchozím případě, na preparátu jsem pozorovala

pouze několik profází prvního meiotického dělení a velmi špatně rozprostřené mitotické metafáze. Diploidní počet chromozomů mohl být tedy stanoven pouze orientačně, karyotyp je tvořen přibližně 40 chromozomy. Po obarvení DAPI při metodě FISH se opět zvýraznily centromery, což mi pomohlo určit morfologii chromozomů. V karyotypu jsem opět pozorovala převahu akrocentrických chromozomů. Karyotyp ale obsahoval i dvouramenné chromozomy (minimálně jeden větší pár metacentrických chromozomů a asi dva páry submetacentriků).

Cytogenetická analýza u zástupce sklípkošů (*Liphistius* sp. nov.) odhalila vysoký diploidní počet chromozomů (samec 73, samice 74) s převahou jednoramenných chromozomů. Protože se jedná o bazální skupinu pavouků, je tímto výsledkem podpořena jednak teorie Suzukiho (1954), podle které byl u pavouků původně přítomen vysoký počet chromozomů, jednak teorie Sembera (2010) o převaze jednoramenných chromozomů u ancestrálních tetrapulmonátů.

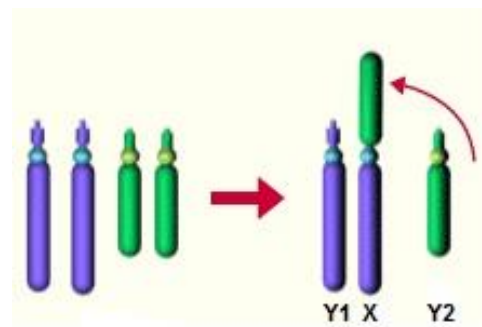
6.2. Pohlavní chromozomy

U některých skupin pavoukoců nebyly nalezeny diferencované pohlavní chromozomy. Absence morfologicky diferencovaných pohlavních chromozomů je tedy pravděpodobně ancestrálním znakem pavoukoců (KRÁL et al. 2008). K morfologické diferenciaci pohlavních chromozomů dochází jen u některých řádů, například řádu pavouků, kteří jsou některými autory označováni jako blízce příbuzní bičovců. Z tohoto důvodu jsme se metodou CGH snažili nalézt pohlavní chromozomy u vybraných bičovců čeledi Phryniidae a Phrynichidae, kde předchozí studie morfologie chromozomů respektive CGH naznačovala jejich existenci. Fungování zvolené metody CGH jsem nejprve ověřovala u příbuzných pavoukoců, jako pozitivní kontrolu jsem použila zástupce haplogynních pavouků, *Pholcus phalangoides* (Pholcidae) s vysoce diferencovanými pohlavními chromozomy. Vizualizován byl celý chromozom Y, proto jsem u skupin s dosud nedetekovanými pohlavními chromozomy použila stejný protokol.

V diplomové práci Sembera byly metodou CGH detekovány primitivní pohlavní chromozomy u *P. mexicanus*, u kterého byl prokázán výskyt systému ♂XY/♀XX (SEMBER 2010). Ve své práci jsem měla k dispozici blízce příbuzný druh *P. aff. mexicanus*. Karyotyp samců byl tvořen 31 chromozomy, samic 30 chromozomy. Již samotná data o počtu a morfologii chromozomů v karyotypu ukazují na výskyt pohlavních chromozomů. Další indikací je výskyt nápadného trivalentu v diplotene, diakinezi a metafázi I samce. Segregace

chromozomů trivalentu naznačuje, že trivalent je složený z chromozomů X, Y₁ a Y₂. Metodou CGH jsme na tomto trivalentu detekovali signál specifický pro samčí pohlaví, stejný signál jsme pak pozorovali i v metafázi II na koncích subteloцентриckého respektive akrocentrického chromozomu, který odpovídá jednomu z Y chromozomů. Při studiu tohoto druhu jsem bohužel netušila, že se na stejné lokalitě vyskytuje ještě další karyotyp tohoto druhu. Při výrobě preparátů z posledního samce jsem zjistila, že v jeho diplotene a diakinezích chybí trivalent s pohlavními chromozomy, karyotyp tohoto jedince byl tvořen 32 chromozomy. Tento exemplář (označovaný jako druhý typ) se morfologicky nijak neliší od jedince prvního typu (M. SEITER, ústní sdělení). Karyotypy obou typů jsou velmi podobné. Struktura karyotypu druhé formy ukazuje, že se jedná pravděpodobně o evolučně původní formu druhu *P. aff. mexicanus*. Její karyotyp je možno odvodit z karyotypu druhu *P. mexicanus*. U systému XY₁Y₂ druhu *P. aff. mexicanus* se tedy jedná o neopohlavní systém (viz obr. 47). Oba karyotypy mohou představovat vnitropopulační polymorfismus, protože všechny exempláře byly sbírány na stejné lokalitě. Jinou možností je, že karyotypové formy představují koexistující kryptické druhy, které se vzájemně nekříží, jsou tedy odděleny reprodukční bariérou. Pokud se jedná o samičky, je pravděpodobné, že jsme měli k dispozici pouze samičky prvního typu, protože v jejich mitotických metafázích lze snadno odlišit velký pár chromozomů X od ostatních párů chromozomů.

Obr. 47: Schématické znázornění vzniku neopohlavních chromozomů u *P. aff. mexicanus* (první typ). Fialový pár akrocentrických chromozomů jsou původní pohlavní chromozomy, tedy homomorfní chromozom X a Y, zelený pár je tvořen akrocentrickými autozomy. Robertsonovou translokací mezi chromozomem X a jedním autozomem vznikl chromozom X. Chromozom Y₂ vznikl z druhého autozomu.



Přítomnost neopohlavního systému u bičovců ukazuje, že neopohlavní systémy mohou v evoluci pohlavních chromozomů vznikat velmi brzo, takže se dá říci, že mohou vznikat v jakémkoli stádiu evoluce pohlavních chromozomů.

Kromě samčího specifického signálu detegující pravděpodobně jeden z Y chromozomů, jsme dostali i silný samčí specifický signál na jednom z bivalentů. Tento

výsledek může naznačovat přítomnost páru nediferencovaných pohlavních chromozomů, jak je tomu u některých skupin pavouků (KRÁL 2007; KRÁL et al. 2013). Jinou příčinou, která mohla vést k vizualizaci tohoto popř. i dalších signálů ležících mimo trivalent XY_1Y_2 , je možná výroba sondy ze samice jiného typu, než je typ s neopohlavními chromozomy, protože v době, kdy jsme prováděli experimenty CGH, jsem neměla tušení, že se u tohoto druhu může nacházet více karyotypových forem. Samec s karyotypem druhého typu byl objeven až těsně před dokončením diplomové práce. Po ověření, že karyotyp samic odpovídá samcům se systémem XY_1Y_2 (je tedy tvořen 30 chromozomy a obsahuje pár výrazných, velkých chromozomů X), jsem již karyotypy samic nesledovala, takže pro přípravu sondy mohla být použita samice druhého typu.

