



Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie



**Tomáš Novotný**

Karyotypová diferenciacie štírů rodu *Euscorpis* (Scorpiones:  
Euscorpiidae) v Evropě

Karyotype differentiation of *Euscorpis* scorpions (Scorpiones:  
Euscorpiidae) in Europe

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce: RNDr. František Štáhlavský, Ph.D.

Praha 2012

Rád bych poděkoval svému školiteli RNDr. Františku Šťáhlavskému, Ph.D. za pomoc a ochotu při psaní této diplomové práce. Věnoval mi svůj čas a poskytl své rady, připomínky a literaturu ke vzniku této práce. Zároveň bych chtěl poděkovat prof. Victoru Fetovi (Marshall University, USA) a Františku Kovaříkovi (Praha), kteří mi byli oba velice nápomocni při různých aspektech tvorby mé práce. Závěrem bych rád vyjádřil vděčnost mé matce, která mě při studiu štědře podporovala.

#### Prohlášení o původnosti práce

Prohlašuji, že jsem předkládanou diplomovou práci na téma „Karyotypová diferenciacce štírů rodu *Euscorpius* (Scorpiones: Euscorpiidae) v Evropě“ vypracoval samostatně s použitím citované literatury.

V Praze 25. 8. 2012

Podpis: .....

Tomáš Novotný

## Abstrakt:

Předkládaná práce si dává za cíl předložit charakteristiku karyotypů štírů z rodu *Euscorpium*. Rod *Euscorpium* je typickým zástupcem štírů v Evropě. Jeho výskyt je široký téměř po celé jižní Evropě. Do dnešní doby se uvádí 18 druhů tohoto rodu. V této práci bylo karyologicky analyzováno šest druhů a u jednoho byl stanoven pouze základní diploidní počet chromozomů: *E. carpathicus* -  $2n=90$ , *E. concinnus* -  $2n=88$ , *E. hadzii* -  $2n=68$ , *E. sicanus* -  $2n=66$ , *E. tergestinus* -  $2n=60$ , *E. naupliensis* -  $2n=60$ , *E. italicus* -  $2n=36$ . Popis karyotypů odhalil u všech studovaných druhů achiasmatickou meiozu a nebyly pozorovány žádné pohlavní chromozomy. Byly nastíněny základní fylogenetické vztahy a hypotézy karyotypové evoluce rodu *Euscorpium*. Byla zjištěná vysoká mezidruhovú variabilita v počtu chromozomů a pomocí analýzy genu pro 16S rRNA potvrzeno taxonomické zařazení jednotlivých druhů. Zdá se tedy, že cytogenetické metody mohou přispět k pochopení druhové diverzity a rozlišení případných kryptických druhů v rámci rodu *Euscorpium*.

Klíčová slova: *Euscorpium*, Euscorpidae, cytogenetika, evoluce, karyotyp, 16S rRNA

## **Abstract:**

The aim of presented work is to provide characteristics of the karyotypes of scorpions of the genus *Euscorpis*. Genus *Euscorpis* is a typical representative of scorpions in Europe. Its occurrence is wide throughout Europe. Until now, 18 species of this genus have been described. In this work six species were karyologically analyzed and one species was shown to possess only basic diploid number of chromosomes: *E. carpathicus* -  $2n=90$ , *E. concinnus* -  $2n=88$ , *E. hadzii* -  $2n=68$ , *E. sicanus* -  $2n=66$ , *E. tergestinus* -  $2n=60$ , *E. naupliensis* -  $2n=60$ , *E. italicus* -  $2n=36$ . Description of the karyotypes revealed that all species studied exhibit achiasmatic meiosis; no presence of sex chromosomes was detected. The basic hypothesis of phylogenetic relationships and karyotype evolution of the genus *Euscorpis* was outlined. High interspecies variability in chromosome total count was found and by analysis of the 16S rRNA gene the taxonomic status of the species was confirmed. Hence, it seems that cytogenetic methods can contribute to the understanding of species diversity and differentiation of possible cryptic species within the genus *Euscorpis*.

Key words: *Euscorpis*, Euscorpidae, cytogenetics, evolution, karyotype, 16S rRNA

## Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Fylogenetické postavení štírů (Scorpiones).....	3
2	Štíři (Scorpiones).....	6
2.1	Diverzita štírů.....	7
2.2	Vliv zalednění.....	8
3	Využití molekulárních a cytogenetických technik ve výzkumu štírů (Scorpiones).....	9
3.1	Cytogenetika štírů.....	9
4	Cytogenetika dalších skupin pavoukoců.....	13
4.1	Cytogenetika pavouků (Araneae).....	13
4.2	Cytogenetika sekáčů (Opiliones).....	14
4.3	Cytogenetika štírků (Pseudoscorpiones).....	15
5	Rod <i>Euscorpius</i> .....	16
5.1	<i>Euscorpius carpathicus</i> (Linné, 1767).....	19
5.2	<i>Euscorpius sicanus</i> (C. L. Koch, 1837).....	19
5.3	<i>Euscorpius tergestinus</i> (C. L. Koch, 1837).....	19
5.4	<i>Euscorpius hadzii</i> Caporiacco, 1950.....	20
5.5	<i>Euscorpius concinnus</i> (C. L. Koch, 1837).....	20
5.6	<i>Euscorpius italicus</i> (Herbst, 1800).....	21
5.7	<i>Euscorpius naupliensis</i> (C. L. Koch, 1837).....	21
6	Cíle diplomové práce.....	22
7	Materiály a metodika.....	23
7.1	Preparace chromozomů.....	23
7.2	Analýza karyotypu.....	24
7.3	Extrakce DNA.....	25
7.4	PCR (polymerase chain reaction).....	25
8	Výsledky.....	27
8.1	<i>Euscorpius sicanus</i> (C. L. Koch, 1837).....	27
8.2	<i>Euscorpius hadzii</i> , Caporiacco, 1950.....	29
8.3	<i>Euscorpius concinnus</i> (C. L. Koch, 1837).....	31
8.4	<i>Euscorpius carpathicus</i> (Linné, 1767).....	32
8.5	<i>Euscorpius italicus</i> (Herbst, 1800).....	34
8.6	<i>Euscorpius naupliensis</i> (C. L. Koch, 1837).....	36
8.7	<i>Euscorpius tergestinus</i> (C. L. Koch, 1837).....	37
9	Diskuse.....	39
10	Závěr.....	45
11	Literatura.....	46
12	Přílohy.....	54

# 1 Úvod

Třída pavoukovci (Arachnida) je starobylá skupina v rámci kmene členovců (Arthropoda). Tato třída dále spadá do podkmenu klepítkatci (Chelicerata), který zároveň zahrnuje ostrorepy (Xiphosura), vyhynulé skupiny Eurypterida, Chasmataspidida a kontroverzní skupinu nohatky (Pycnogonida). Již ve středním devonu byla diferencována většina recentních řádů pavoukovců (Selden et al. 1991). Pavoukovci a jejich příbuzní jsou druhou nejdiverzifikovanější skupinou členovců hned po skupině šestinohých (Hexapoda). V rámci této třídy rozlišujeme jedenáct recentních řádů: pavouci (Araneae), roztoči (Acari), sekáči (Opiliones), štíři (Scorpiones), štírci (Pseudoscorpiones), solifugy (Solifugae), krabovci (Amblypygi), bičovci (Thelyphonida), krátkochvosti (Schizomida), štírenky (Palpigrady) a roztočovci (Ricinulei) (Shultz 2007). Tyto recentní řády se dají dle své základní morfologie rozdělit na dvě hlavní skupiny. Pavouci, solifugy, štírenky, krabovci, bičovci a krátkochvosti mají ztuhlou zúžení mezi hlavohrudí (prosoma) a zadečkem (opistosoma). Naproti tomu štíři, štírci, roztoči a roztočovci toto zúžení postrádají a abdomen se napojuje na hlavohruď téměř celou svou šířkou. Je možné pavoukovce rozlišovat podle přítomnosti segmentace na abdomenu. Pavouci a klíšata nemají viditelnou segmentaci zadečku a jsou označováni jako hologastrické skupiny. Naopak ostatní řády včetně štírů mají segmentaci, tudíž se nazývají jako skupiny arthrogastrické (Stockmann a Ythier 2010).

Většina klepítkatců se živí predací na jiných členovcích nebo menších obratlovcích. Tento stav neplatí v každém případě. Například roztoči vykazují širší ekologické spektrum zahrnující ektoparazitismus, detritovorii nebo specializaci na rostliny jako potravu. Pro pavoukovce není vodní prostředí příliš vyhledávaným. Ve vodě žije několik druhů vodních pavouků [např. *Argyroneta aquatica* (Clerck, 1757)] a skupina roztočů Hydracarina, u kterých se předpokládá návrat do vodního prostředí sekundárně (Dunlop 2010). Taktéž bazální linie pavoukovců a jejich předci obývali vodní prostředí (Kraus 1976). Přejít pavoukovců na souš se zdá být klíčovým aspektem jejich evoluce a jako příklad mohou sloužit vodní předchůdci recentních štírů (Jeram 1998).

Třída Arachnida má více než 100 000 druhů a toto číslo každým rokem stoupá (Dunlop 2010). Pavoukovci (2000 ověřených vyhynulých druhů klepítkatců a přibližně 1600 z nich jsou pavoukovci) jsou zahrnuti spolu se skupinami Xiphosura a Eurypterida v jedné linii, která se nazývá Euchelicerata (Dunlop et al. 2008; Weygoldt a Paulus 1979). Tato linie se zdá být jednou z nejstabilnějších ve fylogenezi členovců. Recentní poznatky podporují pavoukovce jako monofylum a rozlišují uvnitř skupiny čtyři hlavní skupiny - Stomothecata, Haplocnemata, Acaromorpha a Pantetrapulmonata (Schultz 2007). Skupina Stomothecata (druhy ze Siluru až recentní druhy) byla zavedena Shultzem (2007) a zahrnuje štíry a sekáče. Shultz tento klád definoval na základě přítomnosti stomotéky - příústní dutiny utvořené z kyčelních apofýz vyčnívajících z bazálních článků makadel (pedipalpy) a první kráčivé končetiny a také na základě podobností svaloviny ústních ústrojí. Někteří autoři s ustanovením této skupiny nesouhlasili (Weygoldt 1998). Jedná se o to, že mnoho vyhynulých klepítkatců může být přiřazeno do již existující vrcholné skupiny nebo jasně definovaného vyhynulého (paleozoického) řádu. Existují ovšem i výjimky. Mezi skupinami jako jsou nohatky (Pycnogonida), ostrorepi (Xiphosura), štíři (Scorpiones) a bičovci (Thelyphonida), jsou některé velmi staré fosílie, zdatelně odlišné od nynějších druhů. Například na koxo-sternální oblasti paleozoických štírů není důkaz existence kyčelních (koxa) hypofýz (Dunlop et al. 2008, Dunlop 2010). Shulz (2007) spekuluje, že původní štíři měli stomotéku ve formě jemných kutikulárních proužků na jejich koxách a tyto struktury se jednoduše nezachovaly.

Tradičně byla skupina Euchelicerata rozdělována na větší skupinu terestrických pavoukovců a vodní Merostomata. Kraus (1976) tento přístup kritizoval kvůli její spíše ekologické než fylogenetické podstatě. Skupina Metastomata byla představena v roce 1979 jako alternativa k stávající situaci a Metastomata zahrnovala Eurypterida a Arachnida. Na základě této hypotézy vznikla diskutabilní homologie mezi metastomou u skupiny Eurypterida a sternem pavoukovců (Weygoldt a Paulus 1979).

Shultz (1990) a Giribet et al. (2002) také navrhli, že by měla Eurypterida a Arachnida být ve stejné linii, ale název Metastomata se neustálil v literatuře. V poslední analýze Shultz (2007) neustálil žádné východisko pro vztahy mezi Xiphosura, Eurypterida a Arachnida, tudíž je třeba tyto bazální linie více prozkoumat.

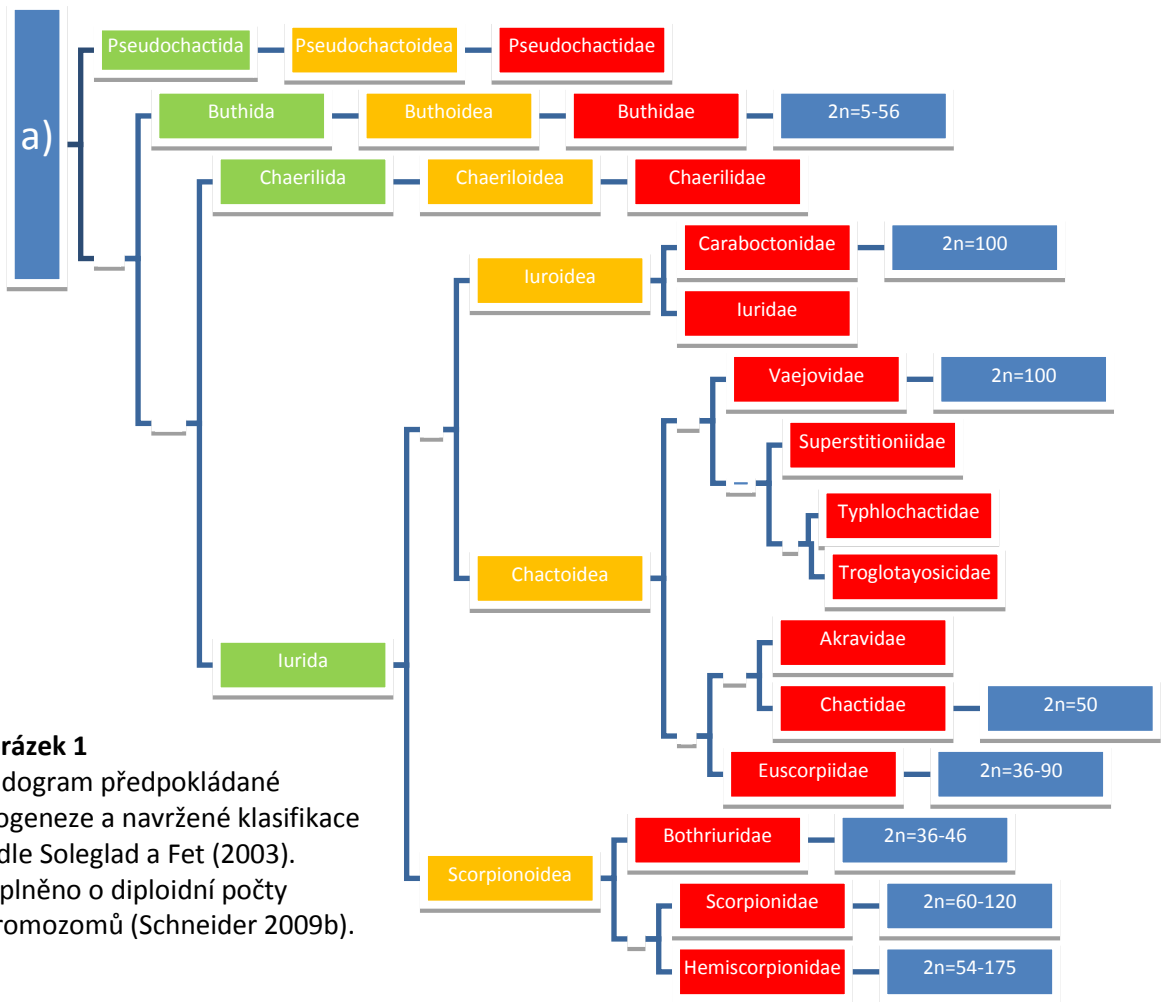
V poslední době se vlivem molekulárně fylogenetických analýz mění pohled na celkovou diverzitu pavoukoců a i štírů. U některých skupin se k odhalení možných kryptických druhů (například štírci) podařilo využít i cytogenetická data (Zaragoza a Šťáhlavský 2008), což ale zatím nebylo u štírů využito. Z tohoto důvodu se předkládaná práce snaží odhalit možnost využití karyologie v taxonomii evropských štírů rodu *Euscorpius*.

## 1.1 Fylogenetické postavení štírů (Scorpiones)

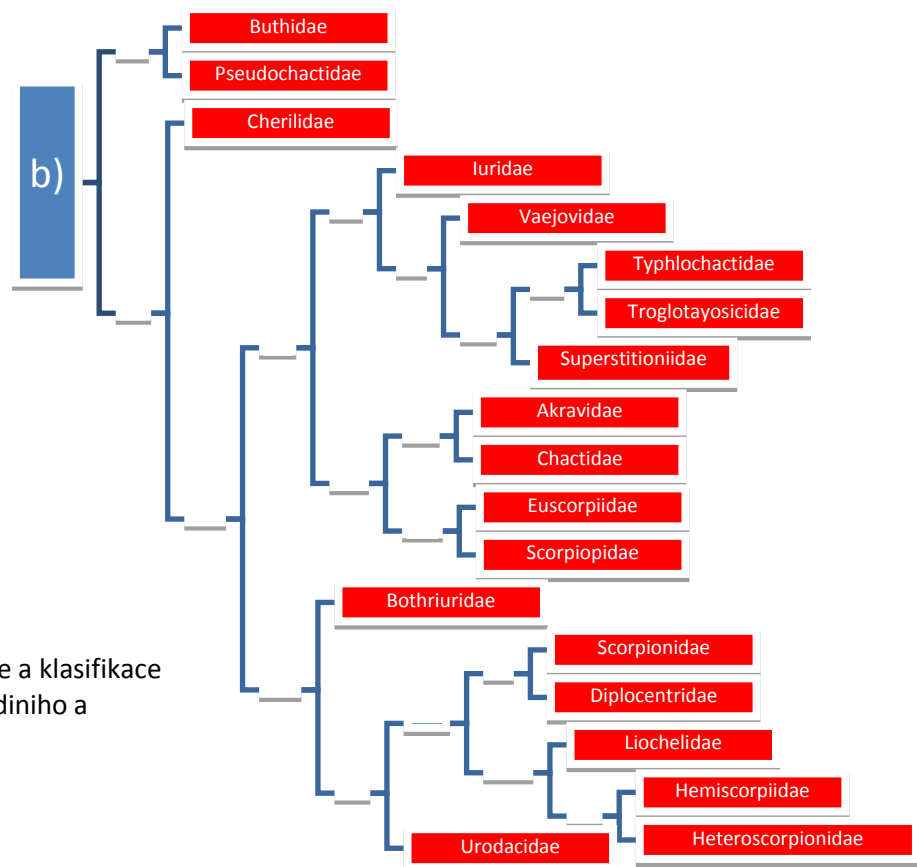
Během posledních dvaceti let se studium fylogeneze a klasifikace štírů začalo měnit. Stalo se tak díky kladistickým analýzám a případnému využití molekulárních znaků. Hlavními znaky, které byly při výzkumu fylogeneze použity, jsou ty anatomické a morfologické. Tyto charakteristiky byly logicky první, které se používaly k rozluštění klasifikace a fylogeneze. Během posledních třinácti let následovalo zapojení i molekulárních fylogenetických analýz, resp. analýz genu pro 16S rRNA (např. Gantenbein et al. 1999) a cytochrom oxidázy I (např. Parmakelis et al. 2006). Také cytogenetika by mohla být alespoň v některých případech vhodným doplňujícím oborem k upřesnění a potvrzení již známých výsledků, což se bohužel děje zatím spíše jen ojediněle. Takový stav je pravděpodobně dán zejména faktem, že detailních cytogenetických analýz je u pavoukoců bohužel zatím poměrně málo, navzdory faktu, že v poslední době některé skupiny pavoukoců doznávají pokroku v počtu publikovaných cytogenetických studií. Jsou to zejména pavouci (Araujo et al. 2012), některé čeledi akariformních a parasitiformních roztočů (Oliver 1977; Norton et al. 1993), dále štíři (Shanahan 1989a, Shanahan 1989b), štírci (Šťáhlavský et al. 2006) a sekáči (Tsurusaki 2007). Karyotypy ostatních čeledí jsou buď neznámé, nebo neúplné.

Co se týká fylogeneze a vyšší klasifikace štírů, tak existují v současné chvíli dva názory odrážející existenci dvou vědeckých týmů. Jeden kolem prof. Feta a druhý vedený prof. Prendinim a Wheelerem. Fet se svým týmem provedl analýzu morfologie genu pro 16S a 18S rRNA s výsledkem rozdělení štírů na 15 samostatných čeledí. Jasně vyjádřil nejistotu nad postavením některých skupin (Chaerilidae a Pseudochactidae) a taktéž

podotkl, že nedostatek dat znemožňuje potvrdit vztahy mezi Euscorpiidae, Chactidae, Vaejovidae, Superstitionidae a Troglotayoscidae (Soleglad a Fet 2003). Prendini a Wheeler (2005) nesouhlasili s většinou výsledků a navrhaných změn. Krátce poté byl nicméně publikován další článek, a to skupinou prof. Feta, kde si za svými výsledky stojí a obhajuje je (Fet a Soleglad 2005). Tímto vznikly dvě skupiny, které se liší svým názorem na fylogenezi a systematiku skupiny štírů. K nejzásadnějším rozdílům mezi navrhanými systémy patří: A) navrhaných 15 (Soleglad a Fet 2003) (Obr. 1) nebo 19 (Prendini a Wheeler 2005) (Obr. 2) čeledí. B) Prendini a Wheeler (2005) považují za bazální skupiny Buthidae a Pseudochactidae, které jsou sesterské k ostatním skupinám štírů, oproti tomu Soleglad a Fet (2003) považují za bazální pouze Pseudochactidae. C) Dále, Prendini a Wheeler (2005) označují skupiny Diplocentrinae a Urodacinae jako čeledi, naopak Fet a Soleglad je řadí jako podčeledi v rámci Scorpionidae. D) Soleglad a Fet (2003) rozeznávají čeledi Scorpionidaea Hemiscorpidae jako sesterské v rámci Scorpinoidea a Prendini a Wheeler (2005) určuje vyšší počet čeledí v rámci této skupiny. E) Prendini a Wheeler (2005) uznávají jedinou čeleď Luridae a v jejím rámci určují podčeleď Caraboctoninae, avšak Soleglad a Fet (2003) zahrnují pod Iuroidea dvě čeledi a to Luridae a Caraboctonidae. V této práci je použita klasifikace podle Soleglada a Feta (2003) (Obr. 1).