U zástupců čeledi Phrynichidae, u kterých jsem také prováděla metodu CGH (*P. deflersi arabicus* a *P. dhofarensis*), nebyl detekován samčí ani samičí specifický signál, který by znamenal přítomnost pohlavních chromozomů. Zajímavé bylo, že u obou druhů jsem mohla sledovat vysoké koncentrace obou sond na koncích některých chromozomů, a to i při použití kompetitivní DNA pro blokování repetitivních sekvencí. Tyto oblasti jsou pravděpodobně tvořeny repetitivními sekvencemi.

U řádu bičnatců nebylo možné vyzkoušet metodu CGH, protože u daných druhů chyběly samice. V práci bylo prokázáno, že se u druhu *Thelyphonus sepiaris* vyskytuje systém ♂XY/♀XX. U zástupce rodu *Thelyphonus*, kterého jsem měla k dispozici, nebyly pohlavní chromozomy morfologicky diferencovány. To naznačuje rychlou diferenciaci pohlavních chromozomů u tohoto rodu. Rychlá diferenciaci pohlavních chromozomů byla pozorována např. i u bazálních skupin ptáků (TSUDA et al. 2007).

U skupin krátkochvosti a roztočovci jsem taktéž nemohla použít metodu CGH, a to z důvodu nedostatku materiálu jak samčího, tak samičího.

Metoda CGH nám pomohla objasnit podobu pohlavního systému u sklípkoše druhu *Liphistius* sp. nov. Karyotyp samce byl tvořen 73 chromozomy, zatímco samice měly 74 chromozomů. U samce se v diplotene, diakinezi a metafázi I objevoval zvláštní trivalent chromozomů X_1X_2Y . Nejdelším pohlavním chromozomem byl Y, který byl umístěn uprostřed trivalentu. Tento chromozom, pároval na jednom konci pomocí chiazmatu s X_1 chromozomem, na druhém konci pároval terminálně s X_2 . U tohoto kontaktu nejsem schopna říci, zda se jedná o párování pomocí chiazmatu nebo jiný způsob spojení. Metoda CGH detekovala výskyt samčího specifického signálu v interkalární oblasti jednoho z ramének

metacentrického Y chromozomu. Na samčích i samičích preparátech se opět objevovala zvýšená koncentrace obou sond v určitých částech chromozomů a to zejména v jejich koncích, bez ohledu na použití kompetitivní DNA. Tyto oblasti byly pravděpodobně tvořeny repetitivní DNA. Zajímavé také bylo, že na kratším chromozomu X_2 byla detekována oblast s výskytem NOR. NORy na pohlavních chromozomech pavouků nejsou žádnou výjimkou a byly detekovány např. u haplogynních dvouplnicých pavouků (KRÁL et al. 2006). Studium pohlavních chromozomů u těchto primitivních pavouků je důležité a mohlo by pomoci objasnit, jakým způsobem u pavouků vznikl systém X_1X_20 .

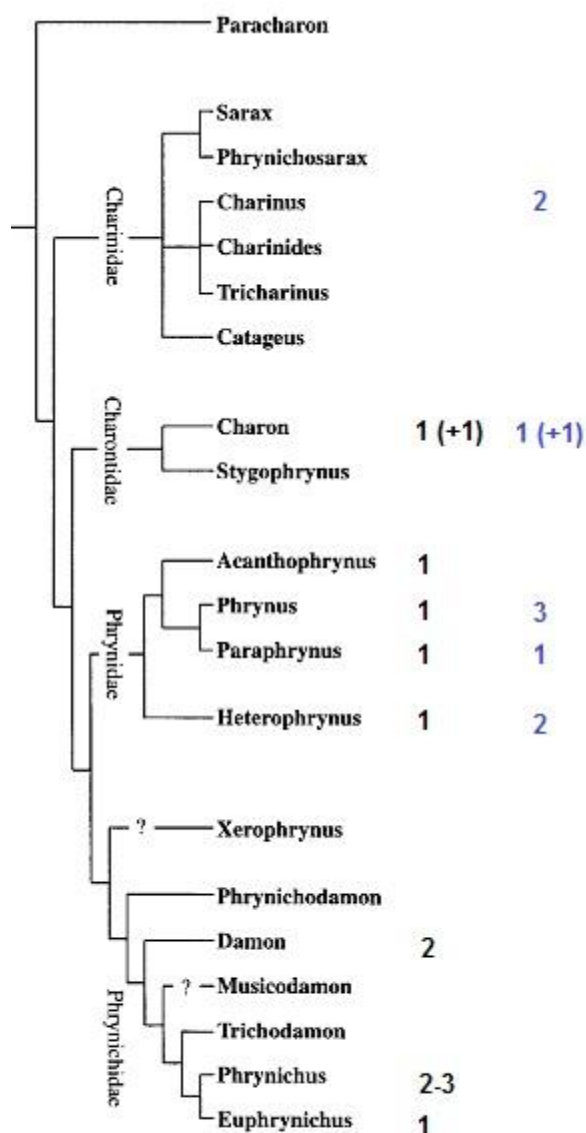
Zástupce haplogynních dvouplnicých pavouků *Pholcus phalangoides*, který nám sloužil jako kontrola funkčnosti metody CGH, měl stejně jako *Liphistius* sp. nov. systém pohlavních chromozomů X_1X_2Y , který v diplotene, diakinezi a metafázi I tvořil trivalent. Struktura tohoto systému a meiotické párování těchto pohlavních chromozomů jsou však velmi odlišné od sklípkoše. Obě skupiny pavouků jsou také zcela nepříbuzné. Systém X_1X_2Y vznikl tedy u sklípkoše a haplogynních pavouků zcela nezávisle.

6.3. Nukleolární organizátory

Informace o počtech a polohách NORů u pavoukoců byly většinou získány stříbření, v posledních letech byly u některých druhů NORy detegovány i metodou FISH. Prozatímni výsledky naznačují, že pro pavoukocce je pravděpodobně ancestrálním znakem 1 pár NORů lokalizovaný na autozomovém páru (FORMAN et al. 2013). Takový pattern se vyskytuje často u pavouků (KRÁL et al. 2013), bičovců (tato studie) a klíšťat (HILL et al. 2009; SCHNEIDER & CELLA 2010), byl nalezen také u zástupců štírů (SCHNEIDER et al. 2008), krátkochvostů, roztočoců (tato práce) a štírenek (KRÁL et al. 2008). Vyšší počty jsou méně běžné a ke zvyšování počtu NORů může docházet např. chromozomovými přestavbami (CABRERO & CAMACHO 2008). Detekcí NORů metodou FISH u bičovců jsem zjistila, že nejčastější pattern je u nich právě 1 pár NOR. Nukleolární organizátory se nejčastěji vyskytují v terminálních nebo subterminálních oblastech chromozomů, relativně časté jsou i v pericentrické oblasti. V této poloze byly nalezeny u zástupce rodu *Euphrynichus* (Phrynichidae) (tato práce) a u zástupců rodů *Phrynus* a *Paraphrynus* (Phrynichidae) (SEMBER 2010; tato práce). U posledních dvou rodů leží v pericentrické oblasti delších ramének páru submetacentrických chromozomů. Jedná se zřejmě o synapomorfii těchto rodů. Zatím co u všech zástupců čeledi Phrynidae jsem našla jeden pár NORů, u čeledi

Phrynichidae je jejich počet vyšší, u některých druhů rodu *Phrynichus* se vyskytují tři páry NORů. U druhů s více páry NORů se tyto struktury většinou nacházely na koncích krátkých ramének. Výsledky získané metodou FISH jsem srovnala s výsledky získanými metodou stříbření, které získal ve své diplomové práci Sember (2010).

Obr. 48: Systematické členění řádu bičovců s počty párů NORů u studovaných rodů. Černě jsou výsledky získané metodou FISH, modře výsledky získané metodou stříbření (upraveno podle WEYGOLDT 2000)



Výsledky získané metodou stříbření a FISH jsou rozdílné u rodů *Heterophrynus* a *Phrynus*. U prvního rodu se pravděpodobně nejedná o chybu, protože jsem k detekci použila jiný druh. U rodu *Phrynus* byly však obě metody aplikovány na stejný druh a populaci, výsledky se neshodují. Metoda FISH odhalila jen jeden pár NORů, zatímco metodou stříbření byly odhaleny dokonce tři páry. Vzhledem k tomu, že metoda FISH je přesnější a lépe odečitatelná, se přikláním výsledku, který byl získán touto metodou. U druhu *Charon grayi* se v diplomové práci Sembera (2010) uvádí, že pomocí dusičnanu stříbrného byly detekovány dva páry NORů a tyto struktury byly většinou aktivní jen na třech chromozomech. Metodou

FISH byly NORy taktéž detekovány pouze na třech chromozomech, tzn. jednom chromozomovém páru a jednom dalším chromozomu, nejedná se tedy o dva páry NORů. Výskyt NORu na 1 chromozomu může být vysvětlen tím, že se jedná o pár heterozygotní pro NOR. V takovém případě by se měli v populaci vyskytovat homozygoti s jedním nebo dvěma páry NORů a pak jedinci heterozygotní, s NORy na třech chromozomech. Dalším vysvětlením by bylo, že lichý NOR se nachází na pohlavním chromozomu.

Pro kompletní pochopení evoluce NORů u bičovců by bylo třeba prozkoumat i zástupce čeledi Charinidae, kteří jsou sesterskou skupinou větve tvořené čeleděmi Charontidae, Phrynidae a Phrynichidae. Prozatím můžeme říci, že se počty NORů v rámci evoluce bičovců postupně zvyšují a NORy se dostávají dovnitř chromozomů různými chromozomovými přestavbami.

U bičnatců byly nalezeny dva nebo tři páry NORů na krátkých raménkách chromozomů různé morfologie.

U zástupců krátkochvostů a roztočovců byl nalezen jeden pár NORů. U krátkochvostů je umístěn interkalárně na akrocentrickém páru, u roztočovců pravděpodobně na koncích chromozomů. Přesnější morfologii chromozomů roztočovců s NOR jsem však nemohla určit z důvodu nedostatku vhodných figur.

U sklípkoše druhu *Liphisti* sp.nov. byl detekován NOR na jednom páru autozomů a na pohlavním chromozomu X_1 . Výskyt NORů na pohlavních chromozomech byl popsán u různých skupin pavouků, dosavadní výsledky naznačují, že v průběhu evoluce pavouků docházelo k opakovaně k začleňování NORů do pohlavních chromozomů (KRÁL et al. 2013). Obzvláště často se NORy vyskytují na pohlavních chromozomech haplygynních dvouplicných pavouků (KRÁL et al. 2006). NORy pavouků se nachází většinou v terminálních nebo subterminálních oblastech chromozomů. Tomu odpovídá i umístění NORů u sklípkošů.

U tohoto pavouka jsem v metafázi II často pozorovala zvláštní drobnou kulovitou strukturu, o které jsem se domnívala, že by mohla být jadérkem. Persistencee jadérka v průběhu meiotického dělení byla pozorována u některých brouků a cvrčků (SATYA-PRAKASH & PATHAK 1984). Tuto hypotézu jsem testovala pomocí stříbření, ale výsledek byl negativní, tudíž se pravděpodobně o jadérko nejednalo.

6.4. Telomerické repetice

Pro pavoukovce a zároveň i pro členovce je evolučně původní tzv. hmyzí telomerický motiv s repeticí (TTAGG)_n (VÍTKOVÁ et al. 2005). U zástupců tetrapulmonálních pavoukovců jsem zkoumala nejen výskyt tohoto motivu, ale zároveň jsem sledovala i případný výskyt intersticiálních telomerických repetic. Přítomnost hmyzího motivu byla objevena u jednoho druhu bičovce čeledi Phrynichidae (VÍTKOVÁ et al. 2005), v mé práci byla nalezena nejen u této čeledi, ale i zástupců čeledi Charontidae a Phrynidae. Karyotypy bičovců se vyznačují značnou diverzitou morfologie chromozomů (SEMBER 2010), v průběhu evoluce jejich evoluce je tedy možno předpokládat zvýšený počet chromozomových přestaveb, kterými se mohou dostávat telomerické repetice dovnitř chromozomu. Z toho důvodu jsem se zaměřila na výskyt intersticiálních telomerických repetic u vybraných druhů. U *Acantophrynus coronatus*, *Paraphrynus aztecus*, *Phrynichus orientalis* a *Phrynus whitei* nebyly pozorovány. U druhu *P. aff. mexicanus* (první typ) byla pravděpodobně detekována přítomnost intersticiálních repetic a to v subterminální oblasti jednoho páru chromozomů. Nejpravděpodobnější možností, jak se tyto telomerické repetice mohly dostat dovnitř chromozomu, je pericentrická inverze.

Důvodem proč nebylo detekováno více intersticiálních telomerických repetic je ten, že klasickou metodou FISH není možné vizualizovat 100 % oblastí s výskytem telomerických repetic. Někdy je dokonce obtížné pozorovat signály na koncích všech chromozomů. K detailnějšímu studiu intersticiálních repetic by tedy bylo třeba využít citlivější metody.