**Obrázek 1**  
 Kladogram předpokládané fylogeneze a navržené klasifikace podle Soleglad a Fet (2003). Doplněno o diploidní počty chromozomů (Schneider 2009b).



**Obrázek 2**  
 Kladogram fylogeneze a klasifikace navržený podle Prendiniho a Wheelera (2005).

## 2 Štíři (Scorpiones)

Štíři (Scorpiones) aktuálně čítají 1981 druhů a 192 rodů (Rein 2012). Jednoznačně nejstarší skupinou v rámci třídy pavoukovců jsou štíři - 430 mil. let (Dunlop et al. 2008). Někteří autoři štíry označují jako bazální skupinu pavoukovců (Weygoldt a Paulus 1979), jiní se nicméně přiklánějí k hypotéze, že štíři jsou více odvozená skupina (Shultz 1990, 2007; Giribet et al. 2002).

Tělesná stavba štírů je víceméně neměnná po celou dobu jejich existence na Zemi. Některé vyhynulé druhy byly vodní a na spodní straně těla se nalézaly žábry (Dunlop 2008). Díky tomu lze usuzovat, že se takový tělesný plán osvědčil a kromě přechodu na souš se jedná o jednu z nejperzistentnějších živočichů. Tělo je členěno na hlavohruď (prosoma) a zadeček (opistosoma). Opistosoma se dále typicky dělí u štírů na mesosoma a metasoma. Dalším charakteristickým znakem štíra je telson, který se nachází na konci metasomy, za análním otvorem. Na hrotu telsonu ústí jedová žláza. Na ventrální straně se nachází pro štíry charakteristický hřebínek (pecten), který má smyslovou funkci. Na dorsální straně hlavohruďi nalezneme jeden pár hlavních očí a několik párů (až 5) očí postranních. Přední část hlavohruďi nese chelicery, které jsou tříčlánkové. Druhý pár končetin je přeměněn na pedipalpy s klepety. Celá prosoma (hlavohruď) je kryta velkým kusem karapaxu. Dále na této části těla najdeme 4 páry kráčivých končetin. Velká část těla je pokryta chlupy a setami, z nichž jsou z hlediska klasifikace nejdůležitější trichobothrie (Polis 1990; Dunlop et al. 2008).

Trichobothrie je senzorický orgán. Je častým determinačním znakem například u pavouků a štírů. Právě u štírů se pomocí trichobothriotaxie dosáhlo mimo jiné pokroku v určování kryptických druhů u rodu *Euscorpius* (Fet a Soleglad 2002). Struktura tohoto senzorického orgánu byla detailně zkoumána u dvou druhů štírů (*Buthus occitanus*, Amoureux, 1789 a *Euscorpius carpathicus*, Linné, 1767) a bylo zjištěno, že její mikrostruktura odpovídá sensorickým setám jiných pavoukovců (Meßlinger 2004). Z hlediska trichobothrie jsou nejlépe prozkoumané druhy pavoukovců pavouci (Araneae), sekáči (Opiliones), roztoči (Acari) a štíři (Scorpiones).

## 2.1 Diverzita štírů

Štíři jsou skupinou bezobratlých, která je rozšířená celosvětově. Tento stav lze vysvětlit existencí skupiny tak starobylé jako štíři již během formování pevniny v době paleozoika, kdy vznikl kontinent Pangea a dále mesozoika, kdy se utvořila Gondwana. Jde o superkontinent, který držel pohromadě to, co dneska rozlišujeme jako Jižní Ameriku, Afriku, Indii, Austrálii a Antarktidu (Lomolino et al. 2006).

Někteří štíři mají nekontinuální rozšíření a zdá se, že tyto druhy se řadí mezi relikty gondwanského kontinentu. Jako příklad lze uvést skupinu Bothriuridae, do které se řadí rody *Lisposoma* a *Cercophonius*. Většina druhů ze skupiny Bothriuridae se vyskytuje v Americe, ale rod *Lisposoma*, má rozšíření v Africe a rod *Cercophonius* se vyskytuje také v Austrálii (Stockmann a Ythier 2010; Sissom 1990).

Největší diverzitu řádu Scorpiones nacházíme v subtropických oblastech. Konkrétně se jedná o oblast Baja California v Mexiku. Diverzita štírů klesá s rostoucí zeměpisnou šířkou a v oblastech ležících nad 51° N se štíři nevyskytují (Polis 1990). Velmi obecně shrnuto se štíři vyskytují na každém kontinentu vyjma Antarktidy. V pouštních oblastech štíři vykazují vysokou abundanci (Stockmann a Ythier 2010). Poslední poznatky říkají, že v pouštních biomech sice štíři mají vysokou populační hustotu, ale pokud porovnáme pouštní lokality s ostatními biotopy, je druhová diverzita štírů v pouštích nižší než v jiných biotopech (Fet et al. 1998).

Na první pohled se zdá, že štíři jsou skupinou, která se vyskytuje zejména v tropických a subtropických oblastech. To, že jsou adaptováni velmi dobře na život v aridních oblastech je jistě pravda, avšak nejsevernější hranice přirozeného (postglaciálního) rozšíření štírů v Evropě se předpokládá u druhu *Euscorpium germanus* (C. L. Koch, 1837) v Rakousku, konkrétně v Severním Tyrolsku (Gantenbein et al. 2000, Komposch et al. 2001), a u druhu *Mesobuthus eupeus* (C. L. Koch, 1839), (Buthidae) ještě severněji ve východní Evropě (v provincii Saratov) (Davygora a Rusakov 2001). Štíři obývají různé habitaty od již zmiňovaných aridních, přes chladné lokality, tak i obskurní místa jako je například jeskyně. V Evropě je znám jediný druh obývající toto prostředí - *Belisarius*

*xambeui* (Lacroix, 1992) (Fet 2010). Počet druhů štírů v Evropě pravděpodobně přesahuje 35 (Buthidae, 8; Euscorpiidae, 22-24; Chactidae, 1; Iuridae, 3) (Fet 2010).

## 2.2 Vliv zalednění

Během čtvrtohor, zejména posledních 2,4 milionů let, došlo k mnoha událostem, které dozajista ovlivnily zásadním způsobem rozšíření štírů. Jednalo se hlavně o opakující se cykly glaciálních a interglaciálních období. Dalším aspektem ovlivňujícím rozšíření štírů byla tvorba hlavních evropských pohoří (Hájek et al. 2004).

Na tyto podmínky reagovali štíři různým způsobem. Mohlo se jednat o extinkci, případně přežila jenom malá populace v glaciálních refugiích (Hewitt 2000). Příkladem vlivu glaciálních a interglaciálních období může být případ druhu *Euscorpius italicus*. Tento druh se vyskytuje hojně v nepřerušovaném pásmu subtropické Evropy. Rozlišujeme východní a západní populaci. Východní populace je považována za glaciální útočiště (Gantenbein et al. 2002). Možným důkazem pro toto tvrzení je téměř nulová genetická variabilita u jedinců z celé Evropy, což by značilo, že pocházejí z jedné původní populace (Fet et al. 2006). Oblasti takzvaných refugií, útočišť, kam se uchýlovala tehdejší fauna a flóra, jsou v současnosti patrné u daných kontinentů severní Holarktidy jako hotspoty biodiverzity (Lomolino et al. 2006). Tyto takzvané hot spoty jsou místy velké druhové diverzity. V severní Americe je to Mexiko, v Asii Indie a v Evropě se jedná o oblast Mediteránu. Refugia evropských druhů se během kvartéru nacházela na Pyrenejském, Apeninském nebo Balkánském poloostrově. Konkrétně měli štíři z čeledi Buthidae refugia na Pyrenejském poloostrově nebo Balkánském poloostrově a čeleď Euscorpiidae se vyskytovala převážně na Balkáně či Apeninském poloostrově (Hewitt 1996). (Hewitt 1996).

### 3 Využití molekulárních a cytogenetických technik ve výzkumu štírů (Scorpiones)

V poslední době čím dále víc využívají genetické znaky a analýzy molekulární fylogeneze u štírů, které odhalují skrytou diverzitu štírů a navíc mohou pomoci při rekonstrukci fylogenetických vztahů jednotlivých skupin štírů. Například největší evropský štír *Iurus dufourei* (Brullé, 1932) byl nedávno rozlišen na dvě geneticky samostatné linie pomocí analýzy mtDNA. Jedná se o populace na Peloponésu, Kithyře a Krétě v Řecku, která tvoří jednu linii a populaci východoegejskou a maloasijskou (Parmakelis et al. 2006). Zajímavý je kontrast s morfologickou analýzou, která byla provedena následně, aby potvrdila předchozí výsledky. Nejenom, že výsledky byly potvrzeny, ale díky této analýze byly populace dále rozlišeny na západní linii a východní linii - (Rhodos, Karpathos, Samos). Předpokládá se, že populace východní linie tvoří nový zatím nepopsaný druh (Kovařík et al. 2010).

Další příklad užití znalostí molekulární fylogeneze najdeme u druhu evropského štíra *Mesobuthus gibbosus* (Brull, 1822). Gantenbein et al. (2003) díky molekulárnímu výzkumu potvrdil dvě genetické linie - z Balkánu a Malé Asie. Taktéž byl vymezen nový endemický druh *Mesobuthus cyprius* (Gantenbein a Kropf, 2000), dříve spadající do druhu *Mesobuthus gibbosus*. Je jisté, že metody analýzy DNA vnášejí do celé problematiky taxonomie štírů nové poznatky. U tohoto řádu je zatím nicméně v tomto ohledu nejasná možnost využití také metod cytogenetických.

#### 3.1 Cytogenetika štírů

Třída štírů není z cytogenetického hlediska příliš prozkoumána. Cytogenetická analýza byla provedena u 60 druhů štírů (Schneider et al. 2009b). Ačkoliv se jedná o skupinu s mnoha plesiomorfními znaky, je možné, že je skupina důležitá pro pochopení karyotypové diverzifikace celé třídy pavoukovců. Karyotypová analýza štírů odhalila vysokou variabilitu v diploidním počtu chromozomů ( $2n=5$  až  $2n=175$ ) (Obr. 1; Tab. 1). Taková variabilita nebyla dosud zaznamenána u žádného z řádů uvnitř třídy Arachnida.

Navíc štíři vykazují množství cytogenetických zvláštností, jako je vysoká vnitro- a mezidruhová variabilita diploidního počtu chromozomů u některých druhů. Dále byla zjištěna achiasmatická meióza, která se vyskytuje u všech doposud analyzovaných čeledí. U štírů také zatím nebyly identifikované pohlavní chromozomy. U skupiny Urodacidae jsou prokázány centrické fúze, inverze a štěpení chromozomů (Schneider et al. 2009b). Jak bylo již uvedeno, probádanost štírů jako skupiny není ve srovnání s pavouky (Araneae) vysoká. Mimo to, jednotlivé čeledi jsou prozkoumané nerovnoměrně.

Nejvyšší počet cytogeneticky zkoumaných druhů patří do bazální čeledi Buthidae (Tab. 1). Tato čeleď je nejlépe cytogeneticky prozkoumaná z několika pravděpodobných důvodů. Například z důvodu vysoké druhové početnosti a také proto, že druhy této čeledi jsou pro člověka toxicky významné. Charakteristika karyotypu buthidních štírů, bereme-li v potaz, že je jejich karyotyp původní, ukazuje na predominanci nízkého počtu chromozomů (známý diploidní počet je od 5 u *Tityus bahiensis* (Piza 1939) po 48 u *Uroplectes carinatus* (Newlands & Martindale 1980)) a karyotyp sestávající z holocentrických chromozomů (Fet a Soglead 2003; Schneider et al. 2009b). Holocentrické chromozomy se liší od monocentrických absencí primární konstriktce a lokalizovaným místem pro připojení dělicího vřeténka během buněčného dělení. Místo toho jsou mikrotubuly připojeny k většině povrchu chromatid a při pohybu k vřeténku jsou chromozomy nebo chromatidy ve tvaru tyčinky (Dernburg 2001; Nagaki et al. 2005). Zmiňované monocentrické chromozomy vznikly dle hypotézy díky existenci holocentrických chromozomů. Kinetická aktivita tohoto typu je omezena na specializovanou chromozomovou oblast - centromeru (Moore et al. 1997).

Holocentrické chromozomy jsou typické pro velké množství skupin živočichů a rostlin a zdá se, že jejich výskyt v organismu může vyústit v konvergentní evoluci (John 1990; Dernburg 2001). Tyto údaje kontrastují s výsledky získanými od sedmi dalších čeledí řádu štíři. Byly zjištěny vysoké počty chromozomů v diploidním stavu a chromozomy byly také častěji monocentrické (Schneider et al. 2009b). Ostatní studování štíři řádu Scorpiones mají monocentrické chromozomy s výrazně vyšším rozpětím diploidních počtů od 29 až po 175 (Shanahan 1989). Byla popsána vnitrodruhová variabilita, a to jak u druhů s holocentrickými, tak i monocentrickými. Například se jedná o: *Mesobuthus tamulus*

( $2n=20-28$ ), (Venkatanarasimhaiah & Rajasekarasetty 1965), *Urodacus novaehollandiae* ( $2n=66-175$ ) a *Urodacus manicatus* ( $2n=29-64$ ). Shanahan (1989) ve své studii uvažuje také hypotézu o možném dopadu karyotypové variability na izolaci druhů. Nicméně doposud nebyly tyto informace nikdy propojeny s žádnou detailní analýzou morfologické či genetické variability. Z tohoto důvodu zatím máme u štírů jen minimální informace o možném vztahu mezi karyotypovou variabilitou a druhovou diverzitou.

Většina cytogenetických studií zahrnujících štíry je založena na standardním chromozomovém barvení a některé práce navíc využívají analýzu synaptonemálních komplexů při studiu párování chromozomů (Shanahan 1989a, 1989b). Schneider et al. (2009a) také použila transmisní elektronovou mikroskopii (TEM) k pozorování a popisu karyotypů. Dále jsou důležité studie Shanahana a Haymana (1990), kde byly charakterizovány chromozomy některých štírů ze skupin Buthidae a Urodacidae. Analýzou synaptonemálního komplexu (SC) [*Tityus bahiensis* (Perty, 1833)] bylo určeno synaptické chování chromozomů během přestaveb a stanovena kinetická přirozenost chromozomů (holocentrická - Buthidae nebo monocentrická - všechny ostatní dosud karyotypované druhy) (Schneider et al. 2009a, 2009b). Rozdíly mezi holocentrickým a monocentrickým chromozomem bývají běžně definovány nepřímými kritérii, jako například konfigurace chromozomů během jejich segregace a přítomnost primární konstriktce, která je ale špatně determinovatelná u malých chromozomů (Wolf 1996).

Druh	Diploidní počet
<b>BUTHIDA</b>	
<b>Buthoidea</b>	
<b>Buthidae</b>	
<i>Ananteris balzanii</i>	12
<i>Androctonus spp.(5)</i>	24
<i>Buthus spp.(2)</i>	22-56
<i>Centruroides spp.(2)</i>	26
<i>Hemilychas alexandrinus</i>	14
<i>Hottentotta trilineatus</i>	24
<i>Isometroides vescus</i>	14
<i>Isometrus spp.(3)</i>	12-14
<i>Lychas spp.(2)</i>	12-16
<i>Mesobuthus spp.(3)</i>	20-28
<i>Odontobuthus doriae</i>	22
<i>Parabuthus spp.(3)</i>	18-36
<i>Rhopalurus rochai</i>	28
<i>Tityus spp.(7)</i>	5-27
<i>Uroplectes spp.(6)</i>	20-48
<b>IURIDA</b>	
<b>Iuroidea</b>	
<b>Caraboctonidae</b>	
<i>Hadrurus hirsutus</i>	přibližně 100
<b>Scorpionoidea</b>	
<b>Bothriuridae</b>	
<i>Bothriurus spp.(4)</i>	36-46
<b>Scorpionidae</b>	
<i>Heterometrus spp.(5)</i>	60-96
<i>Pandinus imperator</i>	120
<b>Hemiscorpiidae</b>	
<i>Urodacus spp. (6)</i>	56-175
<i>Liocheles australasiae</i>	54-64
<i>Opisthacanthus elatus</i>	60-62
<b>Chactoidea</b>	
<b>Chactidae</b>	
<i>Brotheas amazonicus</i>	50
<b>Euscorpiidae</b>	
<i>Euscorpius spp. (7)</i>	36-90
<b>Vaejovidae</b>	
<i>Paruroctonus boreus</i>	přibližně 100

### Tabulka 1

Přehled karyotypovaných rodů štírů (Scorpiones), upraveno podle Schneider et al. (2009b) a doplněno o vlastní výsledky.

## 4 Cytogenetika dalších skupin pavoukoců

V dalších kapitolách bude uveden stručný popis cytogenetiky významných skupin pavoukoců. Jedná se o skupiny, kde je výzkum karyotypů na vysoké úrovni a potvrzuje se tak, že tento obor dosahuje velkého pokroku a cytogenetické metody mohou být úspěšně využity i v taxonomii různých skupin.

### 4.1 Cytogenetika pavouků (Araneae)

Diploidní počet pavouků je vysoce variabilní v rozmezí od 7 do 114 chromozomů (Suzuki 1954; Král et al. 2011). Řád pavouci můžeme rozdělit na dva podřády: Mesothaeae s pouhou jedinou čeledí Liphistiidae a podřád Opisthothelae. Druhý podřád je rozdělen do dvou infrařádů: Mygalomorphae zahrnující pavouky s paraxiálními chelicerami a Araneomorphae, kteří mají diaxiální chelicery. Infrařád Araneomorphae je rozdělován na skupiny Haplogynae a Entelegynae. Skupina Entelegynae zahrnuje většinu recentních druhů pavouků (Coddington a Levi 1991). První cytogenetická studie pavouků byla provedena již Carnoyem (1885). Pinter a Walter (1971) poprvé použili roztok kolchicinu k preparaci pavoučích varlat a vaječnicků. Tím bylo dosaženo vyššího počtu mitotických nebo meiotických metafází. V těchto fázích buněčného cyklu jsou chromozomy nejlépe viditelné. O pár let později Brum-Zorrilla a Cazenave (1974) použili jako fixativum roztok methanol:kyselina octová - 3:1 a barvení preparátu Giemsou. Mnoho druhů tkání je vhodných k přípravě cytogenetických preparátů, jako například gonády, cerebrální ganglion a kultura krevních buněk, kterou použil poprvé Wang a Yan (2001). Ke studiu pohlavních chromozomů (SCS) u pavouků velmi přispěla analýza chromozomů během miózy (Král 2007).

Do této doby byla provedena karyotypová analýza u více než 665 druhů pavouků spadajících do 110 čeledí, což je přibližně 1,6 % z celkového počtu druhů (42 423) (Araujo et al. 2012). Pavouci jsou překvapivě po roztočích a sekáčích třetím nejprobádanějším řádem mezi pavoukocí z cytogenetického hlediska (Araujo et al. 2011). Pokud ovšem vezmeme v potaz obrovskou druhovou diverzitu pavouků, jedná se stále o nedostačující

počet. Většina studovaných druhů se řadí do skupiny entelegynních pavouků. Naproti tomu cytogenetika bazálních skupin Araneomorphae - haplogynních pavouků i Mygalomorphae je výrazně méně prozkoumána. Bylo zjištěno, že karyotypy bazálních skupin Araneomorphae (například nadčeleď Dysderoidea) se skládají z holocentrických nebo i normálních chromozomů s jednou dedikovanou centromerou, ačkoliv u moderních pavouků jsou v karyotypu akrocentrické chromozomy (Díaz a Sáez 1966; Benavente a Wettstein 1980). Taktéž byl popsán pro pavouky neobvyklý systém pohlavních chromozomů X0. U většiny pavouků (77 %) se vyskytuje unikátní systém  $X_1X_2O$  (Araujo et al. 2005).

## 4.2 Cytogenetika sekáčů (Opiliones)

Sekáči se řadí do 4 podřádů: Cyphophthalmi, Eupnoi, Dyspnoi a Laniatores a je u nich známo více než 6500 popsáných druhů (Shultz a Regier 2001; Giribet et al. 2002; Hallan 2009). Cytogeneticky je prozkoumáno 1,5 % všech známých druhů sekáčů (Rodriguez Gil a Mola 2010).

Dosud bylo cytogeneticky studováno kolem osmdesáti druhů sekáčů a u nich se variabilita v počtu chromozomů pohybuje od 10 [*Trachyrhynchus rectipalpus*, Cokendolpher, 1981; *Paraumbogrella pumilio* (Karsch, 1881), Phalangidae] (Tsurusaki a Cokendolpher 1990) do 109 (Cokendolpher a Jones 1991) (Tsurusaki 2007). U sekáčů nacházíme převážně metacentrické chromozomy a u některých druhů je prokázána i vnitrodruhová variabilita (Tsurusaki et al. 1991). Jedná hlavně o sekáče z nejodvozenějšího podřádu Laniatores. Tyto druhy sekáčů vykazují mimo vysoké vnitrodruhové variability ( $2n=61-109$ , Gonyleptidae), také nejvyšší chromozomové počty  $2n=40$  až  $2n=109$  (Tsurusaki 2007). Tento fakt je pravděpodobně způsobem polypoidizací karyotypu nebo chromozomovými rozpady (Schneider et al. 2009b). Pro bazální linie je charakteristický nižší počet chromozomů. Cyphophthalmi ( $2n = 30$ ), Eupnoi ( $2n=10-52$ , průměrně = 22) a Dyspnoi ( $2n=10-28$ , průměrně = 16) (Tsurusaki 2007).

Podle dosavadních výsledků nemá velký počet druhů sekáčů pohlavní chromozomy. Typ určení pohlaví abraxas (ZW-ZZ) byl objeven pouze u druhu *Mitopus*

*morio* (Fabricius 1779) (Phalangiidae) a *Odiellus aspersus* (Karsch 1881) (Phalangiidae, Eupnoi). U druhů z podřádů Eupnoi a Dyspnoi navíc najdeme u několika druhů chromozomovou determinaci pohlaví XY (Tsurusaki a Cokendolpher 1990, Tsurusaki 2007).