U řádů bičnatců, krátkochvostů a roztočovců byly v této práci získány první údaje o telomerických repeticích, tyto skupiny se vyznačují také „hmyzím“ motivem. Výskyt tohoto motivu u všech tří řádů je v souladu s hypotézou, že se jedná o původní telomerický motiv pavoukovců.

Jaká sekvence tvoří telomerickou DNA pavouků zůstává stále neznámo. V předchozích pracích byl „hmyzí“ motiv vyloučen u podřádu Opisthothelae, tedy u sklípkanů (VÍTKOVÁ et al. 2005) a dvouplicných pavouků (SAHARA et al. 1999). Já jsem pomocí metody FISH vyloučila tento motiv i u druhého podřádu pavouků - sklípkošů. Tento výsledek by bylo třeba ještě podpořit metodou southernovy hybridizace.

7. Souhrn

V rámci mé práce byly získány údaje o evoluci pohlavních chromozomů, nukleolárních organizátorů a telomerických repetic u tetrapulmonálních pavoukoců. Do práce bylo zahrnuto dvanáct druhů bičovců, dva druhy bičnatců, po jednom druhu krátkochvostých a roztočovců a jeden zástupce primitivních pavouků - sklípkošů. Řád bičovců vykazoval dva vzory nukleolárních organizátorů na chromozomech. Pokud byl detekován nukleolární organizátor na jediném chromozomovém páru, nacházel se většinou v pericentrické oblasti delších ramének submetacentrických /metacentrických chromozomů. V případě, že byl nukleolární organizátor vizualizován na dvou nebo třech párech chromozomů, nacházel se na koncích krátkých ramének submetacentrických popř. subteloцентрических chromozomů. Synapomorfii rodů *Phrynus* a *Paraphrynus* z čeledi Phrynichidae je jediný pár nukleolárních organizátorů v pericentrické oblasti páru submetacentrických/metacentrických chromozomů. Zajímavostí bylo, že u druhu *Charon grayi* byl detekován nukleolární organizátor na třech chromozomech, což může znamenat, že tyto jedinci mohou být v jednom páru chromozomů heterozygotní pro nukleolární organizátor. Jiným vysvětlením může být výskyt nukleolárního organizátoru na pohlavním chromozomu, což bylo pozorováno např. u pavouků. Pokusy mého předchůdce detekovat pohlavní chromozomy u tohoto bičovce metodou CGH byly však neúspěšné. Řád bičnatců vykazoval dva nebo tři páry nukleolárních organizátorů na krátkých raménkách chromozomů různé morfologie. Pro vyvození závěrů o evoluci NORů u této skupiny by bylo třeba prostudovat v rámci tohoto řádu více rodů.

U řádu krátkochvostů a roztočovců se jednalo o úplně první detekci nukleolárních organizátorů. Zástupci těchto řádů měli nukleolární organizátor na jenom páru chromozomů, přičemž u zástupce krátkochvostů byl umístěn v interkalární oblasti akrocentrického páru chromozomů, u roztočovce byl vizualizován na konci chromozomu. U sklípkoše *Liphistius* sp. nov. byl nukleolární organizátor lokalizován na jednom páru autozomů a X chromozomu. Výskyt nukleolárních organizátorů na pohlavních chromozomech není u pavouků vzácným jevem a byl popsán např. u haplogynních pavouků.

Tzv. „hmyzí“ telomerický motiv je považován za evolučně původní pro členovce i pavoukocce. Co se týče pavoukoců, tento motiv nebyl v předchozích pracích nalezen pouze u pavouků podřádu Opisthothelae. V této práci jsem metodou FISH vyloučila přítomnost tohoto motivu i u zbývajících podřádu pavouků - sklípkošů. Tento motiv byl naopak potvrzen

u bičovců a objeven i u bičnatců, krátkochvostů a roztočovců. Pavouci jsou tak jediným známým řádem pavoukovců, u kterého tento motiv chybí. U bičovce *Paraphrynus* aff. *mexicanus* jsem pravděpodobně detekovala i oblast s intersticiálními telomerickými repeticemi.

Metodou CGH byly detekovány pohlavní chromozomy u bičovce *Paraphrynus* aff. *mexicanus* a *Liphistius* sp. nov. U samců druhu *P.* aff. *mexicanus* z lokality Anenecuilco v Mexiku s $2n = 31$ byl objeven systém neopohlavních chromozomů XY_1Y_2 . Na stejné lokalitě se vyskytuje i výchozí forma, jejíž samci se vyznačují 16 páry homologických chromozomů, mezi kterými se pravděpodobně skrývá jeden pár homomorfních pohlavních chromozomů. Systém XY_1Y_2 vznikl pravděpodobně Robertsonovou translokací mezi akrocentrickým chromozomem X a jedním akrocentrickým autozomem výchozí formy. V předchozích studiích nebyly u bičovců nalezeny morfologicky diferencované chromozomy, byl prokázán jen výskyt homomorfních pohlavních chromozomů XY u blízce příbuzného druhu *P. mexicanus*. Můj výsledek je tedy prvním nálezem morfologicky diferencovaných pohlavních chromozomů u bičovců. Analýza bičovců rodu *Paraphrynus* ukazuje, že neopohlavní chromozomy mohou vznikat již v raných fázích evoluce pohlavních chromozomů. U sklípkoše *Liphistius* sp. nov., který je zástupcem nejprimitivnější větve pavouků, byl objeven systém pohlavních chromozomů X_1X_2Y . V diplotene a diakinezi tvoří pohlavní chromozomy samce zvláštní trivalent s Y chromozomem uprostřed. Pro pochopení vzniku složitých pohlavních systémů u pavouků bude však zapotřebí prostudovat pohlavní chromozomy u více skupin primitivních pavouků.