### 4.3 Cytogenetika štírků (Pseudoscorpiones)

S více než 3380 popsánymi druhy jsou štírci čtvrtým největším řádem třídy pavoukoců (Harvey 2008). Navzdory vysoké druhové diversitě není k dispozici větší množství cytogenetických dat. Zároveň může být velmi obtížné rozlišit jednotlivé druhy pouze na základě morfologických znaků, a proto se cytogenetika jeví jako užitečná k odhalování kryptických druhů. Například analýzy rodu *Roncus* (Šťáhlavský a Zaragoza 2008; Troiano 1990). Molekulární a cytogenetické znaky se podle posledních studií osvědčily mnohem více, než morfologická analýza, protože divergují podstatně rychleji (Šťáhlavský et al. 2009).

Sokolow už v první polovině dvacátého století získal cytogenetická data na štírcích (Sokolow 1926). V rámci studia spermatogeneze provedl základní analýzu karyotypu a zjistil počty chromozomů u druhů *Neobisium carcinoides* (Neobisiidae) a *Dendrochernes cyrneus* (Chernetidae). Opravdu první podrobná karyotypová analýza byla provedena u šesti italských druhů rodu *Roncus* (Neobisiidae) (Troiano 1990, 1997). Tím, že se druhy výrazně lišily počtem i morfologií chromozomů ( $2n=22-52$ ), byly navrženy první fylogenetické vztahy na základě podobnosti karyotypů. V rámci tohoto rodu byla později mezidruhová variabilita v počtu chromozomů využita i k rozlišení kryptických druhů *R. montsenyensis* a *R. cadinensis* (Zaragoza a Šťáhlavský 2008).

Rozpětí diploidního počtu chromozomů je u štírků od 7 (*Olpium turcicum*, Olpiidae) (Šťáhlavský et al. 2006) po 143 u štírků *Cyclatemnus* sp. (Šťáhlavský et al. 2012) U štírků byly popsány dva typy chromozomové determinace pohlaví (X0 a XY). Nejčastějším systémem pohlavních chromozomů u štírků je X0. Systém XY byl popsán ale pouze u již zmiňovaného rodu (*Roncus*) (Troiano 1990, 1997; Šťáhlavský et al. 2006).

## 5 Rod *Euscorpius*

Čeď Euscorpiidae je v Evropě zastoupena pouze rodem *Euscorpius* (Thorell, 1876). Rod *Euscorpius* (Euscorpiidae), který má původní centrum výskytu na Balkáně, je vynikající modelová skupina pro kombinovanou studii chromozomové diferenciaci a morfologické a genetické variability (Vignoli a Salomone 2008). Komplikovaná taxonomie odráží vysokou morfologickou variabilitu tohoto rodu, kdy v současnosti rozeznáváme 18 druhů (Tab. 2) asi s padesáti poddruhy. S největší pravděpodobností tento počet není konečný a existuje předpoklad počtu druhů v Evropě mezi 22-24 (Fet 2010).

Do čeledi Euscorpiidae se mimo především evropský rod *Euscorpius* řadí i rody *Megacormus* a *Plesiochactas*, které jsou nepříbuznější rodu *Euscorpius*. Oba výše zmíněné druhy se vyskytují v Mexiku (Soleglad a Sissom 2001). Přirozený areál rozšíření rodu *Euscorpius* zasahuje od severního Španělska na západě přes mediteránní oblast až po Kavkaz na východě.

Prvním popsaným druhem byl *Scorpio carpathicus*, který Carl Linné popsal z oblasti Transylvánských Alp (Rumunsko) (Linné 1767) a teprve o více než sto let později byl tento druh zařazen do samostatného rodu *Euscorpius* Thorell, 1876. Rod *Euscorpius* se vzhledem ke své nápadnosti těšil u badatelů v Evropě poměrně značné oblibě a během celé doby jeho studia až do současnosti byla popsána řada druhů, které byly nicméně průběžně synonymizované. Popřípadě se snaha o popis lokální variability některých druhů odrážela alespoň ve snaze popsat jednotlivé poddruhy, kterých se ještě na konci minulého století u 4 tehdy rozlišovaných druhů *E. carpathicus* (Linné, 1767), *E. flavicaudis* (De Geer, 1778), *E. italicus* (Herbst, 1800) a *E. germanus* (C. L. Koch, 1837) uvádělo až 48 (Kovařík 1998). Zdá se ale, že teprve kombinace výsledků molekulární fylogeneze a studia variability morfologických a morfometrických znaků z posledních deseti let přinášejí do problematiky složité klasifikace štírů rodu *Euscorpius* jasnější pohled (Gantenbein 1999; Soleglad a Fet 2003).

První molekulární znaky v taxonomii u štírů použil Gantenbein et al. (1999), kteří k analýze fylogeneze a taxonomie rodu *Euscorpius* použili sekvenci genu pro 16S rRNA malé

ribosomální podjednotky. Tato a řada následujících studií následně pomohly odhalit mimo jiné kryptické druhy *E. alpha*, Caporiacco, 1950 (Gantenbein et al. 2000), *E. naupliensis*, (C. L. Koch, 1837) (Gantenbein et al. 2002) a *E. sicanus* (C. L. Koch, 1837) (Fet et al. 2003). Na druhovou úroveň byl povýšen také alpský druh *E. gamma*, Caporicco, 1950 (Scherabon et al. 2000), endemický *E. balearicus* Caporicco, 1950 (Gantenbein et al. 2001) z Baleárských ostrovů a *E. tauricus* (C. L. Koch, 1837) (Fet 2003) z Krymu. Díky kombinaci morfologických a molekulárních znaků se zjistily nejpodstatnější změny hlavně v chápání dřívějšího druhu *E. carpathicus*. Nyní je jasné, že na Balkáně je přítomno více forem tohoto druhového komplexu „*E. carpathicus* complex” (Fet a Soglead 2002, 2007). U rodu *Euscorpius* bohužel zatím nebyly publikovány žádné detailnější cytogenetické analýzy, které by umožňovaly propojení morfologických, molekulárně fylogenetických a karyologických dat. U štírů rodu *Euscorpius* jsou známy pouze velmi základní karyotypové charakteristiky. Konkrétně se jednalo o informace získané o chromozomech při analýze spermatogeneze druhu *E. carpathicus* (Sokolow 1913). V rámci této studie se uvádí počet chromozomů  $2n=70-80$ , což může odrážet variabilitu více druhů v rámci tohoto druhového komplexu.

Rod *Euscorpius* se dělí na čtyři podrody: *Tetratrachobothrius* Birula, 1917, *Polytrichobothrius* Birula, 1917, *Alpiscorpius* Gantenbein et al. 1999, *Euscorpius* Thorell, 1876. Z podrodu *Euscorpius*, jehož některé druhy jsou hlavním předmětem této práce, byl oddělen podrod *Alscorpius* díky DNA analýze (Gantenbein et al. 1999). Druhy z této linie byly dlouho známy jen jako poddruhy v rámci *E. carpathicus*. Odtud neoficiální označení „*E. carpathicus* complex”. Nyní rozeznáváme devět druhů v rámci komplexu *E. carpathicus*. V následném textu budou blíže popsány druhy, které byly analyzovány během výzkumu k této diplomové práci. Jedná se o většinu druhů podrodu *Euscorpius* a podrod *Polytrichobothrius*.

Druh	Rozšíření
1. <i>E. alpha</i> Caporiacco, 1950	severozápadní Itálie (Piemont, Valle d'Aosta a Lombardie), Švýcarsko;
2. <i>E. balearicus</i> Caporiacco, 1950	Baleárské ostrovy (Mallorka, Menorka, Cabrera), Španělsko;
3. <i>E. beroni</i> Fet, 2000	Albánie (Prokletija a Radohimské pohoří);
4. <i>E. carpathicus</i> (Linné, 1767)	Rumunsko (jižní Karpaty);
5. <i>E. concinnus</i> (C. L. Koch, 1837)	Itálie (Lombardie, Liguria, Friuli V. Giulia, Emilia Romagna, Toskánsko, Marche, Umbrie, Latium a Kampánie), Slovinsko (?);
6. <i>E. flavicaudis</i> (DeGeer, 1778)	Alžírsko, Anglie, Brazílie, Francie (i s Korsikou), Itálie (Tyrhénské pobřeží, Ligurie, Kalábrie i menší ostrovy u Sardinie), Jemen, Tunisko, Uruguay;
7. <i>E. gamma</i> Caporiacco, 1950	Chorvatsko, severovýchodní Itálie (Friuli), jižní Rakousko (Korutany), Slovinsko;
8. <i>E. germanus</i> (C. L. Koch, 1837)	severovýchodní Itálie (Trentino Alto Adige, Friuli), Rakousko (jihovýchod), východní Slovinsko a Švýcarsko;
9. <i>E. hadzii</i> Caporiacco, 1950	Albánie, Bosna a Hercegovina, jihozápadní Bulharsko, Černá Hora, Chorvatsko, Kosovo, Makedonie, Srbsko, severozápad Řecka;
10. <i>E. italicus</i> (Herbst, 1800)	Albánie, Alžírsko, Černá Hora, Francie, Itálie (severní, centrální, východní), Jemen, Chorvatsko, Maďarsko, Makedonie, Maroko, Monako, Rumunsko, Rusko (západní Kavkaz), Řecko, San Marino, Slovinsko, Švýcarsko (Ticino a Valais), Tunis, Turecko (oblast u Černého moře);
11. <i>E. koschewnikowi</i> Birula, 1900	severovýchodní Řecko (poloostrov Chalkidiki, Athos);
12. <i>E. mingrelicus</i> (Kessler, 1874)	Albánie, Bosna a Hercegovina, Bulharsko (?), Černá Hora, Gruzie, Chorvatsko, Makedonie, Rusko (Kavkaz), Řecko (?), Slovinsko, Srbsko, Turecko;
13. <i>E. naupliensis</i> (C. L. Koch, 1837)	jihozápad Řecka (Peloponéský poloostrov, ostrovy Zante a Pelouzo);
14. <i>E. oglasae</i> Caporiacco, 1950	Itálie (ostrov Montecristo, severní pobřeží Tyrhénského moře);
15. <i>E. sicanus</i> (C. L. Koch, 1837)	Egypt, jižní a střední Itálie (Gorgona, Giglio, a ostrovy Cerboli, Giannutri, Sicílie, Eolie, Pelagie, Pantelleria a ostrovy Tremity); Malta, Řecko, Bulharsko (?), Tunisko, Libye, Madeira, Sardinie;
16. <i>E. tauricus</i> (C. L. Koch, 1837)	Krym, Ukrajina;
17. <i>E. tergestinus</i> (C. L. Koch, 1837)	Bulharsko (?), Francie (jihovýchodní a Korsika), Chorvatsko, severní a centrální Itálie (včetně ostrovů Capri, Elba, a ostrovu Montecristo), jižní Rakousko, Slovinsko;
18. <i>E. celanus</i> Tropea, 2012	střední Itálie (Celano, Abruzzo)

**Tabulka 2** Rozšíření štirů rodu *Euscorpius* v Evropě. Otazníky (?) označují nepotvrzené lokality výskytu. (upraveno podle Vignoli a Salomone 2008, doplněno o nový druh (Tropea 2012))

### 5.1 *Euscorpius carpathicus* (Linné, 1767)

Tento druh byl popsán již v druhé polovině 18. století a jeho popis byl jen velmi všeobecný, což později způsobilo mnoho zmatků v taxonomii. Analýza odhalila, že tento druh má původní výskyt v Rumunsku-Transylvánské alpy (Soleglad a Fet 2002). Geograficky i geneticky je jasně izolovaný od ostatních druhů a některé taxony [*E. sicanus*, *E. hadzii*, *E. balearicus*, *E. tergestinus*, *E. koschewnikowi* (Fet et al. 2002)] dříve synonymizované s druhem *E. carpathicus* tak byly z tohoto důvodu opět znovu zavedeny. První analýzu mitochondriální DNA, na jejímž základě byly populace v Rumunsku označeny jako samostatný druh, provedl Fet et al. (2002).

### 5.2 *Euscorpius sicanus* (C. L. Koch, 1837)

Je to typický zástupce jižní Evropy, jehož areál zasahuje pravděpodobně díky lidskému zavlečení až do severní Afriky (Fet 2010). Na druhovou úroveň ho postavil Fet et al. (2003). Zároveň synonymizoval dalších sedm bývalých poddruhů *E. sicanus* jako tento konkrétní druh. Typová lokalita tohoto druhu je Messina v severo-východním cípu Sicílie (Itálie). Jinak je rozšířen v celé střední a jižní Itálii, Řecku (Soluň, Peloponés) a také na Maltě, Madeiře a v severní Africe (Colombo 2006).

### 5.3 *Euscorpius tergestinus* (C. L. Koch, 1837)

Tento druh prošel za posledních deset let velkými změnami. Jeho status jako druhu byl aktualizován a později byly odděleny z tohoto druhu další dva druhy: *E. concinnus* a *E. oglasae* (Fet a Soleglad 2002; Vignoli et al. 2005, 2007). *E. tergestinus* patří do „západní linie“ štírů v rámci komplexu *E. carpathicus*. Gantenbein et al. (2001) ukázal, že západní populace z Francie a Itálie (*E. tergestinus*) je geneticky vzdálená od východních populací z typové lokality na Krétě, ačkoliv obě skupiny mají stejné vzorce trichobothrií na patele končetin. Další potvrzení již vydaných studií následovalo po zkoumání populací v Rakousku a Slovinsku. Tamní populace byly podrobeny analýze mitochondriální DNA

sekvence a zjistilo se, že všichni jedinci jsou z tohoto hlediska identičtí, tudíž se předpokládá, že zde hrála roli lidská introdukce ze Slovinska (Huber et al. 2001). Salomone et al. (2007) ve své fylogeografické studii potvrdil status *E. tergestinus* porovnáním s dalšími Italskými druhy *E. sicanus* a *E. concinnus*. Vyskytuje se v Albánii, Chorvatsku, Itálii, Montenegro, San Marinu a Slovinsku. Ekologickými nároky je velice podobný *E. sicanus*, se kterým může žít sympatricky (Colombo 2006).

#### 5.4 *Euscorpius hadzii* Caporiacco, 1950

Taxonomické změny se nevyhnuly ani druhu *Euscorpius hadzii*. Hadzii (1929) popsal tento druh jako poddruh *E. carpathicus polytrichus*. Později Di Caporiacco (1950) upravil jeho status na *Euscorpius carpathicus hadzii*. Toto zařazení ovšem nebylo nikdy citováno. Fet a Söleglad (2002) tento poddruh pozvedli na druhovou úroveň. Taktéž byly objeveny endemické populace z ostrova Lastovo, které byly dříve popisovány jako *E. carpathicus lagostae*, Di Caporiacco, 1950. Rozšíření druhu je široké - od Chorvatska až do severního Řecka a Bulharska (Vignoli a Salomone 2008).

#### 5.5 *Euscorpius concinnus* (C. L. Koch, 1837)

Poddruh *E. carpathicus concinnus* byl dříve přiřazen jako synonymum *E. tergestinus*. V roce 2005 byl vymezen jako samostatný druh. K těmto výsledkům se došlo při morfologické analýze založené na vzorcích trichobothrií na ventrální straně pately (Vignoli et al. 2005). O dva roky později, potvrdila studie založená na srovnávání jaderných a mitochondriálních sekvencí předešlou morfologickou analýzu a byly identifikovány dvě velmi divergentní genetické linie. (Salomone et al. 2007). Je fenotypově podobný *E. concinnus*, ale *E. tauricus* má prodlouženější metasomální segmenty (Fet 2003). *E. concinnus* se vyskytuje v šířce téměř 650 km po území italského poloostrova (Vignoli et al. 2005).

## 5.6 *Euscorpium italicum* (Herbst, 1800)

Tento druh patří do vlastní taxonomické skupiny - podrodu *Polytrichobothrius* Birula, 1917. Tento název se používá z důvodu vysokého počtu trichobothrií na ventrální straně ruky makadla štírů druhu *E. italicum*. Jedná se o největší druh z rodu *Euscorpium* a zároveň například i největší druh štíra, který se vyskytuje v Itálii. Tento druh se nejčastěji vyskytuje na úrovni moře, ale je možné ho najít i ve výškách 1200 m.n.m. (Colombo 2006). Druh preferuje skalnaté útesy a opuštěná lidská obydlí. Je považován za termofilní. Rozlišujeme 8 poddruhů v rámci *E. italicum*. V poslední době byl jeden z poddruhů *E. naupliensis* (C. L. Koch, 1837) vymezen jako samostatný druh (Vignoli a Salomone 2008).

Velmi důležité se jeví, že je *E. italicum* málo geneticky divergentní (Fet et al. 2006). Příčinou současného velkého areálu a malé genetické variability je pravděpodobně šíření z glaciálního refugia během poslední doby, možná i vlivem člověka. Původní areál byl rozdělen v pleistocenním glaciálu. *E. italicum* se charakterizuje dvěma populacemi, přičemž ta východní je považována za glaciální útočiště (Gantenbein et al. 2002). To by mohlo vysvětlovat matoucí absenci *E. italicum* na všech egejských a středozezemních ostrovech (Fet 2010). Tento druh štíra obývá rozsáhlý areál v Evropě. Šíře jeho areálu dokládá fakt, že kromě oblastí s chladným podnebím, jako je například i Česká republika, obývá téměř celistvý pás Evropy od Francie souvisle přes mediteránní oblasti až do Ruska k Černému moři. Pravděpodobně byl introdukovan do severní Afriky (Vignoli a Salomone 2008).

## 5.7 *Euscorpium naupliensis* (C. L. Koch, 1837)

Jedná se o štíra endemicky se vyskytujícího v Řecku na poloostrově Peloponés a na ostrově Zakynthos (Vignoli a Salomone 2008). Dříve byl zařazen jako poddruh *Euscorpium italicum* a v roce 2002 byl vymezen jako samostatný druh. Toto nové zařazení bylo stanoveno díky odlišnostem na genetické i morfologické úrovni (Gantenbein et al. 2002).

## 6 Cíle diplomové práce

Cílem této diplomové práce je zmapování karyotypové variability na mezidruhové úrovni u vybraných druhů rodu *Euscorpius* a zjištění možného využití cytogenetických dat v taxonomii tohoto rodu.

Konkrétně byly vymezeny tyto cíle:

- a) Popsat karyotypy u vybraných druhů z Evropy.
- b) V rámci popisu karyotypů, založených na standardně barvených preparátech, stanovit základní charakteristiky karyotypu tj. počet, morfologie, resp. velikost chromozomů a vzájemně je porovnat.
- c) Získat sekvence genu pro 16S rRNA u karyotypovaného materiálu a porovnat je se sekvencemi z GenBank a a porovnat genetickou variabilitu s karyologickými údaji.

## 7 Materiály a metodika

Jedinci štírů rodu *Euscorpis* byli získáváni individuálním sběrem (nejčastěji pod kameny a pod kůrou) na předem vytipovaných lokalitách (Obr. 15). Podrobné údaje o analyzovaných exemplářích a lokality sekvencí převzatých z GenBanku jsou uvedeny v Tabulce 4. Jako nejvhodnější se pro sběr a následnou karyotypovou analýzu jeví jarní a letní měsíce, protože v tomto období je v tkáních dostatek mitotických i meiotických figur. Získaní štíři byli chováni v klimaboxu s teplotou mezi 20 °C až 25 °C a oscilací den a noc. Dostávali pravidelnou stravu v podobě cvrčků banánových (*Gryllus assimilis*). Jako ideální doba pro analýzu se jevila několik dní po posledním krmení. Při tomto postupu v tkáních bylo nejvíce viditelných chromozomových sestav. Štírům rodu *Euscorpis* se očividně v chovu dařilo a bylo možné je udržet ve vitálním stavu mnoho měsíců do doby, kdy byli použiti pro karyotypovou analýzu. Materiál byl determinován podle aktuálního determinačního klíče (Vignoli a Salomone 2008). Tato determinace dle morfologických znaků byla ověřena Františkem Kovaříkem a prof. Victorem Fetem a následně byla po izolaci DNA porovnána se sekvencemi uloženými v GenBank.

### 7.1 Preparace chromozomů

Štíři rodu *Euscorpis*, kteří patří mezi bezobratlé živočichy, mají obecně ve srovnání s obratlovci mnohem menší množství dělivé tkáně, z které je možné získat chromozomy. Zároveň štíři rodu *Euscorpis* dosahují relativně malých rozměrů. Taktéž dělení buněk je mnohem pomalejší. Tudíž není možná kultivace biologického materiálu odebraného z exempláře, která se běžně provádí například v lidské cytogenetice. V souvislosti s větším množstvím materiálu je možné v lidské cytogenetice uplatnit metodu „dropping“. V tomto případě jsem zvolil metodu „plate spreading“ (Traut 1976), což je z mého pohledu nejvhodnější metoda, protože nedochází ke ztrátám materiálu u malého množství tkáně.

K přípravě chromozomových preparátů byly využity živé exempláře, kterým byl po usmrcení rozstřížen zadeček (opistosoma) po celé délce laterální strany malými nůžkami.

Po otevření tělní dutiny byli jedinci pitváni v hypotonickém roztoku (0,075 M KCl) a byl vypreparován mesenteron. Disekce většiny trávicí soustavy je vhodná, protože vyplňuje většinu tělní dutiny a zamezuje přístupu ke gonádám. Poté byly gonády vypreparovány v celku, aniž bychom je poškodili. Celá pitva a následné ponechání gonád v hypotonickém roztoku trvalo 15 minut. Zbytek těla štíra se uchovává v etanolu pro další určení konkrétního druhu a izolaci DNA. Dále byla hypotonizovaná gonáda vložena do fixačního roztoku (methanol:kyselina octová = 3:1). Ten byl vyměněn po 5 minutách a gonáda byla pochána v roztoku kvůli dostatečné fixaci dalších 15 minut.

Malé kousky gonády (cca 2 mm) byly rozpouštěny na sklíčku v kapce 60 % kyseliny octové a jemně rozmělněny na suspenzi párem wolframových drátků. Sklíčko se suspenzí bylo přeneseno na zahřátou histologickou ploténku (40 °C). Kapkou suspenze bylo pohybováno pomocí wolframového drátku po povrchu sklíčka do té doby, než se vypařila. Následně bylo sklíčko ponecháno k zaschnutí několik hodin, nejlépe však přes noc. Preparáty byly barveny 40 minut v roztoku 5 % Giemsy a Sörensenova pufru (pH/6.8).

## 7.2 Analýza karyotypu

Preparáty byly prohlíženy na světelném mikroskopu Olympus AX 70 Provis s konfokálním nástavcem AX 70. Vybrané chromozomové figury byly fotografovány nainstalovanou kamerou Olympus DP 72. Fotografie byly pořizovány při maximálním možném zvětšení za použití objektivu 100x s imerzním olejem. Cílem bylo pořizovat fotografie chromozomových sestav, u kterých bylo možné snadno rozlišit polohu centromery na každém chromozomu. Ke stanovení počtu chromozomů a k rekonstrukci karyotypu byly používány jak mitotické, tak i meiotické metafáze II a pachytenní a postpachytenní stadia. Klasifikace chromozomů je dána pravidly dle Levana et al. (1964). Jako nejvhodnější pro následnou analýzu se jeví figury metafáze II, kdy mají chromozomy chromatidy směrem od centromery rozestoupené. K analýze fotografií chromozomových sestav byl používán program ImageJ 1.45s (<http://imagej.nih.gov/ij>) s nainstalovaným dodatkem Levan (Sakamoto a Zacaro 2009). Díky dodatku Levan bylo možné měřit postupně obě raménka (p, q) jedné centromery u každého chromozomového páru.

Následné výsledky program upraví do podoby tabulky v editoru Excel. K finální analýze každého druhu bylo použito osm či více měření celých chromozomových sestav. Tato měření byla porovnávána a jednotlivé dílčí výsledky měření byly párovány k sobě podle délky a centromerického indexu (A. R.). Finální data byla průměrována a byly sestaveny karyotypy u analyzovaných druhů štírů rodu *Euscorpis*.

### 7.3 Extrakce DNA

Další částí analýzy byla extrakce DNA z odpreparovaných končetin vybraných karyotypovaných jedinců. Byly použity malé části končetin (3 mm). Před vlastní izolací byly části končetin vyňaty z ethanolu a ponechány zhruba 2 minuty v klidu, aby se odpařil přebytečný ethanol. K extrakci byl použit izolační kit „DNeasy Blood & Tissue Kit“ (Qiagen) a izolace byla provedena dle protokolu pro zvířecí tkáň s délkou působení proteinázy K po dobu 4 hodin. Vyizolovaná DNA je skladována při -20 °C.

### 7.4 PCR (polymerase chain reaction)

Pro účely analýzy DNA byl získán pomocí PCR fragment (cca 320 pb) genu pro 16S rRNA, který byla využit v dosavadních pracech analyzujících genetickou divergenci rodu *Euscorpis* (Gantenbein et al. 1999; Sologlad a Fet 2003). K vlastní PCR byla namíchána reakční směs dle doporučení k PPP Master Mixu firmou Top Bio. Reakční směs měla složení: H<sub>2</sub>O-7 µl, primer-1+1 µl, PPP Master mix-12,5 µl, DNA-3,5 µl. Při PCR byly použity primery, které byly vyzkoušeny v předcházejících pracech u rodu *Euscorpis* - 16S F: GTGCAAAGGTAGCATAATCA a 16S R: CGATTTGAACTCAGATCA (Gantenbein et al. 1999). PCR reakce proběhla v Thermo cycleru T100<sup>TM</sup> (Biorad) a skládala se z následujících kroků: počáteční denaturace 94°C (2 min.) následována 35 cykly 94 °C (40 s) 50 °C (40 s) a 65 °C (60 s), elongace byla při 65 °C (5 min.) a cyklus byl zakončen 4 °C (5 min). Složení PPPMaster Mix (TopBio s.r.o. kat. č. P124): 150 mM Tris - HCl, pH 8,8, 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,02 %, Tween 20, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 400 µM dATP, 400 µM dGTP, 400 µM dATP, 100 µ/ml Taq Purple DNA polymerázy, stabilizátory a aditiva.

Výsledná kvalita PCR produktů byla zkontrolována elektroforézou na 1,5 % agarózovém gelu. PCR produktů a vlastní sekvenace byla provedena firmou Macgen Inc. Po získání sekvencí byla provedena standardní editace v programu BioEdit version 7.1.3.0. V rámci rekonstrukce možných příbuzenských vztahů byla provedena analýza ze získaných sekvencí a z vybraných sekvencí z databáze GenBank (Tab. 4). Alignment byl vytvořen v programu ClustalW. Fylogenetický dendrogram byl konstruován metodami Neighbor-Joining (Obr. 13) a Maximum Likelihood (ML) (Obr. 14) v programu Mega version 5 (Tamura et al. 2011). Vhodný model pro ML byl nalezen pomocí příslušné funkce ve stejném programu. Výsledný model byl TN93+G+I. Pro zjištění statistické podpory topologie dendrogramů byla provedena bootstrapová analýza s 1000 replikacemi.

## 8 Výsledky

### 8.1 *Euscorpis sicanus* (C. L. Koch, 1837)

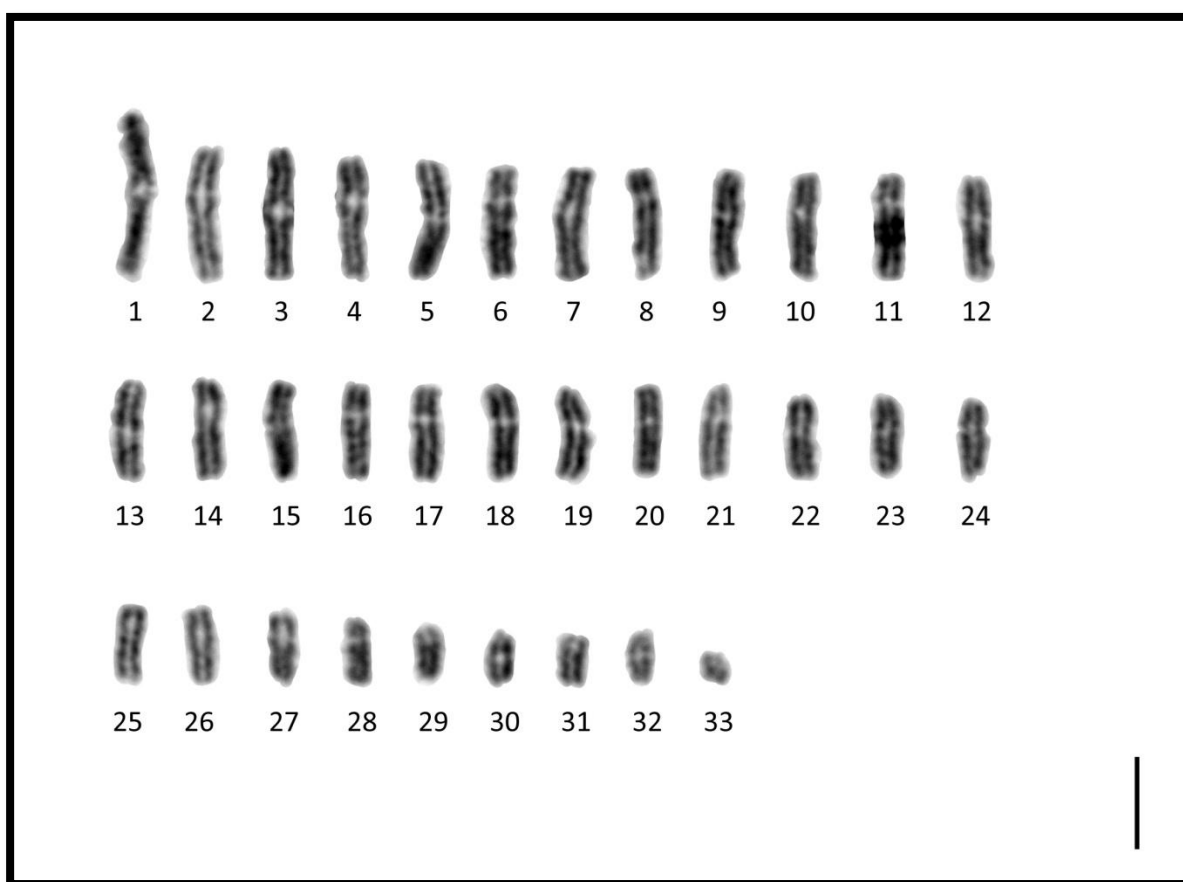
U tohoto druhu byli k analýze morfologie chromozomů vybráni tři samci z lokalit Platamonas a Meteora (Řecko). Karyotyp samce je složen z 33 párů chromozomů (Obr. 3). Karyotyp se skládá z 16 párů metacentrických chromozomů, 14 submetacentrických a 3 subtelocentrických chromozomů. Velikost chromozomů se plynule zmenšuje od 4,94 % do 0,82 % haploidní sady (Tab. 8).

Stejně jako u všech ostatních zástupců tohoto rodu byla i u druhu *E. sicanus* pozorována achiasmatická meioza samců, přičemž v rámci pachytene bylo pozorováno 33 párů chromozomů bez přítomnosti zjevných chiasmát. V rámci meiotického dělení byly pozorovány pachytene a metafáze II. V rámci těchto stadií nebyla pozorována žádná odchylka v barvitelnosti chromozomů a všechny byly v rámci pozorovaných meiotických stadií isopyknotické. U všech analyzovaných jedinců (N=3) nebyly pozorovány žádné heteromorfní bivalenty a nebylo tudíž možno detekovat morfologicky diferencované pohlavní chromozomy. Byly pozorovány chromozomové přestavby u 16 % prohlížených snímků chromozomových sestav (Tab. 3). Všechny pozorované chromozomové přestavby tvořily tetravalenty (Obr. 4)

Analýza genu pro 16S rRNA (Obr. 13; Obr. 14) ukazuje, že by se v případě druhu *E. sicanus* nemuselo jednat o monofyletickou skupinu. Dva vzorky identifikované jako *E. hadzii* (S80 a S95) totiž v rámci obou analýz (Neighbor-Joining i Maximum Likelihood) vycházejí jako vnitřní skupiny *E. sicanus*. Toto zařazení má nicméně velmi malou podporu a tak topologie v této části stromů může být i odlišná. Diploidní počty chromozomů jsou naopak u všech vzorků determinovaných jako *E. sicanus* stejné a zdá se, že tento druh může být pomocí karyotypů dobře charakterizován.

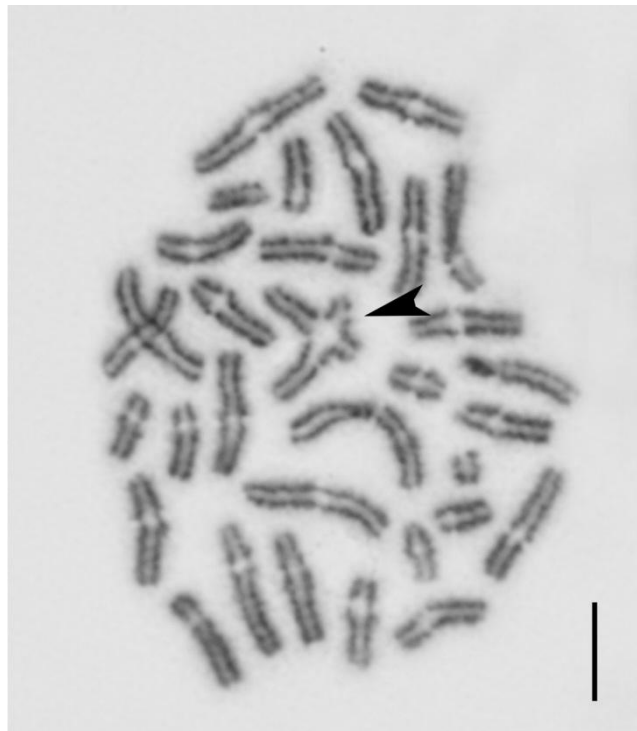
druh	PPF	PŘ	% PŘ
<i>E. sicanus</i>	87	14	16%
<i>E. carpathicus</i>	101	6	6%

**Tabulka 3** Počet figur s chromozomovou přestavbou. PPF - počet prohlédnutých figur, PŘ - počet přestaveb, % PŘ - procentuální zastoupení přestaveb ze všech prohlédnutých figur.



**Obrázek 3**

Karyotyp *E. sicanus* (sestaveno z pachytene),  $2n=66$ , měřítko  $5 \mu\text{m}$ .

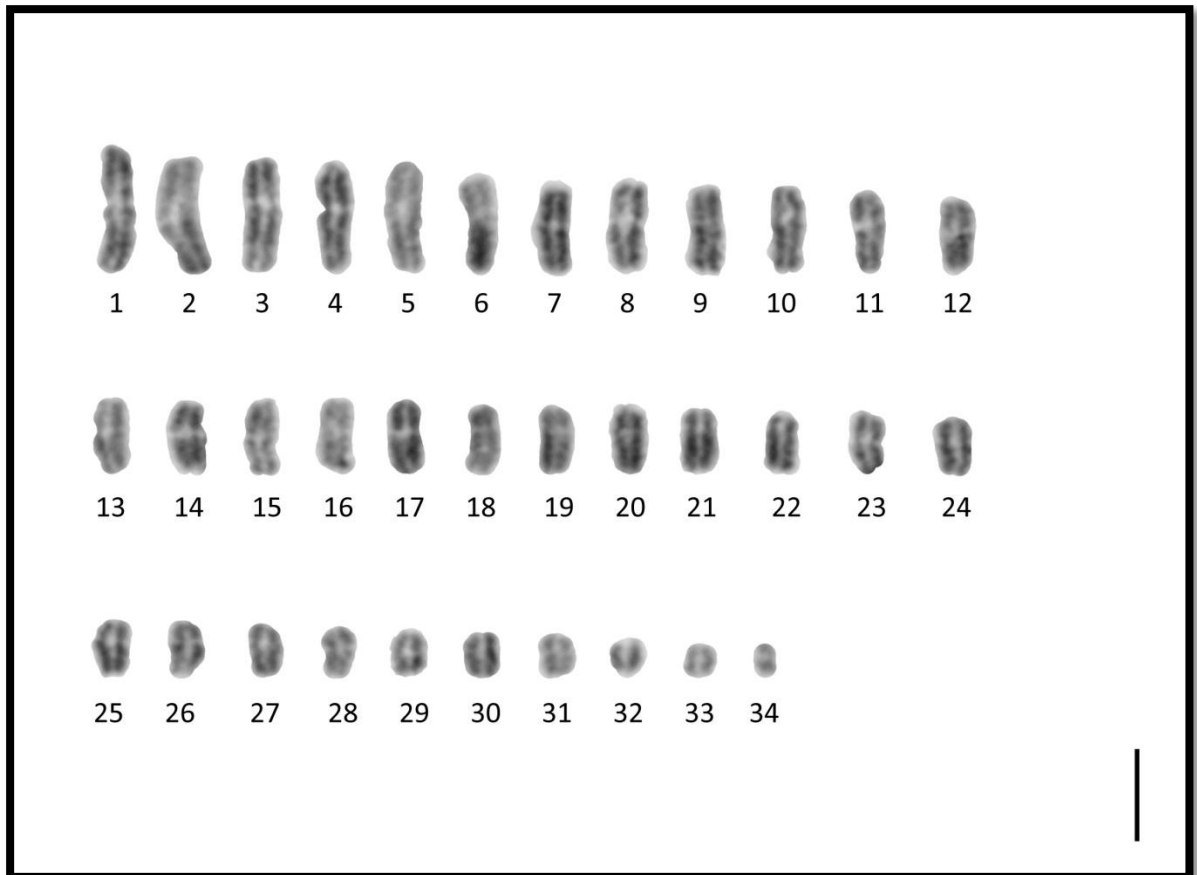


**Obrázek 4**  
Chromozomová přestavba (černá šipka - tetraivalent)  
u druhu *E. sicanus*

## 8.2 *Euscorpium hadzii*, Caporiacco, 1950

V rámci tohoto druhu se podařilo získat pouze tři samce ze dvou různých lokalit v Albánii (Kukes) a Srbsku (Džep). Karyotyp všech tří analyzovaných samců je složen z 34 párů chromozomů (Obr. 5). Karyotyp se skládá z 26 párů metacentrických chromozomů a 8 párů submetacentrických. Velikost chromozomů se plynule zmenšuje od 5,63 % do 0,84 % haploidní sady (Tab. 7). Byla pozorována achiasmatická meióza a v rámci pachytene bylo pozorováno 34 párů chromozomů bez zjevných chiasmat. Byly pozorovány pachytene metafáze II u meiotického dělení a metafáze mitotického dělení. Veškerá stadia vykazovala isopyknotické chromozomy. U všech tří analyzovaných jedinců nebylo možné vizuálně detekovat pohlavní chromozomy. Pozice analyzovaných vzorků determinovaných jako *E. hadzii* se v rámci analýzy genu pro 16S rRNA (Obr. 13; Obr. 14) ukazuje, být jako nejkomplicovanější. Například pozice vzorků S94 a S95 z jedné lokality v Albánii jsou v rámci obou analýz (Neighbor-Joining i Maximum Likelihood) odlišné.

Podpora topologie je nicméně v této části fylogenetického stromu velmi malá a tak může být i odlišná. Diploidní počty chromozomů jsou u všech tří vzorků *E. hadzii* stejné  $2n=68$ .



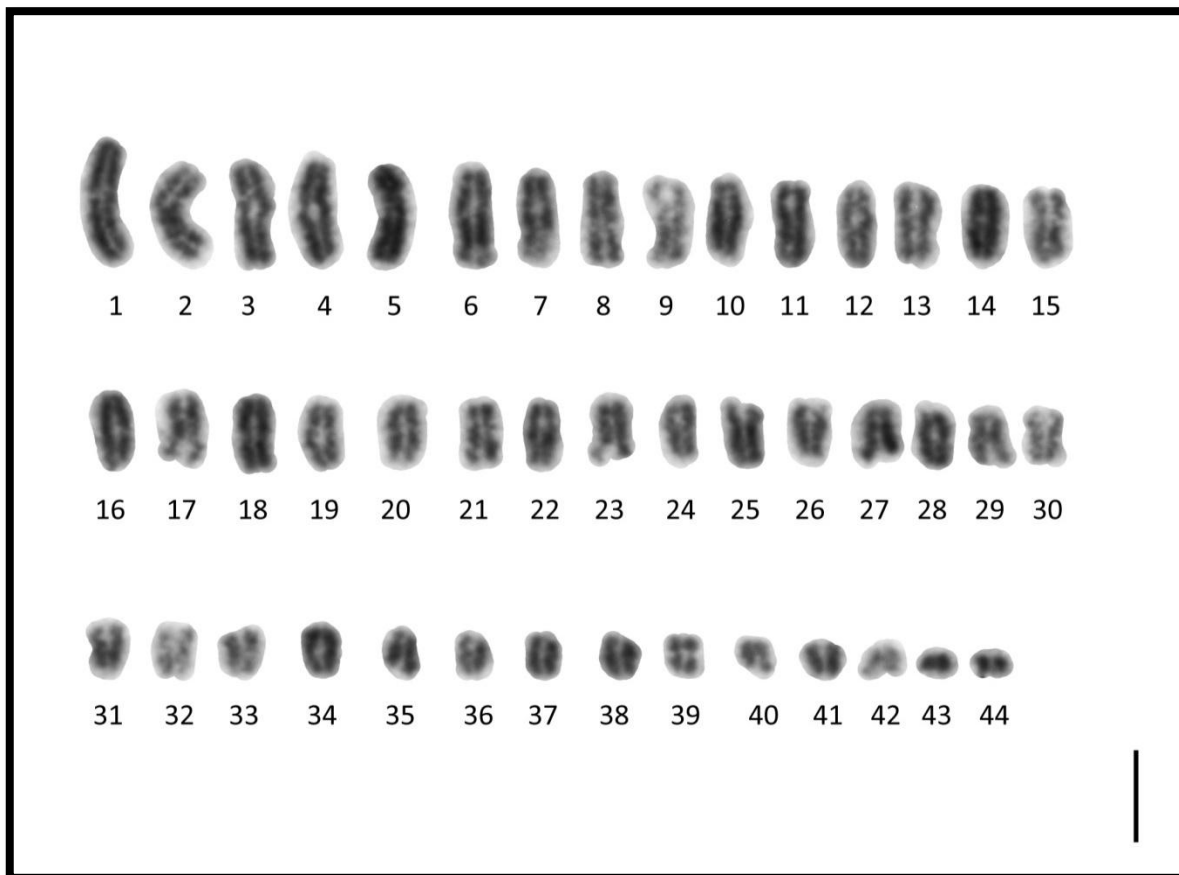
**Obrázek 5**

Karyotyp *E. hadzii* (sestaveno z pachytene),  $2n=68$ , měřítko  $5\mu\text{m}$ .

### 8.3 *Euscorpius concinnus* (C. L. Koch, 1837)

U tohoto druhu byli k analýze morfologie chromozomů vybráni tři samci z ostrova Ráb a Malá Paklenica v Chorvatsku. Karyotyp samce je složen ze 44 párů chromozomů (Obr. 6). Z hlediska morfologie chromozomů je složen z 18 metacentrických chromozomů, 15 submetacentrických a 11 subtelocentrických chromozomů. Velikost chromozomů se plynule zmenšuje od 4,69 % do 0,67 % haploidní sady (Tab. 5). Byla pozorována achiasmatická meióza a v rámci pachytene bylo pozorováno 44 párů chromozomů bez zjevných chiasmat. Byly pozorovány pachytene metafáze II u meiotického dělení a metafáze II mitotického dělení. Veškerá stadia vykazovala isopyknotické chromozomy. U všech tří analyzovaných jedinců nebylo možné vizuálně detekovat pohlavní chromozomy.

Analýza genu pro 16S rRNA (Obr. 13; Obr. 14) ukazuje, že se v případě druhu *E. concinus* pravděpodobně jedná o monofyletickou skupinu. V rámci analýzy se zjistilo, že se může jednat o dvě linie - západní, zahrnující vzorky z Francie a západní části Itálie a východní, zahrnující vzorky ze severovýchodní Itálie a Chorvatska. Tato hypotéza by se ale musela testovat na větším množství vzorků. Zjištěné diploidní počty jsou nicméně stejné pro všechny analyzované exempláře.