Seznam literatury

- Araújo, D., Brescovit, A. D., Rheims, C. A. & Cella, D. M. (2005): Chromosomal data of two pholcids (Araneae, Pholcidae): A new diploid number and the first cytogenetical record for the New World clade. *J. Arachnol.* 33: 591 – 596.
- Ax, P. (1996): *Multicellular animals. A new approach to the phylogenetic order in nature.* Springer, Berlin, Heidelberg, New York. pp. 1–225.
- Azzalin, C.M., Mucciolo, E., Bertoni, L., Giulotto, E. (1997): Fluorescence in situ hybridization with a synthetic (T2AG3)_n polynukleotide detects several intrachromosomal telomere-like repeats on human chromosomes, *Cytogenet. Cell Genet.* 78: 112–115.
- Azzalin, C.M., Nergadze, S.G., Giulotto, E. (2001): Human intrachromosomal telomeric-like repeats: sequence organization and mechanisms of origin, *Chromosoma* 110:75–82.
- Bachtrog, D. (2008): The temporal dynamics of processes underlying Y chromosome degeneration. *Genetics* 179: 1513–1525.
- Bailey, S.M., Goodwin, E.H., Cornforth, M.N. (2004): Strand-specific fluorescence in situ hybridization: the CO-FISH family. *Cytogenetic and Genome Research* 107: 14–17.
- Balajee, A.S., Natarajan, H.J. Oh, A.T (1994): Analysis of restriction enzyme-induced chromosome aberrations in the interstitial telomeric repeat sequences of CHO and CHE cells by FISH, *Mutat. Res.* 307: 307–313.
- Baird, D.M. (2005): New developments in telomere length analysis. *Experimental gerontology* 40: 363–368.
- Benavente, R., Wettstein, R. (1980): Ultrastructural characterization of the sex chromosomes during spermatogenesis of spiders having holocentric chromosomes and a long diffuse stage. *Chromosoma* 77: 69 – 81.
- Bertoni, L., Attolini, C., Tessera, L., Mucciolo, E. Giulotto, E (1994): Telomeric and nontelomeric (TTAGGG)_n sequences in gene amplification and chromosome stability, *Genomics* 24:53–62.
- Bi, K., Bogart, J.P. (2006): Identification of intergenomic recombinations in unisexual salamanders of the genus *Amphispiza* by genomic in situ hybridization (GISH). *Cytogenetic and Genome Research* 112: 307–312.
- Bole – Gowda, B.N. (1952): Studies on the chromosomal and sex – determining mechanism of four hunting spiders (Sparassidae). *Proc. Zool. Soc. Bengal* 5: 51 – 70.
- Bolzan, A.D., Bianchi, M.S. (2006): Telomeres, interstitial telomeric repeat sequences, and chromosomal aberrations, *Mutat. Res.* 612:189–214.
- Brown, D. D., and Gurdon, J. B. (1964): Absence of ribosomal RNA synthesis in the anucleolate mutant of *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 51, 139–146.
- Bull, J.J. (1983): *Evolution of Sex Determining Mechanisms.* Benjamin/Cummings, Menlo Park, CA, USA.

- Cabrero, J., Camacho, J.P.M. (2008): Location and expression of ribosomal RNA genes in grasshoppers: abundance of silent and cryptic loci. *Chromosome research* 16: 595-607:
- Carvalho, B.A., Koerich, L.B., Clark, A.G. (2009): Origin and evolution of Y chromosomes: *Drosophila* tales. *Trends in Genetics* 25: 433-440.
- Coddington, J.A., Levi, H.W. (1991): Systematic and evolution of spiders (Araneae): *Annual Review of Ecology and Systematics* 22: 565-592.
- Coghill, G., Grant, A., Orrell, J.M., Jankowski, J. Evans. A.T. (1990): Improved silver staining of nucleolar organiser regions in paraffin wax sections using an inverted incubation technique. *J. Clin. Pathol* 43, 1029 – 1031.
- Datta, S.N., Chatterjee, K. (1988): Chromosomes and sex determination in 13 araneid spiders of North-Eastern India. *Genetica* 76: 91 – 99.
- Dechampsme, A. M., Koroleva, O., Leger-Silvestre, I., Gas, N., and Camier, S. (1999): Assembly of 5S ribosomal RNA is required at a specific step of the pre-rRNA processing pathway. *J. Cell Biol.* 145, 1369–1380.
- de Sá, R.O., Hillis, D.M. (1990): Phylogenetic relationship of the pipid frogs *Xenopus* and *Silurana*: an integration of ribosomal DNA and morphology. *Mol. Biol. Evol.* 7: 365-376.
- Dolejš P., Kořínková T., Musilová J., Opatová V., Kubcová L., Buchar J., Král J. (2011): Karyotypes of central European spiders of the genera *Arctosa*, *Tricca*, and *Xerolycosa* (Araneae: *Lycosidae*). *Eur. J. Entomol.* 108 (1): 1-16.
- Dulíková, L. & Král, J. (2007): Insights into the karyotype evolution of the spider infraorder Mygalomorphae. In: Pinto-da-Rocha R., Machado. G. & Brescovit A.D.(eds): Abstracts, 17th International Congress of Arachnology, Sao Paulo.
- Dunlop, J.A. (1996): Evidence for a sister group relationship between Ricinulei and Trigonotarbida. *Bull. Br. arachnol. Soc.* 10: 193-204.
- Eisner, T., Meinwald, J., Monro, A. & Ghent, R. (1961): Defense mechanisms of arthropods - I. The composition and function of the spray of the whipscorpion, *Mastigoproctus giganteus* (Lucas) (Arachnida: Pedipalpida). *J. Insect Physiol.* 6: 272 – 298.
- Eliceiri, G. L. (1999). Small nucleolar RNAs. *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 22–31.
- Ellegren, H. (2011): Sex-chromosome evolution: recent progress and the influence of male and female heterogamety. *Genetics* 12, 157-166.
- Fahrein, K., Masta, S.E., Podsiadlowski, L. (2009): The first complete mitochondrial genome sequences of *Amblypygi* (Chelicerata: Arachnida) reveal conservation of the ancestral arthropod gene order. *Genome* 52: 456-466.
- Fajkus, J., Sykorova, E., Leitch, A.R. (2005): Technique in plant telomere biology. *Biotechnologies* 38: 233-243.
- Fatica, A., Tollervey, D. (2002): Making ribosomes. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 14: 313-318.

- Felsenstein, J. (1974): The evolutionary advantage of recombination. *Genetics* 78, 737-756.
- Forman, M., Nguyen, P., Hula, V., Král, J. (2013): Sex chromosome pairing and extensive NOR polymorphism in *Wadicosa fidelis* (Araneae: Lycosidae). *Cytogenetic Geome Res.* 141: 43-49.
- Furlong, J. C., Maden, B. E. H. (1983): Pat-terns of major divergence between the internal transcribed spacers of ribosomal DNA in *Xeno-pus borealis* and *Xenopus laevis*, and of minimal divergence within ribosomal coding regions. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.)J.*, 2:443-448.
- Gerbi, S. A., and Borovjagin, A. V. (2004): Pre-ribosomal RNA processing in multicellular organisms. In “TheNucleolus”(M.O. J.Olson,Ed.), pp. 170–198.
- Glover, T.W., Stein, C.K. (1988): Chromosome breakage and recombination at fragile sites, *Am. J. Hum. Genet.* 43:265–273.
- Goodwin, E. Meyne, J. (1993): Strand-specific fish reveals orientation of chromosome-18 alphoid dna. *Cytogenetics and cell Genetics* 63: 126-127
- Griffiths ,A.P., Butler, C.W., Roberts, P., Dixon ,M.F., Quirke, P.(1989): Silver stained structures (AgNORs) their dependence on tissue fixation and absence of prognostic relevance in rectal adenocarcinoma. *J Pathol*;159:121-7.
- Gutell, R. R., Fox, G. E. (1988): A compilation of large subunit RNA sequences presented in a structural format. *NucleicAcids Res.*, 16: 75- 269.
- Hackman, W. (1948): Chromosomenstudien an Araneen mit besonderer Berücksichtigung der Geschlechtschromosomen. *Acta Zool. Fenica* 54: 1 – 101.
- Hadjiolov, A.A. (1985): „The nucleolus and ribosome biogenesis“ Springer, New York.
- Halanych, K. M. (199): 5S ribosomal RNA se-quences inappropriate for phylogenetic recon-struction. *Mol. Biol. Evol.*, 8:249-253.
- Harvey, M.S. (2002): The neglected cousins: what do we know about the smaller arachnid orders? *J. Arachnol.* 30: 357 – 372.
- Harvey, M.S. (2003): Catalogue of the smaller arachnid orders of the World: Amblypygi, Uropygi, Schizomida, Palpigradi, Ricinulei and Solifugae. CSIRO Publishing, Collingwood, Victoria, Australia.
- Harvey, M.S. (2007): The smaller arachnid orders: diversity, descriptions and distributions from Linnaeus to the present (1758 to2007). *Zootaxa*, 1668: 363–380.
- Haupt, J., Höhne, G., Schwarz, H., Chen, B., Zhao, W. & Zhang, Y. (1988): Chinese whip scorpions using 2-ketones in defense secretion (Arachnida: Uropygi). *Journal of Comparative Physiology B* 157: 883 – 885.
- Haupt J., Höhne, G., & Weiske, T. (1993): Acetic acid esters, *n*-hexanol, *n*-octanol, and capronic acid as ingredients in the defense secretion product of whip scorpions. *C. R. XIVE Coll. Europ. Arachnol. Catania*, 23D27 aout 1993. *Boll. Acc. Gioenia Sci. Nat.* 26: 175 - 180.
- Heitz, E. (1931): Die ursache der gesetzmässigen zahl. lage, form und grösse pflanzlicher nukleolen. *Planta* 12: 775-884.

- Hill, C.A., Guerrero, F.D., Van Zee, J.P., Geraci, N., Walling, J.G., Stuart, J.J. (2009): The position of repetitive DNA sequence in the southern cattle tick genome permits chromosome identification. *Chromosome Res* 17: 77–89
- Hillis, D. M., Dixon, M. T. (1989): Vertebrate phylogeny: evidence from 28S ribosomal DNA sequences. In B. Fernholm, K. Bremer, and H. Jornvall (eds.), *The Hierarchy of Life*, pp. 355-367.
- Hillis, D.M., Dixon M.T. (1991): Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q Rev Biol* 66: 411-453.
- Hillis, D. M., Dixon, M. T., Ammerman, L. K. (1991): The relationships of the coelacanth *Latimeria chalumnae*: evidence from sequences of vertebrate 28S ribosomal RNA genes. *Envir. Biol. Fishes*, 32:119-130.
- Hillis, D. M., Larson, A., Davis, S. K., Zimmer, E. A. (1990): Nucleic Acids III: sequencing. In D. M. Hillis and C. Moritz (eds.), *Molecular Systematics*, pp. 318-370.
- Hiscox, J. A. (2002): Brief review: The nucleolus—a gateway to viral infection? *Arch. Virol.* 147: 1077–1089.
- Hoshikawa, Y., Iida, Y., Iwabuchi, M. (1983): Nucleotide sequence of the transcriptional initiation region of *Dictyostelium discoideum* rRNA gene and comparison of the initiation regions of three lower eukaryotes' genes. *Nucleic Acids Res.*, 11:1725-1734.
- Howell, W.M. & Black, D.A. (1980): Controlled silver-staining of nucleolusorganizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014.
- Charlesworth, B. (1996): The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Curr Biol* 6: 149 – 162.
- Charlesworth, B., Charlesworth, D. (2000): The degeneration of Y chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 355: 1563–1572.
- Jablonka, E., Lamb, M.J. (1988): Meiotic pairing constraints and the activity of sex chromosomes. *Journal of Theoretical Biology* 133: 23-36.
- Jaffe, K. (2004): Sex promotes gamete selection: A quantitative comparative study of features favoring the evolution of sex. *Complexity* 9: 43-51.
- Jha, A.N., Dominiquez, I., Balajee, A.S., Hutchinson, T.H., Dixon, D.R., Natarajan, A.T. (1995): Localization of a vertebrate telomeric sequence in the chromosomes of two marine worms. (phylum Annelida, class Polychaeta). *Chromosome Res* 3: 507 – 508.
- Kahn J., Quart, J. (1964): Cytotaxonomy of ticks. *J.micr. Sci.* 105:123-137.
- Kasturi Bai, A.R. & Parthasarathy, M.D. (1957): The chromosomes of *Thelyphonus indicus* Stoliczka. – *Proc. Ind. Aca. Sci. - Section B* 24 (1):19-22.
- Kilburn, A.E. , Shea, M.J., Sargent, R.G., Wilson, J.H. (2001): Insertion of a telomere repeat sequence into a mammalian gene causes chromosome instability, *Mol. Cell Biol.* 21:126–135.
- Kiss, T. (2002): Small nucleolar RNAs: An abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* 109:145–148.

Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Paabo, S., Villablanca, F. X., Wilson, A. C. (1989): Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:6196-6200.

Korek, G. Martin, H., Wenzelides, K. (1991): A modified method for the detection of nucleolar organizer regions (AgNORs). Acta Histochemica 90: 155-157.

Král, J. (2007): Evolution of multiple sex chromosomes in the spider genus *Malthonica* (Araneae: Agelenidae) indicates unique structure of the spider sex chromosome systems. Chromosome Research 15: 863–879.

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

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

Král J., Kořínková T., Forman M., Krkavcová L. (2011): Insights into the meiotic behavior and evolution of multiple sex chromosome systems in spiders. Cytogenet. Genome Res. 133 (1): 43-66.

Král, J., Kořínková, T., Krkavcová, L., Musilová, J., Forman, M., Ávila, I., Haddad, C.R., Vítková, M., Henriques, S., Palacios, J., Hedin, M. (2013): Evolution of karyotype, sex chromosomes, and meiosis in mygalomorph spiders (Araneae: Mygalomorphae). Biological Journal of the Linnean Society 109: 377-408.

Kubai, D.F., Wise, D. (1981): Nonrandom chromosome segregation in *Neocurtilla* (*Gryllotalpa*) *hexadactyla*: An ultrastructural study. Journal of Cell Biology 88: 281-293.

Koch, A.M., Reynolds, F., Kircher, M.F., Merkle, H.P., Weidleder, R., Josephson, L. (2003): Uptake and metabolism of dual fluorochrome tat-nanoparticle in HeLa cells. Bioconjugate Chemistry 14: 1115-1121.