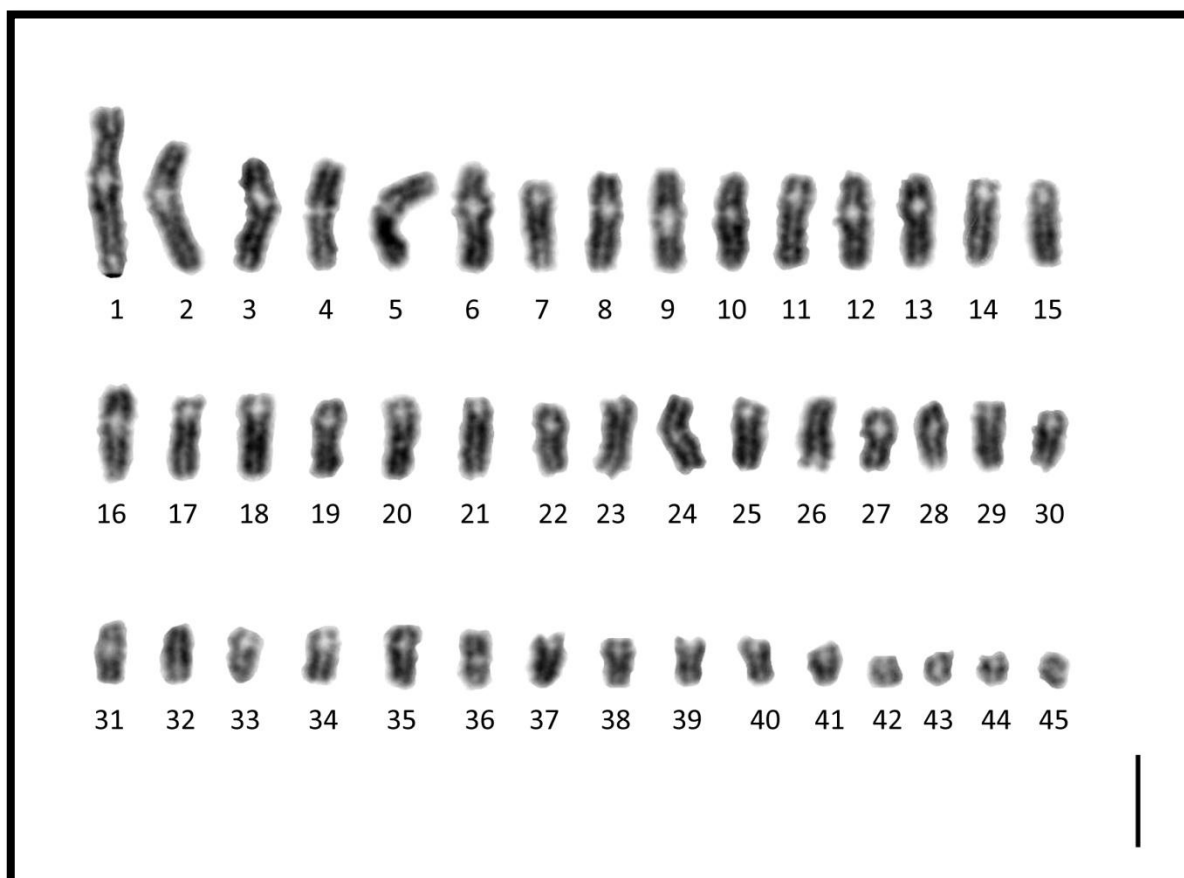
**Obrázek 6**

Karyotyp *E. concinnus* (sestaveno z pachytene),  $2n=88$ , měřítko  $5\mu\text{m}$ .

#### 8.4 *Euscorpis carpathicus* (Linné, 1767)

K analýze karyotypu byli vybráni čtyři samci z lokalit Cheile Lotrisorului a Beile Herculane v Rumunsku. Karyotyp samce je složen ze 45 párů chromozomů (Obr. 7). Z hlediska morfologie chromozomů je složen z 13 metacentrických chromozomů, 20 submetacentrických a 12 subtelocentrických chromozomů. Velikost chromozomů se plynule zmenšuje od 5,05 % do 0,66 % haploidní sady s výjimkou prvního metacentrického chromozomu, který je o téměř 1,5 % větší než následující chromozom (Tab. 6) Byla pozorována achiasmatická meióza a v rámci pachytene bylo pozorováno 45 párů chromozomů bez zjevných chiasmat. Byly pozorovány pachytene metafáze II u meiotického dělení a metafáze II mitotického dělení. Veškerá stadia vykazovala isopyknotické chromozomy. U všech 4 analyzovaných jedinců nebylo možné vizuálně

detekovat pohlavní chromozomy. Byly pozorovány chromozomové přestavby u 6 % prohlížených snímků chromozomových sestav (Tab. 3). Všechny pozorované chromozomové přestavby tvořily tetravalenty. Analýza genu pro 16S rRNA (Obr. 13; Obr. 14) potvrzuje monofylii *E. carpathicus*, což potvrzují i informace o karyotypu ( $2n=90$ ), který je výrazně odlišný od ostatních analyzovaných taxonů rodu *Euscorpius*.



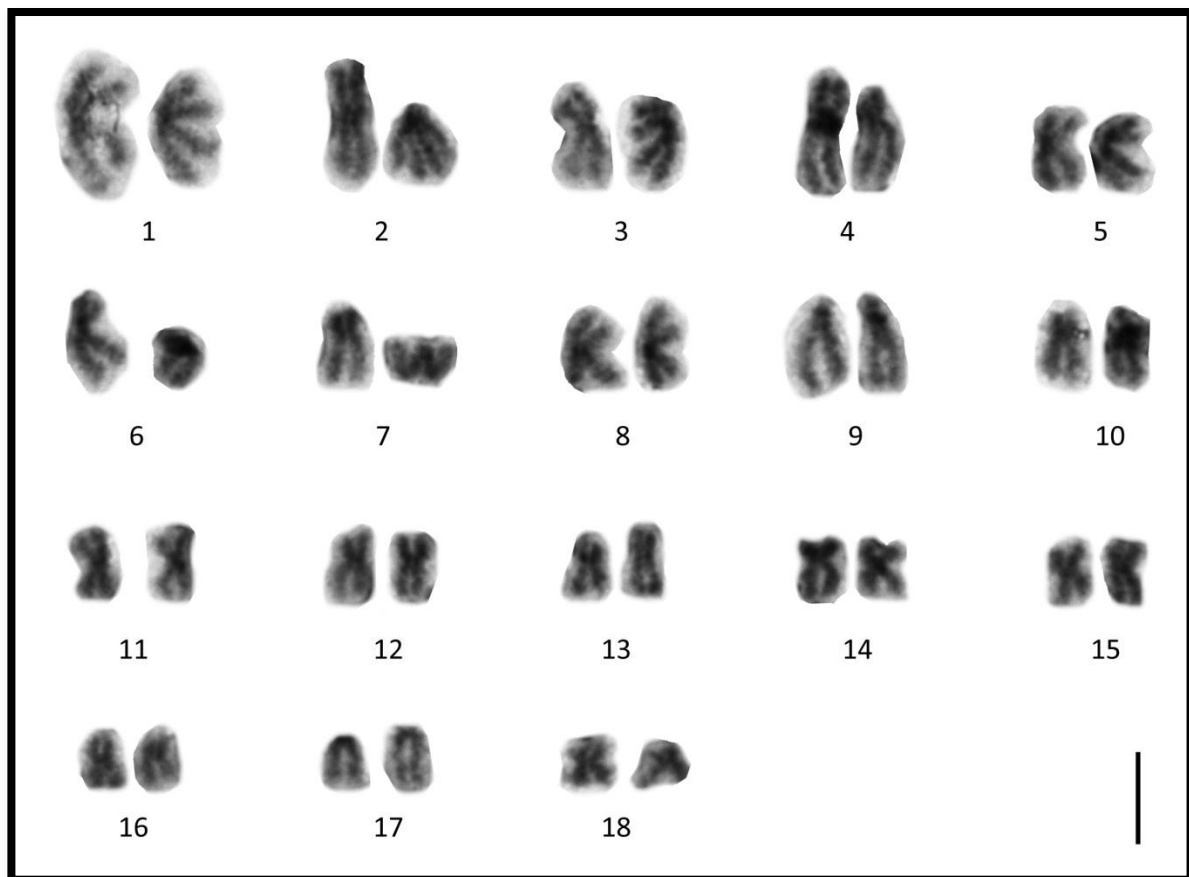
**Obrázek 7**

Karyotyp *Euscorpius carpathicus* (sestaveno z pachytene),  $2n=90$ , měřítko 5  $\mu\text{m}$ .

## 8.5 *Euscorpius italicus* (Herbst, 1800)

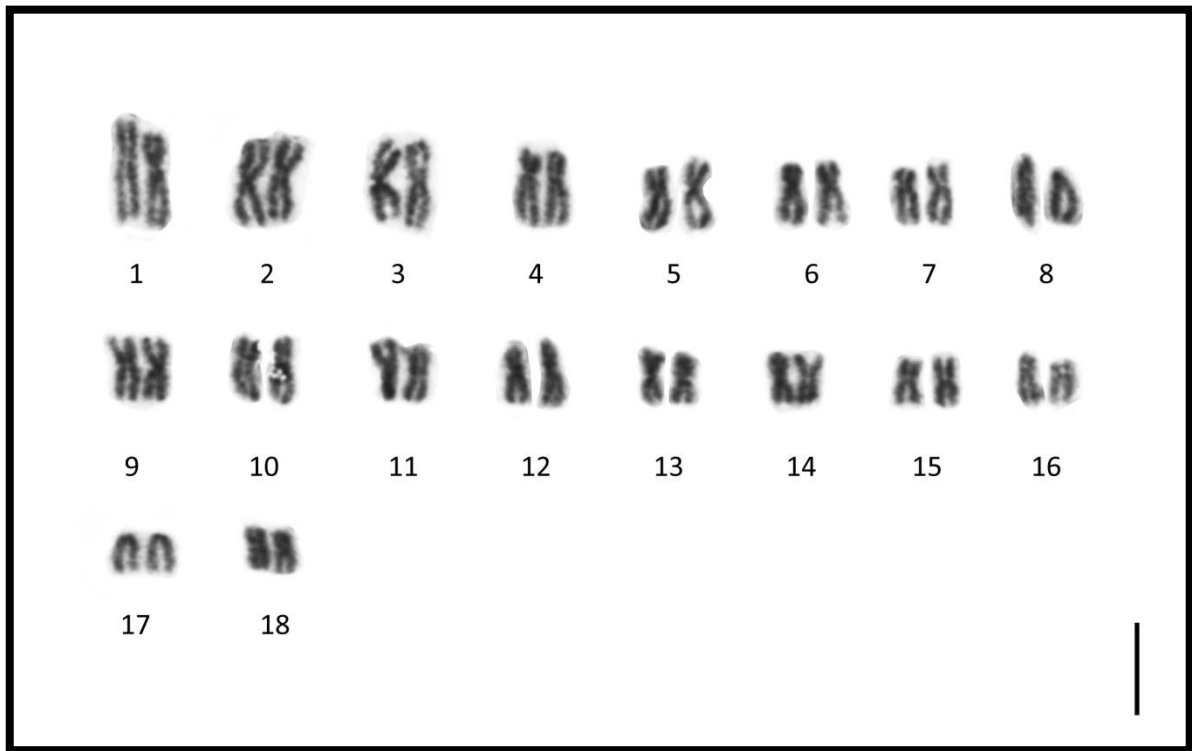
V rámci tohoto druhu se podařilo získat pouze dva samce ze dvou různých lokalit Vikos (Řecko) a Velká Paklenica (Chorvatsko). V rámci všech analyzovaných populací byl zjištěn diploidní počet složený z 18 párů chromozomů. Množství materiálu umožnilo detailněji porovnat vzájemně karyotypy dvou populací z Velké Paklenice (Chorvatsko) a z Vikosu (Řecko). Karyotyp těchto detailněji analyzovaných populací se skládá z 11 (Obr. 9) (Velká Paklenica) nebo 9 (Obr. 10) (Vikos) párů metacentrických chromozomů a 5 (Velká Paklenica) nebo 7 (Vikos) párů submetacentrických a z 2 (obě populace shodně) párů telocentrických chromozomů. Velikost chromozomů se plynule zmenšuje od 9,48 % do 3,31 % (Tab. 10) haploidní sady u populace z Velké Paklenice a od 8,29 % do 3,31 % haploidní sady u populace z Vikosu (Tab. 9). Oba karyotypy se liší pouze v detailech, které mohou být způsobeny faktem, že u těchto populací byly analyzovány odlišné stadia meiozy. Ta jsou odlišně spiralizovaná a tím mohlo dojít k posunu centromerických indexů. Hlavní rozdíl je ve výskytu telocentrického páru chromozomů v karyotypu. U populace z Vikosu (Obr. 10) je jeden ze dvou telocentrických chromozomů na osmé pozici a u Velké Paklenice je tento chromozom na deváté pozici (Obr. 9). Byla pozorována achiasmatická meióza a v rámci pachytene bylo pozorováno 18 párů chromozomů bez zjevných chiasmat. Byly pozorovány pachytene metafáze II u meiotického dělení a metafáze mitotického dělení. Veškerá stadia vykazovala isopyknotické chromozomy. U obou analyzovaných jedinců nebylo možné vizuálně detekovat pohlavní chromozomy.

Analýza genu pro 16S rRNA (Obr. 13; Obr. 14) ukazuje, že by se v případě druhu *E. italicus* jedná monofyletickou skupinu. Je zajímavé, že jedinci z různých [CHOR-Velká Paklenica, Ráb, GR-Vikos, TUR-Giresun (GenBank)] lokalit mají identické haplotypy. Diploidní počty chromozomů jsou u všech vzorků determinovaných jako *E. italicus* stejné a velmi nízké v porovnání s ostatními druhy ( $2n=36$ ). Karyotyp je stejně jako u *E. carpaticus* velmi odlišný od ostatních taxonů rodu *Euscorpius*, a proto se zdá, že tento druh může být pomocí karyotypu dobře charakterizován.



**Obrázek 9**

Karyotyp *E. italicus* (populace Velká Paklenica) sestavený z dceřiných metafází II,  $2n=38$ , měřítko 5  $\mu\text{m}$ .



**Obrázek 10**

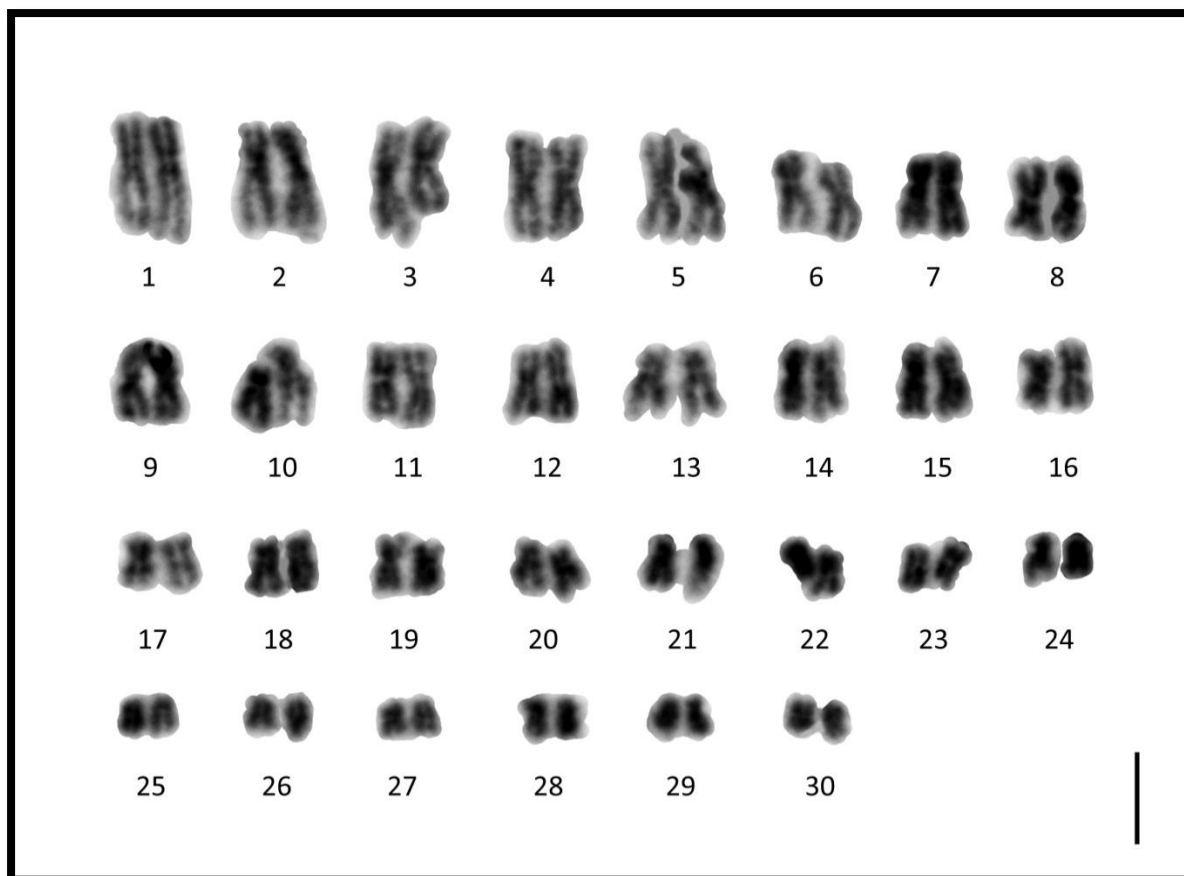
Karyotyp *E. italicus* (populace Vikos) sestavený z pozdní metafáze I,  $2n=38$ , měřítko 5  $\mu\text{m}$ .

### 8.6 *Euscorpium naupliensis* (C. L. Koch, 1837)

Morfologická analýza byla provedena u dvou vybraných samců z Řecka. Konkrétně z lokalit Kalidona a Lagadha. Karyotyp samce je složen z 30 párů chromozomů (Obr. 11). Karyotyp se skládá z 23 metacentrických chromozomů a 7 submetacentrických chromozomů. Relativní velikost chromozomů se plynule zmenšuje od 5,66 % do 1,56 % haploidní sady (Tab. 11).

Stejně jako u všech ostatních zástupců tohoto rodu byla i u druhu *E. naupliensis* pozorována achiasmatická meioza samců, přičemž v rámci pachytene bylo pozorováno 30 párů chromozomů bez přítomnosti zjevných chiasmat. V rámci meiotického dělení byly pozorovány pachytene metafáze II. V rámci těchto stadií nebyla a pozorována žádná odchylka v barvitelnosti chromozomů a všechny byly v rámci pozorovaných meiotických stadií isopyknotické. U všech analyzovaných jedinců ( $N=2$ ) nebyly pozorovány žádné heteromorfní bivalenty, nebylo tudíž možno detekovat morfologicky diferencované pohlavní chromozomy. Analýza genu pro 16S rRNA (Obr. 13; Obr. 14) ukazuje, že

analyzovaný taxon je monofyletický a obdobně jako ostatní analyzovaných druhů rodu *Euscorpium* analýza dobře koreluje se zjištěnou odlišností karyotypu, který tento druh také velmi dobře charakterizuje.



**Obrázek 11**

Karyotyp *Euscorpium naupliensis* z pozdní metafáze I,  $2n=60$ , měřítko 5  $\mu\text{m}$ .

### 8.7 *Euscorpium tergestinus* (C. L. Koch, 1837)

Pro nedostatek kvalitních snímků chromozomových sestav z nasbíraných jedinců nebylo možné popsat morfologii karyotypu tohoto druhu. Ze získaných snímků bylo pouze malé množství figur ve fázi pachytene nebo metafáze II a také byly špatně viditelné centromery. Bylo však možné pozorovat chromozomy bez viditelných chiasmat. Byl stanoven počet chromozomů v diploidním počtu charakteristický pro *E. tergestinus*. Karyotyp samce je složen z 30 páru chromozomů. Tři jedinci využití k přípravě chromozomových preparátů byli nasbíráni v lokalitách Loppio a Verona (Itálie) a Štanjel

(Slovinsko) a u všech jedinců byl diploidní počet stejný (Tab. 4). Analýza genu pro 16S rRNA (Obr. 13; Obr. 14) ukazuje, že v tomto případě jedná o monofyletickou skupinu.

## 9 Diskuse

Diploidní počet chromozomů u štírů se pohybuje v rozmezí od 5 u druhu *Tityus bahiensis* (Piza 1939) do 175 u druhu *Urodacus novaehollandiae* (Shanahan 1989b). Jedná se o největší rozpětí diploidního počtu chromozomů v rámci pavoukoců, nicméně i některé další řády této třídy vykazují velmi výrazné rozpětí diploidního počtu chromozomů. Jedná se především o sekáče:  $2n=10-109$  (Tsurusaki 2007), pavouky:  $2n=7-128$  (Suzuki 1954, Dulíková a Král 2007) a štírky: 7 (*Olpium turcicum*, Olpiidae) (Šťáhlavský et al. 2006) po 143 u štírků *Cyclatemnus* sp. (Šťáhlavský et al. 2012).

Je nutné dodat, že ačkoliv řád štíři jako celek má velké rozpětí počtu chromozomů, tak pokud se podíváme na některé vnitřní taxony v rámci toho řádu, ukáže se, že variabilita již není tak velká (Obr. 1). Jedná se hlavně o rozdíly mezi infrařády lurida a Buthida. V jejichž rámci mají jednotlivé rody výrazně menší rozpětí diploidního počtu chromozomů (Tab. 1). Zástupci infrařádu lurida mají mimo čeleď Bothriuridae, u níž je  $2n=36-46$ , diploidní počet chromozomů vyšší než 50. Počty chromozomů jsou u čeledí Scorpionidae -  $2n=60-120$ , Hemiscorpiidae -  $2n=54-126$ , Chactidae -  $2n=50$  a Vaejovidae -  $2n=100$  (Schneider et al. 2009b). Největší variabilitu a to i vnitrodruhovou vykazuje v rámci podřádu lurida čeleď Hemiscorpiidae. Konkrétně jsou to druhy *Urodacus* spp. ( $2n=56-126$ ) a štíři *Liocheles australasiae* ( $2n=54-64$ ) a *Opisthacanthus elatus* ( $2n=60-62$ ) (Schneider et al. 2009b).

Infrařád Buthida zahrnuje jedinou čeleď Buthidae, která je v rámci štírů druhově nejbohatší (963 druhů) (Rein 2012) a zároveň nejlépe cytogeneticky prostudovaná (Schneider et al. 2009b). Tato skupina vykazuje nižší počty chromozomů ( $2n=5-56$ ) (Tab. 1). U zde analyzovaných druhů rodu *Euscorpius* se diploidní počet chromozomů, u zatím karyotypovaných druhů, pohybuje od  $2n=38$  - *E. italicus* až po  $2n=90$  - *E. carpahicus* (Tab. 12). Tyto zjištěné počty tento rod řadí z hlediska počtu chromozomů do skupiny štírů s vyššími počty chromozomů a s poměrně vysokou variabilitou chromozomového počtu v rámci jednoho rodu.