Larson, A., Wilson, A.C. (1989): Patterns of ribosomal RNA evolution in salamanders. Mol. Biol. Evol., 6:131-154.

Lin, K.W., Yan, J. (2005): The telomere length dynamic and methods of its assessment. Journal of Cellular and Molecular Medicine 9: 977-989.

Lin, K.W., Yan, J. (2008): Endings in the middle: Current knowledge of interstitial telomeric sequences. Mutation Research 658: 95-110.

Lebovsky, R., Bensimon, A. (2005): DNA replication origin plasticity and perturbed fork progression in human inverted repeats. Mol. Cell. Biol. 25: 6789 – 6797.

Levan A.K., Fredga K., Sandberg A.A. (1964): Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas 52:201–220.

Lokwood, A.M.P. (1961): „Ringer“ solutions and some notes on the physiological basis their ionic composition. Comp. Biochem. Physiol. 2: 241 – 289.

- Long, E.O., DAWID, I.B. (1980): Repeated genes in eukaryotes. *Annual review of biochemistry* 49: 727 – 764.
- McClintock, B. (1934): The relationship of particular chromosomal element to the development of the nucleoli in *Zea Mays*. *Zeitschr. Zellf. Mikr. Anat* 21: 294-328.
- Mclemore, D.D., Lord, B.A. (1991): Argyrophilic nucleolar organizer regions - an improved technique for visualization. *Journal of histotechnology* 14: 187-189.
- Mallatt, J., Craig, C.W., Yoder, M.J. (2010): Nearly complete rRNA genes assembled from across the metazoan animals: Effects of more taxa, a structure-based alignment, and paired-sites evolutionary models on phylogeny reconstruction. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 1-17.
- Nazar, R. N., Sitz, T. O., Busch, H. (1976): Sequence homologies in mammalian 5.8S ribo-somal RNA. *Biochemistry*, 15:505-508.
- Nickicicz, Norback (1991): AgNOR staining in normal bone-marrow cells. *Journal of Clinical Pathology* 44: 526-562.
- Norton, R.A., Kethley, J.B., Johnston, D.E. & O'Connor, B.M.(1993): Phylogenetic perspectives on genetic systems and reproductive modes of mites. In: Wrensch D, Ebbert M (eds.) *Evolution and Diversity of Sex Ratio in Insects and Mites*. Chapman & Hall, London.
- Oliver, J.H. (1977): Cytogenetics of mites and ticks. *Ann. Rev. Ent.* 22: 407 – 429.
- Olson, M. O., and Dunder, M. (2005): The moving parts of the nucleolus. *Histochem. Cell Biol.* 12:, 203–216.
- Olson, M. O., Hingorani, K., and Szebeni, A. (2002): Conventional and nonconventional roles of the nucleolus. *Int. Rev. Cytol.* 219: 199–266.
- Patau K. (1948): X-segregation and heterochromasy in the spider *Aranea reaumuri*. *Heredity* 2: 77-100.
- Pederson, T. (1998): The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res.* 26: 3871 – 3876.
- Pellestor, F. and Paulasová, P. (2004): Peptids nucleic acid (PNAs): Introduction to a new class of probes for chromosomal investigation. *Chromosoma*, 112: 375 – 380.
- Petrunkovitch, A. (1955): Arachnida. In Moore, R.C. (Ed.), *Treatise on invertebrate Paleontology*. University of Kansas Press, Lawrence, Kansas.
- Platnick, N.I. (2013): The world spider catalogue, version 14.0. American Museum of Natural History. Přístupno na <http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/>
- Postiglioni, A., Brum-Zorilla, N. (1981): Karyological studies on Uruguayan spiders. II. Sex chromosomes in spiders of the genus *Lycosa* (Araneae: Lycosidae). *Genetica* 56: 47 – 53.
- Rice, W.R. (1996): Evolution of the Y sex chromosome in animals. *Bioscience* 46: 331-343.

Rivero, M.T., Mosquera, A., Goyanes, V. , Slijepcevic, P., Fernandez, , J.L. (2004): Differences in repair profiles of interstitial telomeric sites between normal and DNA double-strand break repair deficient Chinese hamster cells, *Exp. Cell Res.* 295 161–172.

Rodríguez-Gil, S.G. (2007): Cytogenetics in three species of *Polybetes* Simon 1897 from Argentina (Araneae, Sparassidae) I. Karyotype and chromosome banding pattern. *J. Arachnol.* 35: 227 – 237.

Ruiz-Herrera, A., Nergadze, S.G., Santagostino, M., Guilotto, E. (2008): Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenetic and Genome Research* 122: 219-228.

Řezáč, M., Král, J., Musilová, J., Pekár, S. (2006): Unusual karyotype diversity in the European spiders of the genus *Atypus* (Araneae: Atypidae). *Hereditas* 143: 123 – 129.

Sahara, K., Marec, F., Traut, W. (1999): TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome research* 7: 449 - 460.

Saldanha, S.N. , Andrews, L.G. , Tollefsbol, T.O. (2003): Assessment of telomere length and factors that contribute to its stability, *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 389–403.

Satya-Prakash, K. L., and Pathak, S. (1984): Silver staining pattern of male meiosis in the house cricket. *J Hered.* 75: 319–320.

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.

Sember, A. (2010): Analýza karyotypu u vybraných bičovců řádů Amblypygi a Uropygi. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha.

Shear, W.A., Selden, P.A., Rolfe, W.D.I., Bonamo, P.M., Grierson, J.D. (1987): New terrestrial arachnids from the Devonian of Gilboa, New York (Arachnida, Trigonotarbita). *Am. Mus. Novit.* 2901: 1–74.

Shultz, J.W. (1989) Morphology of locomotor appendages in Arachnida: evolutionary trends and phylogenetic implications. *Zool. J. Linn. Soc. (Lond.)*, 97: 1–56.

Shultz, J.W. (1990): Evolutionary morphology and phylogeny of Arachnida. *Cladistics* 6: 1 – 38.

Shultz, J.W. (2007): A phylogenetic analysis of the arachnid orders based on morphological characters. *Zool. J. Linn. Soc. (Lond.)*, 150: 221–265.

Schneider, M.C., Zacaro, A.A., Oliveira, R.M., Gnaspini, P., Cella, D.M. (2008): Conventional and ultrastructural analyses of the chromosomes of *Discocyrtus pectinifemur* (Opiliones, Laniatores, Gonyleptidae). *J Zool Syst Evol Res* 47: 203–207.

Schneider, M.C., Zacaro, A.A., Pinto-Da-Rocha, R., Candido, D.M., Cella, D.M. (2009): A comparative cytogenetic analysis of 2 Bothriuidae species and overview of the chromosome data of scorpiones. *Journal of Heredity* 100: 546-555.