Jak již bylo zmíněno, chromozomová variabilita u některých skupin pavoukovců je vysoká a tohoto faktu se v některých případech podařilo využít v taxonomii. U některých řádů pavoukovců se již podařilo propojit morfologické analýzy s karyologickými údaji což umožnilo odhalení kryptických druhů. Například Zaragoza a Štáhlavský (2008) vydali studii provedenou na dvou zástupcích štírků rodu *Roncus* (Pseudoscorpiones: Neobisiidae), ve které byl popsán nový druh, který je geograficky i morfologicky velmi blízký již známému druhu (Zaragoza, 2007). V uvedené práci byla provedena integrující morfologická a karyologická analýza. Bez cytogenetických analýz by nebylo možné tyto druhy rozlišit. Bylo zjištěno, že druh *Roncus montsenyensis* má v karyotypu pouze dvouramenné chromozomy, naproti tomu *Roncus cadinensis* vykazuje predominanci jednoramenných chromozomů, což naznačuje diferenciaci karyotypů pomocí centrických fúzí nebo naopak rozpady dvouramenných chromozomů (Zaragoza a Štáhlavský 2008). Dalším příkladem odhalení kryptických druhů pomocí odlišných karyotypů byla kombinovaná analýza provedená na pavoucích *Zodarion germanicum* (C. L. Koch, 1837) a *Zodarion rubidum*, Simon, 1914 (Araneae, Zodariidae). Tyto dva druhy se mezi sebou odlišují nejen počtem chromozomů, tak i systémem pohlavních chromozomů. Konkrétně se jednalo o systém pohlavních chromozomů  $X_1X_20$ , kde samec měl  $X_1X_20$  a samice  $X_1X_1X_2X_2$  u druhu *Z. germanicum*. U druhu *Z. rubidum* byl popsán systém  $X0$ , kde samec měl  $X0$  a samice  $XX$ . V této práci byly také zjištěny diploidní počty chromozomů. Druh *Z. germanicum* má v karyotypu 29 chromozomů u samců a 30 u samic a druh *Z. rubidum* má 24 chromozomů v diploidní sadě u samců a 26 u samic (Pekár a Král 2001). Karyotypy zjištěné u vybraných evropských druhů rodu *Euscorpis* v rámci této diplomové práce ukazují, že podobně by se mohlo využít karyologických údajů i v taxonomii tohoto rodu.

Zjištěná variabilita v počtu chromozomů může mít nicméně i jiné příčiny než pouze mezidruhovou variabilitu. Lukhtanov et al. (2011) prokázal, že u motýla druhu *Leptidea sinapis* (Linnaeus, 1758) dochází k velmi výrazné změně v počtu chromozomů u tohoto druhu motýla v rámci jeho velkého areálu rozšíření od Španělska ( $2n=106$ ) až po východní Kazachstán ( $2n=56$ ). Velká vnitrodruhová variabilita byla zjištěna i u řady druhů štírů. Shanahan (1989b) vydala studii, ve které byla zjištěna velká mezidruhová variabilita ( $2n=29-64$ ) u druhu *Urodacus manitus* (Thorell, 1876) (Urodacidae). Tato variabilita byla odůvodněna chromozomovými rozpady a fúzemi a také variabilním počtem malých

telocentrických chromozomových párů. Všechny druhy ze skupiny Urodacidae vykazují zároveň i vysoké chromozomové počty. U druhů štírů s holocentrickými chromozomy (*Tythus bahiensis*) byla také zjištěna velká vnitrodruhová variabilita. Tento jev je možný, protože při rozpadech a fúzích, které lze pozorovat v karyotypu štíra *Tythus bahiensis*, nedochází ke ztrátě kinetické aktivity chromozomů. U tohoto druhu štíra byly chromozomové přestavby velmi časté a s velkými multivalenty chromozomů. Zároveň byla zjištěna další skutečnost. Synaptonemální komplex, který je zodpovědný za řádné homologní rozdělení v anafázi I buněčného cyklu, je zde zachováván do pozdních stádií profáze I (Schneider et al. 2009a). To se zdá být vhodné u druhů členovců, kteří mají achiasmatickou meiozu, protože synaptonemální komplex v tomto případě supluje funkci chiasmat (Rasmussen 1977). Tento stav byl zjištěn i u druhu *Bolbe nigra* (Mantodea), *Bombyx mori* a *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera) (Gassner 1969; Rasmussen 1977; Marec and Traut 1993). Nicméně, zjištěné výsledky a srovnání morfologických znaků, karyotypů a sekvencí genu pro 16S rRNA u rodu *Euscorpis* naznačují, že se jedná skutečně o mezidruhové rozdíly. Zjištěná karyotypová variabilita v rámci rodu *Euscorpis* potvrzuje výsledky dosažené pomocí metod molekulární fylogeneze i morfologických znaků (Gantenbein 1999; Soleglad a Fet 2003; Fet a Soleglad 2002, 2005)

Existuje několik možných scénářů, jak proběhla karyotypová evoluce u štírů rodu *Euscorpis* a klíčová otázka je, zda byl původní karyotyp rodu *Euscorpis* složen z vysokého nebo z nízkého počtu chromozomů. Jednou z možností je, že ancestrální karyotyp byl u rodu *Euscorpis* složen z vysokého počtu chromozomů. Otázka ancestrálního karyotypu ale není zatím zcela jasná. Pokud bereme jako bazální skupinu Chactidae (Soleglad a Fet 2003), u které nejsou k dispozici žádná karyologická data, není možné stanovit, jestli je vysoký počet chromozomů u rodu *Euscorpis* odvozený nebo původní. Jestliže budeme uvažovat jako bazální skupiny Chactidae a Buthidae (Prendini a Wheeler 2005), bylo by možné, že vysoké počty chromozomů u celého infrařádu Iurida (Obr. 1) jsou odvozeným znakem, protože buthidní štíři mají nízké počty chromozomů ( $2n=5-56$ ) (Schneider et al. 2009b). Nelze dokonce vyloučit, že za vysokými počty chromozomů v rámci infrařádu Iurida (a ancestrálním vysokým počtem chromozomů u rodu *Euscorpis*) stojí polyploidie z původně nízkého počtu chromozomů, který jsou zachovány u čeledi Buthidae. Müller (1925) předpokládá, že jednou z možných překážek a

důvodem nízkého výskytu polyploidie u živočichů je přítomnost pohlavních chromozomů. Ty ale zatím u štírů a ani u rodu *Euscorpius* nebyly pozorovány a tak by případnou polyploidii nevyklučovaly. Novější výsledky navíc ukazují na to, že ani diferencované pohlavní chromozomy nejsou nepřekonatelnou bariérou v polyploidizaci karyotypu (Mable 2004). Vysoký počet chromozomů u rodu *Euscorpius* může být dán i faktem, že celý řád štírů mohl mít jako ancestrální vysoké počty chromozomů a čeleď Buthidae je z cytogenetického hlediska samostatná skupina u které došlo ke snížení počtu chromozomů. Samostatný vývoj chromozomů naznačuje i výskyt holocentrických chromozomů, zjištěných zatím jen v rámci této čeledi (Schneider et al. 2009b). V případě, že vysoké počty jsou u štírů a i rodu *Euscorpius* výchozí stavem, tak se dá předpokládat, že se karyotypy diferencovaly zejména snižováním počtu chromozomů a to například pomocí centrických fúzí. To může být dokumentováno na zastoupení subtelocentrických chromozomů pouze v karyotypech s vysokými počty chromozomů (Tab. 12). Obdobný způsob karyotypové evoluce může být pozorován i v rámci jiných skupin pavoukovců. Jako například u Atypidae a *Roncus* (Řezáč et al. 2006; Zaragoza a Štáhlavský 2008). U rodu *Euscorpius* by tak zřejmě došlo k několika nezávislým snižováním počtu chromozomů a to přinejmenším v rámci obou analyzovaných podrodů *Polytrichobothrius* a *Euscorpius*. Karyotyp druhu *E. italicus* ( $2n=36$ ) by tak byl například nejodvozenější v rámci podrodu *Polytrichobothrius*.

Další scénář karyotypové evoluce rodu *Euscorpius* může naopak uvažovat jako výchozí stav nízký počet chromozomů a vyšší počty chromozomů u některých druhů rodu *Euscorpius* by mohly vznikat centrickými rozpady dvouramenných chromozomů, což se uvažuje například u štírků z čeledi Atemnidae (Štáhlavský et al. 2012).

Zdá se, že u studovaných druhů rodu *Euscorpius* převládá spíše trend snižování počtu chromozomů. Jelikož je patrné nejen snižování počtu metacentrických a submetacentrických chromozomů při snižování diploidního počtu (Obr. 12 A), ale zejména snižování počtu subtelocentrických a telocentrických chromozomů při snižování diploidního počtu (Obr. 12 B). Ještě nápadnější jsou změny procentuálního zastoupení uvedených typů chromozomů. Zatímco procentuální zastoupení dvouramenných chromozomů se víceméně nemění (Obr. 12 C), tak počet subtelo- a telocentrických

chromozomů při snižování počtu chromozomů výrazně klesá (Obr. 12 D). Chromozomové fúze se podílely na snižování počtu chromozomů také u štírků rodu *Roncus* (Troiano 1990) nebo u pavouka *Argyroneta aquatica* (Král et al. 2011). Mimo vlastní změny v počtu jednotlivých morfologických typů chromozomů navíc pro hypotézu o snižování diploidních počtů přispívá i fakt, že u dalšího druhu *Euscorpius flavicadis* byl v nedávné době zjištěn také vysoký počet chromozomů  $2n=90$  (Plíšková, ústní zdělení). Pro finální vyřešení karyotypové evoluce rodu *Euscorpius* by nicméně bylo vhodné přesněji zjistit fylogenetické vztahy, například za pomoci většího množství genů.

V rámci této práce bylo karyotypováno 6 druhů štírů rodu *Euscorpius*. Konkrétně se jednalo o druhy - *E. italicus*, *E. naupliensis*, *E. sicanus*, *E. carpathicus*, *E. hadzii* a *E. concinnus* a částečně také *E. tergestinus*. Původní záměr počítal mimo analýzy vlastních karyotypů také s porovnáním meiozy. Podařilo se nicméně získat jen fragmentární údaje. I tyto zatím neúplné výsledky zjištěné v diplomové práci nicméně neprokázaly přítomnost chiasmat v pozorovaných chromozomových figurách a analýza meiozy prokázala absenci diplotene a diakineze. Pro štíry i pro rod *Euscorpius* je tudíž typická achiasmatická meioza (Venkatanarasimhaiah 1965; Shanahan a Hayman 1990; Schneider et al. 2009b). Achiasmatická meioza vznikala nezávisle v několika skupinách v celé živočišné říši (mimo savců) a u některých rostlin (White 1973). Tento typ meiozy je charakteristický pouze pro heterogametické pohlaví, protože ve většině případů, je přerušení chiasmat omezené na jedno pohlaví a to většinou heterogametické (White 1973). U samic rodu *Euscorpius* se ale bohužel nepodařilo získat žádné informace o meioze. Mezi pavoukovci byl tento typ meiozy objeven u většiny cytogeneticky studovaných štírů (Venkatanarasimhaiah 1965; Shanahan a Hayman 1990; Schneider et al. 2009b), dále u některých acariformních roztočů (Keyl 1957), pavouků čeledí Dysderidae and Segestriidae (Benavente a Wettstein 1980; Rodriguez et al. 2002) a u štírků čeledi Chthoniidae (Šťáhlavský a Král 2004).

Dalším typickým znakem společným pro všechny doposud studované štíry je absence morfologicky diferencovaných pohlavních chromozomů. Jediná zmínka o pohlavních chromozomech štírů byla uvedena v práci od Srivastava a Agrawal (1961). Jednalo se o druh *Heterometrus longimanus*, Ehrenberg, 1828. Popis pohlavních chromozomů XY/XX u tohoto druhu byl pravděpodobně způsoben špatnou interpretací

výsledků a taktéž nízkou kvalitou chromozomových preparátů. U žádného zde studovaného druhu rodu *Euscorpius* nebylo možné detekovat pohlavní chromozomy. Všechny studované chromozomové sestavy vykazovaly isopyknózu. To by ukazovalo na vyšší pravděpodobnost nepřítomnosti pohlavních chromozomů, jelikož v mnoha případech jsou u ostatních pavoukovců během meiozy dobře rozlišitelné právě díky odlišné intenzitě obarvení (Araujo et al. 2012). McKee a Handel (1993) napsali, že heteropyknóza je běžně pozorována u pohlavních chromozomů zejména u samců. Také se zdá, že vysoká míra chromozomové kondenzace brání rekombinacím mezi nehomologními oblastmi heteromorfního pohlavního chromozomu. Je třeba zmínit, že byly pozorovány pouze samčí chromozomové figury.

Stejně jako u štírů, nejsou pohlavní chromozomy popsány u některých bazálních skupin sekáčů (Tsurusaki 2007). Zdá se, že nediferencované pohlavní chromozomy se dají považovat za ancetrální znak celé třídy pavoukovců (Araujo et al. 2012) i navzdory tomu, že u řady řádů pavoukovců můžeme najít velmi dobře diferencované pohlavní chromozomy. Například pavouci jsou z hlediska pohlavních chromozomů zajímavou skupinou, protože u většiny pavouků (77 %) se vyskytuje unikátní systém pohlavních chromozomů  $X_1X_2O$  (Araujo et al. 2005). Některé z bazálních skupin pavouků a araneomorfů ze skupiny Entelogyneae mají systém  $XO$  (Král et al. 2006). Pro pavouky je predominantním systémem zmiňovaný  $XO$ , který mají pavouci ze skupiny Entelogyneae. Původ systému  $XO$  by mohl být vysvětlen fúzí chromozomů  $X_1 X_2$  (Hackman 1948). Velmi zajímavé systémy pohlavních chromozomů najdeme u některých pavouků ze skupiny Entelogyneae. Jedná se o systémy tvořené více než dvěma  $X$  chromozomy ( $X_1X_2X_3O$  nebo výjimečně  $X_1X_2X_3X_4O$ ), které se pravděpodobně vyvinuly ze systému  $X_1X_2O$  nondisjunktním redukčním dělením buňky (Postiglioni a Brum-Zorrilla 1981). Pro štírky je typický systém pohlavních chromozomů  $XO$ , avšak rod *Roncus* má pro štírky neobvyklý systém  $XY$  (Troiano 1990).

Pohlavní chromozomy tedy u štírů zatím nebyly detekovány, ale je možné, že by mohly být objeveny, pokud bude provedena rozsáhlá analýza pomocí hybridizace *in situ* (FISH) a dalších molekulárních metod.

## 10 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo zmapování karyotypové diverzity na mezidruhové úrovni u sedmi druhů rodu *Euscorpius* a zjištění možného využití cytogenetických dat v taxonomii tohoto rodu.

Výsledky této diplomové práce se dají shrnout v následujících bodech:

- Byly popsány karyotypy šesti druhů štírů rodu *Euscorpius*. Druh *E. tergestinus* nebylo možné zanalyzovat z hlediska morfologie chromozomů. U tohoto druhu byl stanoven diploidní počet chromozomů.
- U analyzovaných druhů je diploidní počet chromozomů variabilní ( $2n=38-90$ ).
- Jednotlivé druhy se dají pomocí karyotypů rozlišit a karyotypová charakteristika odpovídá s výjimkou druhu *E. hadzii* velmi dobře taxonům stanovených i na základě analýzy genu pro 16S rRNA rDNA. Karyologická data se proto jeví jako využitelná v taxonomii rodu *Euscorpius*.
- Karyotypová evoluce rodu *Euscorpius* je pravděpodobně spojená se snižováním počtu chromozomů.
- U rodu *Euscorpius* byla zjištěna achiasmatická meioza a nebyly detekovány heteromorfní pohlavní chromozomy, což jsou charakteristiky typické pro zástupce řádu štíři (Scorpiones).

## 11 Literatura

- Araujo, D., Cella, D. M. a Brescovit, A. D. 2005. Cytogenetic analysis of the neotropical spider *Nephilengys cruentata* (Araneomorphae, Tetragnathidae): standard staining, NORs, Cbands and base-specific fluorochromes, *Brazilian Journal of Biology* 65: 193-202.
- Araujo, D, Mattos, F. V., Giroti, A. M., Kraeski, G. M., Carvalho, L. S. a Brescovit, A. D. 2011. Cytogenetical characterization of six orb-weaver species and review of cytogenetical data for Araneidae, *Journal of Arachnology* 39: 337-344.
- Araujo, D., Schneider, C. M., Paula-Neto, E. a Cella, D. M. 2012. Sex Chromosomes and Meiosis in Spiders: A Review, *Meiosis - Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity*, Andrew Swan InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/meiosis-molecular-mechanisms-and-cytogenetic-diversity/sex-chromosomes-and-meiosis-of-spiders-a-review>.
- Benavente, R. a Wettstein, R. 1980. Ultrastructural characterization of the sex chromosomes during spermatogenesis of spiders having holocentric chromosomes and long diffuse stage, *Chromosoma* 77: 69-82.
- Brum-Zorrilla, N. a Cazenave, A. M. 1974. Heterochromatin localization in the chromosomes of *Lycosa malitiosa* (Arachnida), *Experientia* 30: 94-95.
- Caporiacco, D. L. 1950. Le specie e sottospecie del genere "Euscorpius" viventi in Italia ed in alcune zone confinanti, *Memorie Accademia nazionale dei Lincei* 2: 159-230.
- Carnoy, J. B. 1885. La cytodie´re`se chez les Arthropodes, *La Cellule* 1: 189-440.
- Coddington, J. A. a Levi, H. W. 1991. Systematics and evolution of spiders (Araneae). *Annual Review of Ecology and Systematics* 22: 565-592.
- Colombo, M. 2006. New data on distribution and ecology of seven species of *Euscorpius* Thorell, 1876 (Scorpiones: Euscorpiidae), *Euscorpius* 36: 1-40.
- Davygora, A. V. a Rusakov, A. V. 2001. About northern limits of *Mesobuthus eupeus* and *Galeodes pallasi* spreading in the south Ural steppes. *Biodiversity and bioresources of Urals and adjacent territories, Gaspompechat: Orenburg*: 210-211.
- Dernburg, A. F. 2001. Here, there, and everywhere: kinetochore function on holocentric chromosomes, *The Journal of Cell Biology* 153: 33-38.
- Díaz, M. O. a Sáez, F. A. 1966. Karyotypes of South American Araneida, *Mem Inst Butantan* 33: 153-154.
- Dunlop, J. A. 2010. Geological history and phylogeny of Chelicerata, *Arthropod Structure & Development* 39: 124-142
- Dunlop, J. A., Penney, D., Tetlie, O. E. a Anderson, L. I. 2008. How many species of fossil arachnids are there?, *Journal of Arachnology* 36: 267-272.

- Dulíková, L. a Král, J. 2007. Insights into the karyotype evolution of the spider infraorder Mygalomorphae, In: Reihms, C. A., Machado, G., Brescovit, A. D, Gnaspini, P., Pinto-da-Rocha, R., Ruiz, G. S. a Santos, A. J (eds): Book of Abstracts, 17th International Congress of Arachnology, 5-10th August 2007, Pp. 244
- Fet, V. 2010. Scorpions of Europe, *Acta Zoologica Bulgarica* 62: 3-12.
- Fet, V., Gantenbein, B., Karatas, A. a Karatas, A. H. 2006. Extremely low genetic divergence across the range of *Euscorpius italicus* (Scorpiones, Euscorpiidae), *Journal of Arachnology* 34: 248-253.
- Fet, V. a Soleglad, M. E. 2002. Morphology analysis supports presence of more than one species in the "Euscorpius carpathicus" complex (Scorpiones: Euscorpiidae), *Euscorpius*, 3: 1-51.
- Fet, V. a Soleglad, M. E. 2005. Contributions to Scorpion Systematics. I. On Recent Changes in High-Level Taxonomy, *Euscorpius* 31: 2-10.
- Gantenbein, B., Fet, V., Barker, M. a Scholl, A. 2000. Nuclear and mitochondrial markers reveal the existence of two parapatric scorpion species in the Alps: *Euscorpius germanus* (C. L. Koch, 1837) and *E. alpha Di Caporiacco*, 1950, stat. nov. (Euscorpiidae), *Revue suisse de Zoologie* 107: 843-869.
- Gantenbein, B., Fet, V., Largiadèr, C. R. a Scholl, A. 1999. First DNA phylogeny of the genus *Euscorpius* Thorell 1876 (Scorpiones, Euscorpiidae) and its bearing on the taxonomy and biogeography of this genus, *Biogeographica* 75: 59-72.
- Gantenbein, B., Fet, V., a Gromov, A. V., 2003. The first DNA phylogeny of four species of *Mesobuthus* Vachon, 1950 (Scorpiones: Buthidae) from Eurasia, *Journal of Arachnology* 31: 412-420.
- Gantenbein, B., Soleglad, M. E. a Fet, V. 2001. *Euscorpius balearicus* Caporiacco, 1950, stat. nov. (Scorpiones: Euscorpiidae): molecular (allozymes and mtDNA) and morphological evidence for an endemic Balearic Islands species, *Organisms, Diversity & Evolution* 1: 301-320.
- Gantenbein, B., Soleglad, M. E., Fet, V., Crucitti, P. a Fet, E. V. 2002. *Euscorpius naupliensis* (C. L. Koch, 1837) from Greece: elevation to the species level justified by molecular and morphological data, *Revista Ibérica de Arachnología* 6: 13-43.
- Gassner, G. 1969. Synaptonemal complexes in the achiasmatic spermatogenesis of *Bolbe nigra* Giglio-Tos (Mantoidea), *Chromosoma* 26: 22-34.
- Giribet, G., Edgecombe, G. D., Wheeler, W. C. a Babbitt, C. 2002. Phylogeny and systematic position of Opiliones: A combined analysis of Chelicerate relationships using morphological and molecular data, *Cladistics* 18: 5-70.
- Hackman, W. 1948. Chromosomenstudien an Araneen mit besonderer Berücksichtigung der Geschlechtschromosomen, *Acta Zoologica Fennica* 54: 1-101.