Schneider, M.C., Cella, D.M. (2010): Karyotype Conservation in 2 Populations of the Parthenogenetic Scorpion *Tityus serrulatus* (Buthidae): rDNA and Its Associated Heterochromatin Are Concentrated on Only One Chromosome. *Journal of Heredity* 101: 491-496.

Schwander, T., Beukeboom, L.W. (2011): Non-random autosome segregation: A stepping stone for the evolution of sex chromosome complexes?: Sex-biased transmission of autosomes could facilitate the spread of antagonistic alleles, and generate sex-chromosome systems with multiple X or Y chromosomes. *BioEssays* 33: 111-114.

Schwarzacher, H.G., Wachtler, F. (1983): Nucleolus organizer and nucleoli. *Human genetics* 63: 89-99

Simon, C., Franke, A., Martin, A. (1991): The polymerase chain reaction: DNA extraction and amplification. In G. M. Hewitt, A. W. B. Johnston, and J. P. W. Young (eds.), *Molecular Techniques in Taxonomy*, pp. 329-355.

Slijepcevic, P., Xiao, Y., Dominguez, I., Natarajan, A.T. (1996): Spontaneous and radiation-induced chromosomal breakage at interstitial telomeric sites, *Chromosoma* 104:596–604.

Sommerville, J., Brumwell, C. L., Politz, J. C., and Pederson, T. (2005): Signal recognition particle assembly in relation to the function of amplified nucleoli of *Xenopus* oocytes. *J. Cell Sci.* 118: 1299–1307.

Steele, K. P., Holsinger, K. E., Jansen, R. K., Taylor, D. W. (1991): Assessing the reliability of 5S rRNA sequence data for phylogenetic analysis in green plants. *Mol. Biol. Evol.*, 8: 240-248.

Steinemann, S., Steinemann, M. (2005): Retroelements: Tools for sex chromosome evolution. *Cytogenetic and Genome Research* 110 :134-143.

Sturm, H. (1958): Indirekte Spermatophorenübertragung bei dem Geißelskorpion *Trithyreus sturmi* Kraus (Schizomidae, Pedipalpi). *Naturwissenschaften* 45: 142-143.

Sumner, A.T. (1990): *Chromosome banding*. Unwin hyman, London.

Sumner, A.T. (2003): *Chromosomes: organization and function*. Blackwell Science, Oxford

Suzuki, S. (1954): Cytological studies in spiders III. Studies on the chromosomes of fifty-seven species of spiders belonging to seventeen families, with general considerations on chromosomal evolution. *J. Sci. Hiroshima Univ.* 15: 23 – 136.

Šťáhlavský, F., Král, J., Harvey, M.S. & Haddad, C.R. (2006): A karyotype study on the pseudoscorpion families Geogarypidae, Garypinidae and Olpiidae (Arachnida: Pseudoscorpiones). *Eur. J. Entomol.* 103: 277-289

Thiry, M., Lafontaine, D.L. (2005): Birth of nucleolus: The evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol.* 15: 194-199.

Traut, W. (1976): Pachytene mapping in the female silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera). *Chromosoma* 108: 173 – 180.

Traut, W., Sahara, K., Otto, T.D., Marec, F. (1999): Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma* 108: 173-180.

Traut W., Eickhoff, U., Schorch J.C. (2001): Identification and analysis of sex

chromosomes by comparative genomic hybridization (CGH). *Methods Cell Sci.* 23: 155–161.

Tremousaygue, D. Manevski, A. Bardet, C. Lescure, N., Lescure, B. (1999): Plant interstitial telomere motifs participate in the control of gene expression in root meristems, *Plant J.* 20: 553–561.

Troiano G. (1990): Karyotype and male meiosis of four species of *Roncus* (Pseudoscorpionida: Neobisiidae). *Boll. Zool.* 57: 1 – 9.

Tschochner, H., and Hurt, E. (2003): Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol.* 13: 255–263.

Tsuda, Y., Nishida-Umehara, Ch., Ishijima, J., Yamada, K., Matsuda, Y. (2007): Comparison of the Z and W sex chromosomal architectures in elegant crested tinamou (*Eudromia elegans*) and ostrich (*Struthio camelus*) and the process of sex chromosome differentiation in palaeognathous birds. *Chromosoma* 116: 159-173.

Tsurusaki, N. (2007): Cytogenetics. In: Pinto-da-Rocha, R., Machado, G. & Giribet, G. (eds.): Harvestmen – the biology of Opiliones, Harvard University Press, Cambridge, USA.

Tsurusaki, N., Cokendolpher, J.C. (1990): Chromosomes of sixteen species of harvestmen (Arachnida, Opiliones, Caddidae and Phalangiidae). *J. Arachnol.* 18: 151 – 166.

Tucker, S. Vitins, A., Pikaard, C.S. (2010): Nucleolar dominance and ribosomal RNA gene silencing. *Current opinion in cell biology* 22: 351-356.

Uchida, W., Matsunaga, S., Sugiyama, R., Kawano, S. (2002): Interstitial telomere-like repeats in the *Arabidopsis thaliana* genome, *Genes Genet. Syst.* 77:63–67.

Vítková, M., Král, J., Traut, W., Zrzavý, J., Marec, F. (2005): The evolutionary origin of insect telomeric repeats, (TTAGG)_n. *Chromosome Res.* 13:145–156.

Wachtler, F. & Stahl, A. (1993): The nucleolus: a structural and functional interpretation. *Micron* 24: 473 – 505.

Wang, Y.P., Guo, X.M. (2001): Chromosomal mapping of the vertebrate telomeric sequence (TTAGGG)_n in four bivalve molluscs by fluorescence in situ hybridization. *J shellfish Res.* 20: 11 87 – 1190.

Weygoldt, P., Paulus, H.F. (1979): Studies on the morphology, taxonomy and phylogeny of the Chelicerata. 2. Cladograms and development of Chelicerata. *Z. Zool. Syst. Evolutionsforsch.* 17: 177–200.

Weygoldt, P. (2000): Whip Spiders (Chelicerata: Amblypygi): Their biology, morphology, and systematics. Apollo Books, Stenstrup, Denmark.

White, M.J.D. (1940): The origin and evolution of multiple sexchromosome mechanisms. *J Genet* 40: 303Y336.

White, M.J.D. (1973): *Animal cytology and evolution*, 3rd edition. Cambridge University Press, Cambridge.

Yan, J., Chen, B.Z., Bouchard, E.F., Drouin, R. (2004): The labeling efficiency of human telomeres is increased by double-strand PRINS. *Chromosoma* 113: 204-209.

Yan, J., Bouchard, E.F., Samassekou, O. Chen, B.Z. (2007): Identification of a human chromosome-specific interstitial telomere-like sequence (ITS) at 22q11.2 using double-strand PRINS. *Cytogenetic and Genome Research* 116: 29-37.