- Hadži, J. 1929. Skorpije Schmidtove zbirke. *Euscorpius italicus polytrichus* n. ssp. i ostale nove rase (Die Skorpione der Schmidt'schen Sammlung: *Euscorpius italicus polytrichus* n. ssp. und andere neue Rassen), *Glasnik Muzejskega Drustva za Slovenijo* 10: 30-41.
- Hájek, J., Hotový, J., Koutecký, P. a Matějů, J. 2004. Úvod do biogeografie, Institut dětí a mládeže, Pp. 98.
- Hallan, J. 2009. Biology Catalog, <http://entowww.tamu.edu/research/collection/hallan>
- Harvey, M. S. 2011. Pseudoscorpions of the World, version 2.0. Western Australian Museum, Perth. <http://www.museum.wa.gov.au/catalogues/pseudoscorpions>
- Hewitt, G. M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation, *Biological Journal of Linnean Society* 85: 247-276.
- Hewitt, G. M. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages, *Nature* 405: 907-913.
- Huber, D., Gantenbein, B., Fet, V. a Scherabon, B. 2001: *Euscorpius carpathicus* (L.) from Austria (Scorpiones: Euscorpiidae): phylogenetic position clarified by mitochondrial DNA analysis. - In: Fet, V. a Selden, P. A. (Eds.): *Scorpions 2001. In memoriam Gary A. Polis*. Burnham Beeches, Bucks: British Arachnological Society, 273-278.
- Jeram, A. J. 1998. Phylogeny and classification of Palaeozoic scorpions, In *Proc. 17th Europ. Coll. Arachnol. Edinburgh 1997*, 17-31.
- John, B. 1990. Meiosis, Cambridge University Press, Pp.369.
- Keyl, H. G. 1957. Zur Karyologie der Hydrachnellen (Acarina), *Chromosoma* 8: 719-729.
- Komposch, C., Scherabon, B. a Fet, V. 2001: Scorpions of Austria. - In: Fet V., P. A. Selden (Eds.): *Scorpions 2001. In Memoriam Gary A. Polis*. Burnham Beeches, Bucks: British Arachnological Society, 267-272.
- Kovařík, F., Soleglad, M. E., Fet, V. a Yağmur, E. A. 2010. Etudes on iurids, III. Revision of the genus *Iurus* Thorell, 1876, with the description of two new species (Scorpiones: Iuridae), *Euscorpius* 45: 25-40.
- 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., Kořínková, T., Forman, M. a Krkavcová, L. 2011. Insights into the meiotic behavior and evolution of multiple sex chromosome systems in spiders, *Cytogenetic and Genome Research* 133: 43-66.
- Král J., Musilová, J., Štáhlavský, F., Řezáč, M., Akan, Z., Edwards, L. R., Coyle, F. A. a Almerje, C. R. 2006. Evolution of the karyotype and sex chromosome systems in basal clades of araneomorph spiders (Araneae, Araneomorphae), *Chromosome Research* 14: 859-80.
- Kraus, O., 1976. Zur phylogenetische Stellung und Evolution der Chelicerata, *Entomologica Germanica* 3: 1-12.

- Lee, W. K. a Seo, H. Y. 1995. Soil-inhabiting Pseudoscorpions of the Genus *Allochthonius* from Korea, Korean Journal of Systematic Zoology. 11: 455-468.
- Levan, A. K., Fredga, K. a Sandberg, A. A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes, Hereditas 52: 201-220.
- Linné, C. 1767: Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, Locis. Ed. 12, Holmiae (Stockholm): Laurentii Salvii, 1 (2): 533-1327 In Fet, V. a Soleglad, M. 2002: Morphology analysis supports presence of more than one species in the “*Euscorpium carpathicum*” komplex (Scorpiones: Euscorpiidae), Euscorpium 3: 1-51.
- Lomolino, M. V., Riddle, B. R. a Brown, J. H. 2006. Biogeography. 3rd edition. Sunderland, Massachusetts, Pp. 845.
- Lukhtanov, V. A., Dincă, V., Talavera, G. a Vila, R. 2011. Unprecedented within-species chromosome number cline in the Wood White butterfly *Leptidea sinapis* and its significance for karyotype evolution and speciation, BMC Evolutionary Biology 11: 109.
- Mable, B. K. 2004. Why polyploidy is rarer in animals than in plants: myths and mechanisms, Biological Journal of the Linnean Society 82: 453-466.
- Marec, F. a Traut, W. 1993. Synaptonemal complexes in female and male meiotic prophase of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera), Hereditas 73: 394-404.
- McKee, B. D. a Handel, M. A. 1993. Sex chromosomes, recombination and chromatin conformation, Chromosoma 102: 71-80.
- Moore, G., Aragón-Alcaide, L., Roberts, M., Reader, S., Miller, T. a Foote, T. 1997. Are rice chromosomes components of a holocentric chromosome ancestor?, Plant Molecular Biology 35, 17-23.
- Müller, H. J. 1925. Why polyploidy is rarer in animals than in plants, The American Naturalist 59: 346-353.
- Nagaki, K., Kashihara, K. a Murata, M. 2005. Visualization of diffuse centromeres with centromere-specific histone H3 in the holocentric plant *Luzula nivea*, American Society of Plant Biologists 17: 1886-1893.
- Newlands, G. 1978. Review of southern African scorpions and scorpionism, South African Medical Journal 54: 613-615.
- Newlands, G. a Martindale, C. B. 1980. The buthid skorpion fauna of Zimbabwe-Rhodesia with checklist and keys to the genera and species, distributions and medical importance, Zeitschrift für Angewandte Zoologie 67: 51-77.
- Oliveira, R. M., Zacaro, A. A., Gnaspini, P. a Cella, D. M. 2006. Cytogenetics of three Brazilian *Goniosoma* species: a new record for diploid number in Laniatores (Opiliones, Gonyleptidae, Goniosomatinae), The Journal of Arachnology 34 435-443.
- Parmakelis A., Stathi, I., Spanos, L., Louis, C. a Mylonas M. 2006. Phylogeography of *Iurus dufourei* (Brullé, 1832) (Scorpiones, Iuridae), Journal of Biogeography 33: 251-260.

- Pekár, S. a Král, J. 2001. A comparative study of the biology and karyotypes of two central European Zoodariid spiders (Araneae, Zodariidae), *Journal of Arachnology* 29: 345-353.
- Pinter, L. J. a Walters, D. M. 1971. Karyological studies I. A study of the chromosome numbers and sex-determining mechanism of three species of the genus *Phidippus* (Aranea: Salticidae, Dendryphantinae), *Cytologia* 36: 183-189.
- Piza, S. D. 1939. Comportamento dos cromossomos na primeira divisão do espermatozoido do *Tityus bahiensis*, *Scientia Genetica* 1: 255-261.
- Platnick, N. I. 2011. The world spider catalog version 13.0, In: American Museum Of Natural History, 25. 6. 2012, Dostupné <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>
- Polis, G. 1990. *The Biology of scorpions*, Stanford University Press, Pp. 587
- Postiglioni, A. a Brum-Zorrilla, N. 1981. Karyological studies on Uruguayan spiders II. Sex chromosomes in spiders of the genus *Lycosa* (Araneae-Lycosidae), *Genetica* 56: 47-53.
- Prendini, L. a Wheeler, W. C. 2005. Scorpion higher phylogeny and classification, taxonomic anarchy, and standards for peer review in online publishing, *Cladistics* 21: 446-494.
- Rasmussen, S. W. 1977. Meiosis in *Bombyx mori* females, *Philosophical Transactions of the Royal Society London* 277: 343-350.
- Rein, J. O. 2012. *The Scorpion Files*. Trondheim: Norwegian University of Science and Technology. <http://www.ntnu.no/ub/scorpion-files/>, Dostupné 16. 8. 2012.
- Rodríguez, G., Sergio, G. a Mola, L. M. 2010. Chromosome complement and meiosis of *Holmbergiana weyenberghii* (Opiliones: Sclerosomatidae: Gagrellinae) from Argentina, *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina* 69: 167-170.
- Rodríguez, G., Sergio, G., Mola, L. M., Papeschi, A. G. a Scioscia, C. L. 2002. Cytogenetic heterogeneity in common haplogyne spiders from Argentina (Arachnida, Araneae), *Journal of Arachnology* 30: 47-56.
- Řezáč, M., Král, J., Musilová, J. a Pekár, S. 2006. Unusual karyotype diversity in the European spiders of the genus *Atypus* (Araneae: Atypidae), *Hereditas* 143: 123-129.
- Sakamoto, Y. a Zacaro, A. A. 2009. LEVAN, an ImajeJ plugin for morphological cytogenetic analysis of mitotic and meiotic chromosomes. Initial version. An open source Java plugin distributed over the Internet from <http://rsbweb.nih.gov/ij/>
- Salomone N., Vignoli V., Frati, F. a Bernini, F. 2007. Species boundaries and phylogeography of the "Euscorpium carpathicus complex" (Scorpiones: Euscorpidae) in Italy, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 502-514.

- Schneider, M. C., Zacaro, A. A., Pinto-da-Rocha, R., Candido, D. M. a Cella, D. M. 2009a. Complex meiotic configuration of the holocentric chromosomes: the intriguing case of the scorpion *Tityus bahiensis*, *Chromosome Research* 17: 883-898.
- Schneider, M. C., Zacaro, A. A., Pinto-da-Rocha, R., Candido, D. M. a Cella, D. M. 2009b. A comparative cytogenetic analysis of two Bothriuridae species and overview of the chromosome data of Scorpiones, *Journal of Heredity* 100: 545-555.
- Selden, P. A., Shear, W. A. 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.
- Selden, P. A., Shear, W. A. a Sutton, M., 2008. Fossil evidence for the origin of spider spinnerets, and a proposed arachnid order, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 20781-20785.
- Sissom, W. D. 1990. Systematics, Biogeography, and Paleontology, Pp. 64-160. In: Polis, G. A. (ed): *The Biology of scorpions*. Stanford, California.
- Shanahan, C. M. 1989a. Cytogenetics of Australian scorpions 1: Interchange polymorphism in the family Buthidae, *Genome* 32: 882-889.
- Shanahan, C. M. 1989b. Cytogenetics of Australian scorpions 2: Chromosome polymorphism in species of *Urodacus* (family Scorpionidae), *Genome* 32: 890-900.
- Shanahan, C. M. a Hayman, D. L. 1990. Synaptonemal complex formation in male scorpions exhibiting achiasmatic meiosis and structural heterozygosity, *Genome* 33: 914-926.
- Shear, W. A., Selden, P. A., Rolfe, W. D. I., Bonamo, P. M. a Grierson, J. D. 1987. New terrestrial arachnids from the Devonian of Gilboa, New York (Arachnida, Trigonotarbita), *American Museum Novitates* 2901: 1-74.
- 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, *Zoological Journal of the Linnean Society* 150: 221-265.
- Shultz, J. W. a Regier, J. C. 2001. Phylogenetic analysis of Phalangida (Arachnida, Opiliones) using two nuclear protein-encoding genes supports monophyly of Palpatore, *Journal of Arachnology* 29: 189-200.
- Sokolow, I. 1926. Untersuchungen über die Spermatogenese bei Arachniden. II: Über die Spermatogenese der Pseudoscorpione, *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* 3: 615-681.
- Soleglad, M. E. a Fet, V. 2003. High-level systematics and phylogeny of the extant scorpions (Scorpiones: Orthosterni), *Euscorpius* 11: 1-175.
- Srivastava, M. D. a Agrawal, L. U. 1961. Absence of chiasmata and formation of a complex chromosomal body in the spermatogenesis of the scorpion *Palamnaeus longimanus*, *Caryologia* 14: 63-77.

- Stockmann, R. a Ythier, E. 2010. *Scorpions of the World*, N.A.P Editions, Pp. 568.
- Suzuki, S. 1954. Cytological studies in spiders. III. Studies on the chromosomes of fifty-seven species of spiders belonging to seventeen families, with general consideration on chromosomal evolution, *Journal of Science of Hiroshima University* 15: 23-136.
- Šťáhlavský, F., Henderick, H. a Král, J. 2005. Karyotype study on pseudoscorpions of the genus *Lasiochernes* Beier (Pseudoscorpiones, Chernetidae), *Folia biologica* 53: 69-74.
- Šťáhlavský, F., Král, J., Harvey, M. S. a Haddad, C. R. 2006. A karyotype study on the pseudoscorpion families Geogarypidae, Garypinidae and Olpiidae (Arachnida: Pseudoscorpiones), *European Journal of Entomology* 103: 277-289.
- Šťáhlavský, F., Král, J., Harvey, M. S. a Haddad, C. R. 2012. The First Cytogenetic Characterization of Atemnids: Pseudoscorpions with the Highest Chromosome Numbers (Arachnida: Pseudoscorpiones), *Cytogenetic and Genome Research* 137: 22-30.
- Šťáhlavský, F., Zeh, J., Zeh, D. a Král, J. 2009. Karyotypes of the neotropical pseudoscorpions *Semeiochernes armiger* and *Cordylochernes scorpioides* (Pseudoscorpiones: Chernetidae), *Journal of Arachnology* 37: 87-91.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. a Kumar, S. 2011. Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods, *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- Traut, W. 1976. Pachytene mapping in the female silkworm *Bombyx mori* L. (Lepidoptera), *Chromosoma* 58: 275-284.
- Troiano, G. 1990: Karyotype and male meiosis of four species of *Roncus* Koch L., 1873 (Pseudoscorpionida, Neobisiidae), *Bolletino di zoologia* 57: 1-9.
- Troiano, G. 1997. Further studies on caryology of the pseudoscorpions of the gen. *Roncus*: the karyotype of *Roncus gestroi* and *Roncus belluatii*, *Caryologia* 50: 271-279.
- Tropea, G. 2012. A new species of *Euscorpius* Thorell, 1876 (Scorpiones, Euscorpiidae) from Italy, *Bulletin of the British Arachnological Society* 15: 253-259.
- Tsurusaki, N. 2007. *Harvestmen: the Biology of Opiliones Cytogenetics*, Harvard University Press, Cambridge: 266-279.
- Tsurusaki, N. a Cokendolpher, J. C. 1990: Chromosomes of sixteen species of harvestmen, *Journal of Arachnology* 18: 151-166.
- Tsurusaki, N., Murakami, M. a Shimokawa, K. 1991: Geographic Variation in the Japanese Harvestman, *Gagrellopsis nodulifera*, with special reference to a hybrid zone in Western Honshu, *Zoological Science* 8: 265-275.
- Venkatanarasimhaiah, C. B. a Rajasekarasetty, R. 1965. Contribution to the cytology of Indian scorpions, *Experimentia* 21: 52-154.

- Vignoli, V., Salomone, N., Caruso, T. a Bernini F. 2005. The *Euscorpius tergestinus* (C. L. Koch, 1837) complex in Italy: Biometrics of sympatric hidden species (Scorpiones: Euscorpiidae), *Zoologischer Anzeiger* 244: 97-113.
- Vignoli, V. a Salomone, N. 2008. A review of and additions to the current knowledge of the scorpion genus *Euscorpius* Thorell, 1876 (Scorpiones, Euscorpiidae), *Fragmenta entomologica*, Roma 40: 189-228.
- Vignoli, V., Salomone N., Cicconardi, F. a Bernini, F. 2007. The scorpion of Montecristo, *Euscorpius oglasae* Di Caporiacco, 1950, stat. nov. (Scorpiones, Euscorpiidae): a paleoendemism of the Tuscan Archipelago (northern Tyrrhenian, Italy), *Comptes Rendus Biologies* 330: 113-125.
- Wang, Z. a Yan, H. M. 2001. Technique of chromosome on spider blood cell, *Chinese Journal of Zoology* 36: 45-46.
- Wilcox, T. P., Hugg L., Zeh, J. A. a Zeh, D. W. 1997. Mitochondrial DNA sequencing reveals extreme genetic differentiation in a cryptic species complex of neotropical pseudoscorpions, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7: 208-216.
- Weygoldt, P., 1998. Evolution and systematics of the Chelicerata, *Experimental and Applied Acarology* 22: 63-79.
- Weygoldt, P. a Paulus, H. F. 1979. Untersuchungen zur Morphologie, Taxonomie und Phylogenie der Chelicerata, *Zeitschrift für zoologische Systematik und Evolutionsforschung* 17: 177-200.
- White, M. J. D. 1973. *Animal cytology and evolution*, 3rd edn, Cambridge Univ. Press.
- Wolf, K. W. 1996. The structure of condensed chromosomes in mitosis and meiosis of insects, *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 25: 37-62.
- Zaragoza, J. A., De Mas, E. a Ribera, C. 2007. Pseudoescorpiones del Parque Natural del Cadí-Moixeró (Pirineo Catalán): Estudio ecológico, faunístico y taxonómico (Arachnida: Pseudoescorpiones), *Revista Ibérica de Aracnología* 14: 69-95.
- Zaragoza, J. A. a Štáhlavský, F. 2008. A new *Roncus* species (Pseudoescorpiones: Neobisiidae) from Montseny Natural Park (Catalonia, Spain), with remarks on karyology, *Zootaxa* 1693: 27-40.
- Zeh, J. A., Zeh, D. W. a Bonilla, M. M. 2003. Phylogeography of the harlequin beetle-riding pseudoscorpion and the rise of the Isthmus of Panama, *Molecular Ecology* 12: 2759-2769.

## 12 Přílohy

Tabulka 4

Analyzovaní jedinci rodu *Euscorpius*

jedinec	druh	země	lokality	souřadnice	2n	pohlaví
S1	<i>E. sicanus</i>	Greece	Argalasti	39°12'40.62"S 23°11'55.42"V	66	♂
S2	<i>E. sicanus</i>	Greece	Platamonas	39°58'33.55"S 22°37'31.67"V	66	♂
S3	<i>E. sicanus</i>	Greece	Argalasti	39°12'40.62"S 23°11'55.42"V	66	♀
S4	<i>E. sicanus</i>	Greece	Meteora	39°43'18.50"S 21°38'1.17"V	66	♀
S5	<i>E. italicus</i>	Greece	Vikos	39°54'3.95"S 20°45'20.436"V	36	♂
S6	<i>E. sicanus</i>	Greece	Meteora	39°43'18.50"S 21°38'1.17"V	66	♂
S8	<i>E. italicus</i>	Greece	Vikos	39°54'3.95"S 20°45'20.436"V	36	♂
S9	<i>E. sicanus</i>	Greece	Argalasti	39°12'40.62"S 23°11'55.42"V	66	♂
S10	<i>E. sicanus</i>	Greece	Platamonas	39°58'33.55"S 22°37'31.67"V	66	♂
S11	<i>E. sicanus</i>	Greece	Platamonas	39°58'33.55"S 22°37'31.67"V	66	♂
S12	<i>E. sicanus</i>	Greece	Meteora	39°43'18.50"S 21°38'1.17"V	66	♂
S13	<i>E. italicus</i>	Greece	Vikos	39°54'3.95"S 20°45'20.436"V	36	♂
S15	<i>E. sicanus</i>	Greece	Argalasti	39°12'40.62"S 23°11'55.42"V	66	♀
S16	<i>E. sicanus</i>	Greece	Meteora	39°43'18.50"S 21°38'1.17"V	66	♀
S19	<i>E. tergestinus</i>	Slovenia	Štanjel	45°49'31.26"S 13°50'48.46"V	60	♀
S22	<i>E. concinnus</i>	Croatia	Malá Paklenica	44°17'39.49"S 15°31'15.55"V	88	♂
S23	<i>E. italicus</i>	Croatia	Velká Paklenica	44°30'52.70"S 15°47'26.064"V	36	♂
S24	<i>E. italicus</i>	Croatia	Velká Paklenica	44°30'52.70"S 15°47'26.064"V	36	♂
S25	<i>E. italicus</i>	Croatia	Velká Paklenica	44°30'52.70"S 15°47'26.064"V	36	♂
S30	<i>E. carpathicus</i>	Romania	Beile Herculane	44°53'39.37"S 22°25'31.96"V	90	♂
S33	<i>E. carpathicus</i>	Romania	Beile Herculane	44°53'39.37"S 22°25'31.96"V	90	♂
S35	<i>E. sicanus</i>	France	Corsica	42°2'S 9°0'V	66	♂
S36	<i>E. sicanus</i>	France	Corsica	42°2'S 9°0'V	66	♂
S37	<i>E. sicanus</i>	France	Corsica	42°2'S 9°0'V	66	♀
S42	<i>E. concinnus</i>	France	St. Martin	45°23'S 6°30'V	88	♀
S43	<i>E. concinnus</i>	France	St. Martin	45°23'S 6°30'V	88	♀
S47	<i>E. carpathicus</i>	Romania	Cheile Lotrisorului	45°18'10.95"S 24°16'52.03"V	90	♂
S49	<i>E. italicus</i>	Croatia	Brač island	43°30'17.72"S 16°59'31.144"V	36	♀
S53	<i>E. concinnus</i>	Croatia	Ráb island	44°46'41.33"S 14°41'49.47"V	88	♂
S54	<i>E. italicus</i>	Croatia	Ráb island	44°47'1.435"S 14°40'48.164"V	36	♂
S55	<i>E. italicus</i>	Italy	Verona - Veneto	45°28.93260'S 10°58.81575'V	36	♀
S60	<i>E. italicus</i>	Italy	Verona - Veneto	45°28.93260'S 10°58.81575'V	36	♀
S61	<i>E. tergestinus</i>	Italy	Verona - Veneto	45°28.93260'S 10°58.81575'V	60	♀
S62	<i>E. concinnus</i>	Croatia	Ráb island	44°46'41.33"S 14°41'49.47"V	N	♂
S63	<i>E. italicus</i>	Croatia	Ráb island	44°47'1.435"S 14°40'48.164"V	36	♂
S69	<i>E. italicus</i>	Croatia	Ráb island	44°47'1.435"S 14°40'48.164"V	36	♂
S70	<i>E. concinnus</i>	Croatia	Ráb island	44°46'41.33"S 14°41'49.47"V	88	♂
S71	<i>E. concinnus</i>	Croatia	Ráb island	44°46'41.33"S 14°41'49.47"V	88	♀
S73	<i>E. naupliensis</i>	Greece	Lagadha	36°41'41.44"S 22°27'29.22"V	60	♂
S78	<i>E. naupliensis</i>	Greece	Gorani, Golas	36°55'50.99"S 22°24'42.11"V	60	♀
S79	<i>E. naupliensis</i>	Greece	Gorani, Golas	36°55'50.99"S 22°24'42.11"V	60	♂
S80	<i>E. hadzii</i>	Serbia	Džep	42°45'2.66"S 22° 4'11.19"V	68	♂

#### Tabulka 4

#### Analyzovaní jedinci rodu *Euscorpius* - pokračování

S81	<i>E. concinnus</i>	Italy	Trieste, Basovizza	45°38'6.61"S 13°51'53.54"V	88	♂
S89	<i>E. naupliensis</i>	Greece	Kalidona	37°28'12.64"S 21°43'6.43"V	60	♂
S91	<i>E. concinnus</i>	Italy	Pordenone, Sequals, Lestans	46°9'56.65"S 12°52'42.00"V	88	♂
S93	<i>E. italicus</i>	Turkey	Yason kilisesi	41°08'00"S 37°40'53"V	36	♂
S94	<i>E. hadzii</i>	Albania	Kukës, Çeremi	42°27'48.10"S 19°56'58.04"V	68	♂
S95	<i>E. hadzii</i>	Albania	Kukës, Çeremi	42°27'48.10"S 19°56'58.04"V	68	♂
S97	<i>E. tergestinus</i>	Italy	Loppio	45°51'36.33"S 10°55'24.86"V	60	♂
Jedinci z Genbank						
sicanus 117380710	<i>E. sicanus</i>	Italy	Potenza, Basilicata			
sicanus 117380712	<i>E. sicanus</i>	Italy	Salento, Puglia			
hadzii 124263350	<i>E. hadzii</i>	Romania	Beile Herculane			
carpathicus 124263349	<i>E. carpathicus</i>	Romania	Beile Herculane			
concinnus 117380730	<i>E. concinnus</i>	Italy	Gambassi, Tuscany			
concinnus 117380732	<i>E. concinnus</i>	Italy	Elba Island, Tuscan Archipelago			
concinnus 117380734	<i>E. concinnus</i>	Italy	Lepini Mountains, Lazio			
naupliensis 26190105	<i>E. naupliensis</i>	Greece	Itylo, Lakonia, Peloponnisos			
naupliensis 26190106	<i>E. naupliensis</i>	Greece	Itylo, Lakonia, Peloponnisos			
italicus 124263394	<i>E. italicus</i>	Turkey	Giresun			
balearicus 14595024	<i>E. balearicus</i>	Spain	Mallorca			
tergestinus 117380736	<i>E. tergestinus</i>	Italy	Sistiana, Friuli			
tergestinus 117380737	<i>E. tergestinus</i>	Italy	Siena, Tuscany			
tergestinus 117380738	<i>E. tergestinus</i>	Italy	Roma, Lazio			
tergestinus 117380739	<i>E. tergestinus</i>	Italy	Siena, Tuscany			
mingrelicus 124263346	<i>E. mingrelicus</i>	Turkey	Nigde, Ulukisla			
gamma 9856997	<i>E. gamma</i>	Austria	Carinthia, Koschuta			
alpha 9663059	<i>E. alpha</i>	Italy	Lago d'Iseo, Tavernola			
germanus 9856996	<i>E. germanus</i>	Austria	Carinthia			
flavicaudis 14595029	<i>E. flavicaudis</i>	Italy	Riparbella, Tuscany			
flavicaudis 117380742	<i>E. flavicaudis</i>	Italy	Pianosa, Tuscan Archipelago			
flavicaudis 5689762	<i>E. flavicaudis</i>	France	Vaucluse			

<i>E. concinnus</i> (7 měření)				
	CD	CD SD	A.R	A.R SD
1	4,69	0,15	1,24	0,24
2	4,12	0,38	1,15	0,09
3	3,83	0,20	1,33	0,33
4	3,59	0,15	1,28	0,22
5	3,58	0,26	2,00	0,22
6	3,39	0,21	1,33	0,11
7	3,30	0,21	3,84	1,04
8	3,11	0,18	2,12	0,35
9	3,05	0,34	1,33	0,25
10	2,97	0,14	2,05	0,62
11	2,82	0,21	1,39	0,26
12	2,80	0,20	3,98	0,69
13	2,71	0,11	2,37	0,42
14	2,58	0,19	3,94	0,80
15	2,53	0,23	1,39	0,14
16	2,53	0,09	2,29	0,37
17	2,47	0,21	4,13	0,73
18	2,44	0,21	4,17	0,91
19	2,37	0,21	3,77	0,48
20	2,36	0,19	1,62	0,86
21	2,29	0,10	2,56	0,23
22	2,24	0,21	3,50	0,53
23	2,21	0,08	2,47	0,33
24	2,14	0,10	2,40	0,35
25	2,05	0,07	2,35	0,30
26	2,01	0,26	3,62	0,52
27	1,90	0,11	2,48	0,35
28	1,88	0,30	1,42	0,15
29	1,83	0,31	4,17	0,46
30	1,78	0,28	3,80	0,60
31	1,70	0,21	2,49	0,45
32	1,66	0,13	2,50	0,37
33	1,61	0,19	3,05	0,56
34	1,61	0,24	1,89	0,28
35	1,56	0,27	1,65	0,76
36	1,55	0,31	2,02	0,59
37	1,45	0,21	2,30	0,51
38	1,42	0,25	1,33	0,20
39	1,29	0,24	1,52	0,55
40	1,16	0,10	1,21	0,23
41	1,05	0,12	1,53	0,62
42	0,85	0,06	1,26	0,23
43	0,76	0,10	1,27	0,15
44	0,67	0,10	1,32	0,14

**Tabulka 5**

Souhrnné měření karyotypu *E. concinnus*.  
Relativní velikost chromozomu % (CD),  
poměr ramének (A.R) a směrodatné  
odchylky (CD SD a A.R SD).

<i>E. carpathicus</i> ( 11 měření)				
	CD	CD SD	A.R	A.R SD
1	5,05	0,37	1,39	0,13
2	3,71	0,13	1,49	0,18
3	3,50	0,23	2,00	0,45
4	3,37	0,16	1,26	0,18
5	3,25	0,18	1,48	0,58
6	3,06	0,21	2,49	0,37
7	3,05	0,15	1,33	0,17
8	2,95	0,22	3,71	0,62
9	2,95	0,09	1,73	0,27
10	2,90	0,12	1,90	0,40
11	2,76	0,22	1,53	0,16
12	2,73	0,11	3,69	0,67
13	2,70	0,06	2,54	0,44
14	2,60	0,12	4,11	1,01
15	2,56	0,14	2,39	0,42
16	2,53	0,11	3,84	1,20
17	2,51	0,21	1,29	0,17
18	2,45	0,08	3,88	0,70
19	2,40	0,07	4,06	0,81
20	2,34	0,07	4,07	0,58
21	2,30	0,22	2,57	0,31
22	2,27	0,08	4,03	1,09
23	2,25	0,17	2,68	0,38
24	2,21	0,07	4,04	1,15
25	2,16	0,11	3,56	1,16
26	2,03	0,17	2,34	0,30
27	2,00	0,36	1,55	0,26
28	1,99	0,11	4,40	1,15
29	1,95	0,18	2,91	0,32
30	1,84	0,14	3,67	0,76
31	1,74	0,13	2,95	0,79
32	1,74	0,10	2,12	0,43
33	1,73	0,12	2,09	0,45
34	1,61	0,08	2,27	0,41
35	1,59	0,14	1,25	0,22
36	1,51	0,10	2,01	0,49
37	1,42	0,18	1,74	0,94
38	1,40	0,14	2,11	0,56
39	1,32	0,11	2,02	0,77
40	1,27	0,12	2,02	1,01
41	1,15	0,11	2,05	0,58
42	0,92	0,09	1,11	0,12
43	0,83	0,10	1,24	0,18
44	0,73	0,08	1,30	0,23
45	0,66	0,07	1,51	0,37

**Tabulka 6**

Souhrnné měření karyotypu *E. carpathicus*.  
Relativní velikost chromozomu % (CD),  
poměr ramének (A.R) a směrodatné  
odchylky (CD SD a A.R SD).

<i>E. hadzii</i> (9 měření)				
	CD	CD SD	A.R	A.R SD
1	5,63	0,41	1,35	0,21
2	5,12	0,36	1,27	0,21
3	4,69	0,37	1,32	0,14
4	4,42	0,38	1,31	0,21
5	4,19	0,47	1,84	0,23
6	4,16	0,34	1,30	0,19
7	3,99	0,29	1,47	0,13
8	3,73	0,25	1,31	0,19
9	3,61	0,25	1,43	0,22
10	3,46	0,19	1,37	0,17
11	3,36	0,29	1,98	0,26
12	3,24	0,09	1,36	0,23
13	3,20	0,32	2,06	0,34
14	3,15	0,17	1,38	0,10
15	3,07	0,17	1,39	0,22
16	2,97	0,15	1,39	0,18
17	2,90	0,12	1,48	0,31
18	2,81	0,12	1,37	0,20
19	2,74	0,09	1,42	0,23
20	2,65	0,14	2,17	0,40
21	2,64	0,12	1,29	0,21
22	2,53	0,11	2,05	0,68
23	2,50	0,18	1,40	0,24
24	2,35	0,22	1,32	0,28
25	2,27	0,12	2,41	0,39
26	2,25	0,11	1,96	0,26
27	2,16	0,13	1,40	0,23
28	1,91	0,26	1,32	0,24
29	1,83	0,27	2,05	0,25
30	1,78	0,22	1,34	0,18
31	1,56	0,26	1,28	0,22
32	1,20	0,17	1,28	0,20
33	1,07	0,16	1,18	0,15
34	0,84	0,16	1,11	0,11

**Tabulka 7**

Souhrnné měření karyotypu *E. hadzii*.  
Relativní velikost chromozomu % (CD),  
poměr ramének (A.R) a směrodatné  
odchylky (CD SD a A.R SD ).

<i>E. sicanus</i> (9 měření)				
	CD	CD SD	A.R	A.R SD
1	4,94	0,28	1,26	0,39
2	4,45	0,44	2,59	1,13
3	4,39	0,30	1,30	0,19
4	4,04	0,19	1,14	0,14
5	4,02	0,18	1,69	0,47
6	3,89	0,14	1,43	0,35
7	3,84	0,31	3,89	1,18
8	3,73	0,13	1,38	0,16
9	3,69	0,10	2,10	0,30
10	3,56	0,15	1,22	0,20
11	3,55	0,10	1,97	0,19
12	3,46	0,16	1,64	0,49
13	3,42	0,12	1,97	0,54
14	3,32	0,15	1,40	0,19
15	3,27	0,20	2,85	1,05
16	3,24	0,09	2,25	0,58
17	3,12	0,13	1,55	0,24
18	3,07	0,21	1,94	0,26
19	3,01	0,06	1,76	0,39
20	2,89	0,33	3,78	1,32
21	2,86	0,12	1,46	0,19
22	2,76	0,15	2,20	0,28
23	2,54	0,23	1,29	0,24
24	2,49	0,08	2,15	0,26
25	2,39	0,24	2,90	0,49
26	2,20	0,20	2,07	0,16
27	2,10	0,27	3,19	1,01
28	2,04	0,28	1,93	0,57
29	2,00	0,23	1,79	0,41
30	1,83	0,22	1,45	0,30
31	1,68	0,17	1,25	0,14
32	1,34	0,27	1,55	0,39
33	0,82	0,17	1,31	0,24

**Tabulka 8**

Souhrnné měření karyotypu *E. sicanus*.  
Relativní velikost chromozomu % (CD),  
poměr ramének (A.R) a směrodatné  
odchylky (CD SD a A.R SD ).

<i>E. italicus</i> (9 měření) V.Paklenica				
	CD	CD SD	A.R	A.R SD
1	9,48	0,77	1,40	0,20
2	8,26	0,29	1,25	0,18
3	7,31	0,94	1,50	0,27
4	7,22	0,67	2,27	0,43
5	6,39	0,60	1,42	0,12
6	6,34	0,35	2,22	0,25
7	5,72	0,41	1,96	0,29
8	5,68	0,30	1,29	0,10
9	5,32	0,30	16,05	8,11
10	5,02	0,30	2,60	0,67
11	4,94	0,31	1,45	0,21
12	4,90	0,24	1,32	0,13
13	4,56	0,43	1,70	0,36
14	4,44	0,40	1,24	0,14
15	4,10	0,26	1,27	0,15
16	3,67	0,88	2,12	0,35
17	3,50	0,45	14,65	5,33
18	3,31	0,38	1,31	0,26

**Tabulka 9**

Souhrnné měření karyotypu *E. italicus* (Velká Paklenica). Relativní velikost chromozomu % (CD), poměr ramének (A.R) a směrodatné odchyly (CD SD a A.R SD ).

<i>E. italicus</i> (9 měření) Vikos				
	CD	CD SD	A.R	A.R SD
1	8,29	0,59	1,72	0,35
2	8,00	0,54	1,27	0,14
3	7,90	0,50	1,14	0,15
4	6,56	0,52	1,73	0,35
5	6,06	0,56	1,40	0,16
6	6,05	0,45	1,78	0,21
7	6,00	0,54	2,50	0,46
8	5,82	0,63	15,80	5,09
9	5,59	0,35	1,13	0,06
10	5,42	0,52	2,00	0,25
11	5,33	0,47	1,58	0,35
12	5,02	0,28	1,36	0,10
13	4,62	0,20	1,74	0,43
14	4,48	0,24	1,16	0,08
15	4,18	0,34	1,25	0,18
16	3,62	0,26	2,54	0,86
17	3,56	0,39	19,50	14,13
18	3,31	0,46	1,44	0,16

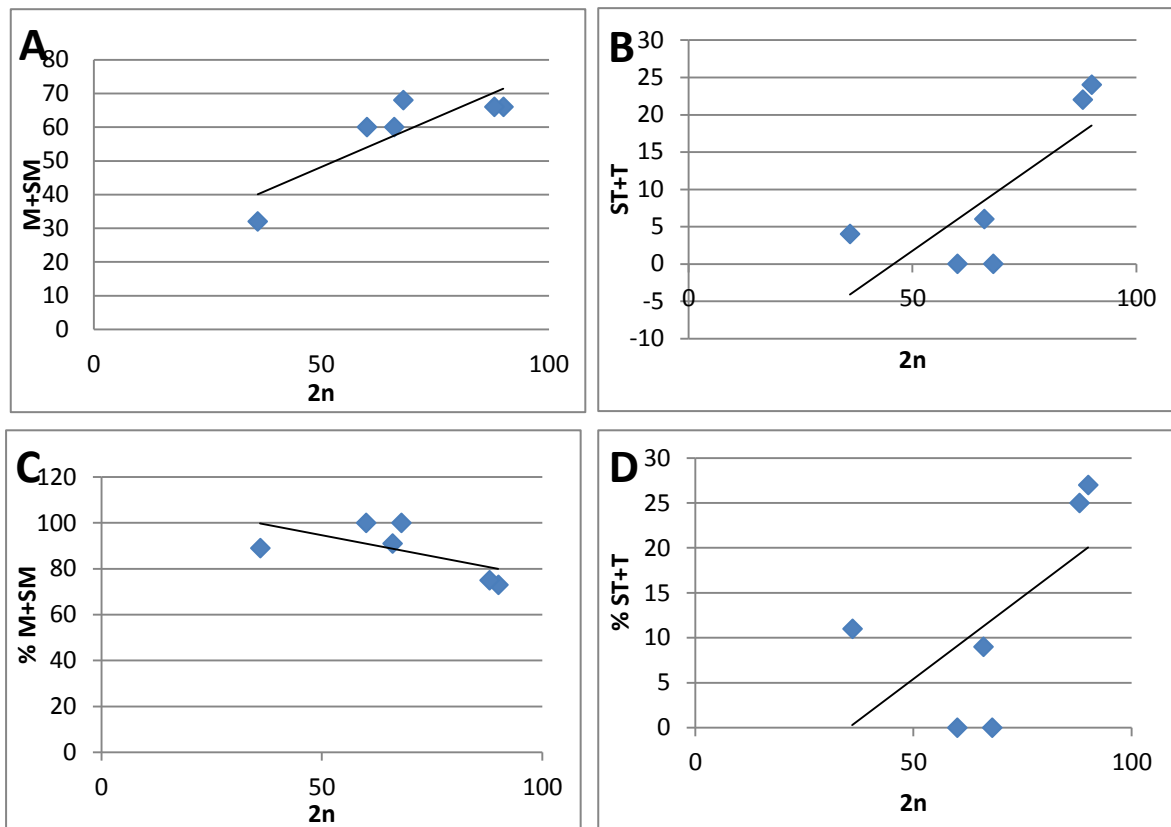
**Tabulka 10**

Souhrnné měření karyotypu *E. italicus* (Vikos). Relativní velikost chromozomu % (CD), poměr ramének (A.R) a směrodatné odchyly (CD SD a A.R SD ).

<i>E. naupliensis</i> (devět měření)				
	CD	CD OD	A.R	A.R OD
1	5,66	0,36	1,35	0,21
2	5,44	0,44	1,63	0,33
3	5,19	0,19	1,26	0,22
4	5,07	0,21	1,22	0,15
5	4,71	0,35	1,55	0,33
6	4,44	0,15	1,31	0,23
7	4,19	0,17	1,79	0,23
8	4,13	0,17	1,25	0,25
9	4,09	0,18	1,64	0,43
10	3,96	0,19	1,32	0,16
11	3,76	0,17	1,35	0,22
12	3,67	0,20	2,11	0,37
13	3,63	0,34	1,24	0,22
14	3,44	0,16	1,18	0,17
15	3,33	0,39	2,29	0,39
16	3,21	0,25	2,19	0,44
17	3,16	0,22	1,19	0,17
18	2,98	0,26	1,20	0,22
19	2,89	0,37	2,41	0,37
20	2,79	0,30	1,28	0,20
21	2,57	0,21	1,28	0,25
22	2,42	0,17	1,34	0,29
23	2,37	0,26	1,97	0,28
24	2,23	0,24	1,28	0,28
25	2,13	0,22	1,39	0,28
26	1,96	0,12	1,27	0,20
27	1,81	0,19	1,36	0,20
28	1,77	0,21	2,19	0,39
29	1,71	0,14	1,21	0,16
30	1,56	0,25	1,26	0,28

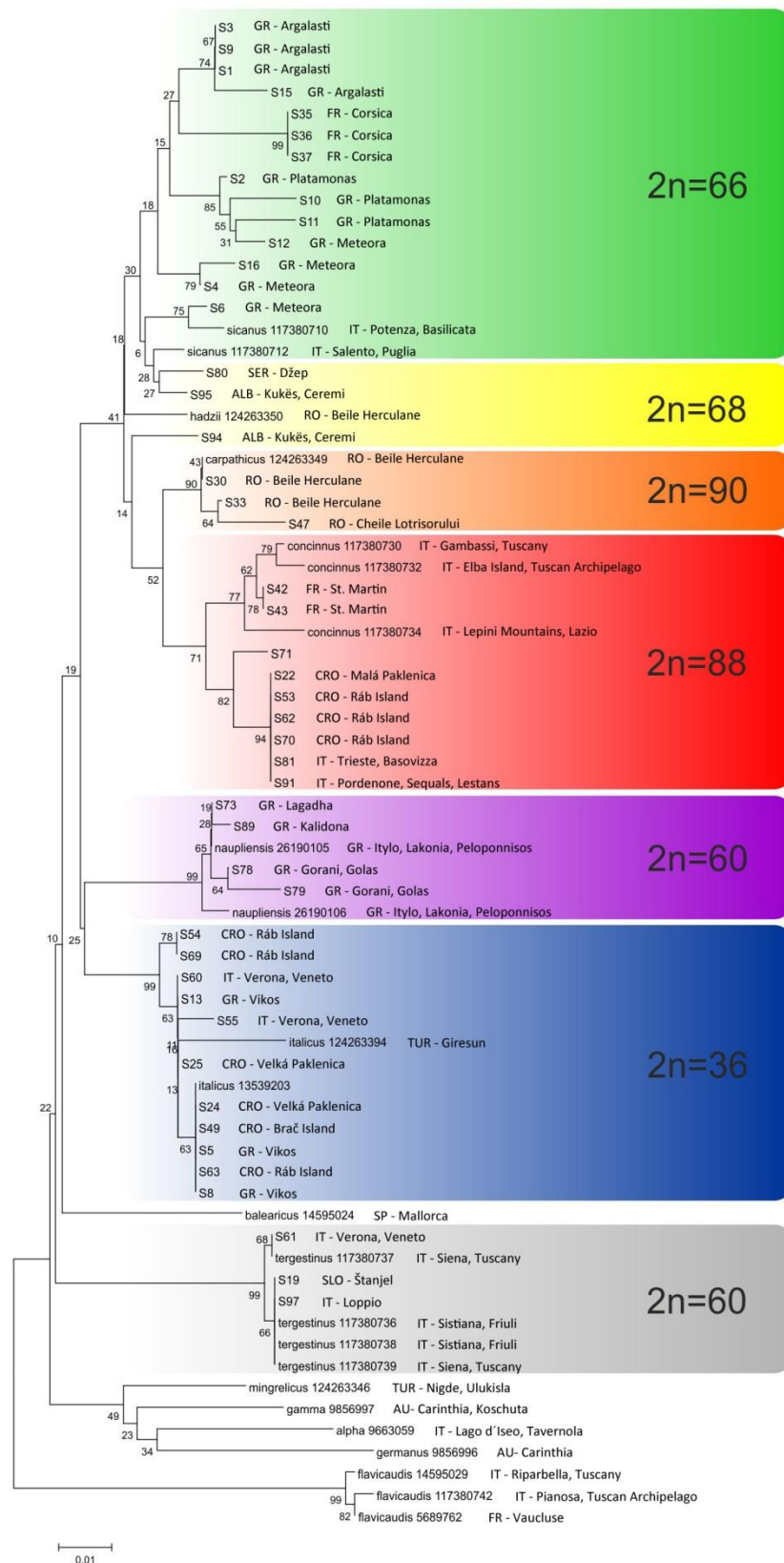
**Tabulka 11**

Souhrnné měření karyotypu *E. naupliensis*. Relativní velikost chromozomu % (CD), poměr ramének (A.R) a směrodatné odchyly (CD SD a A.R SD).



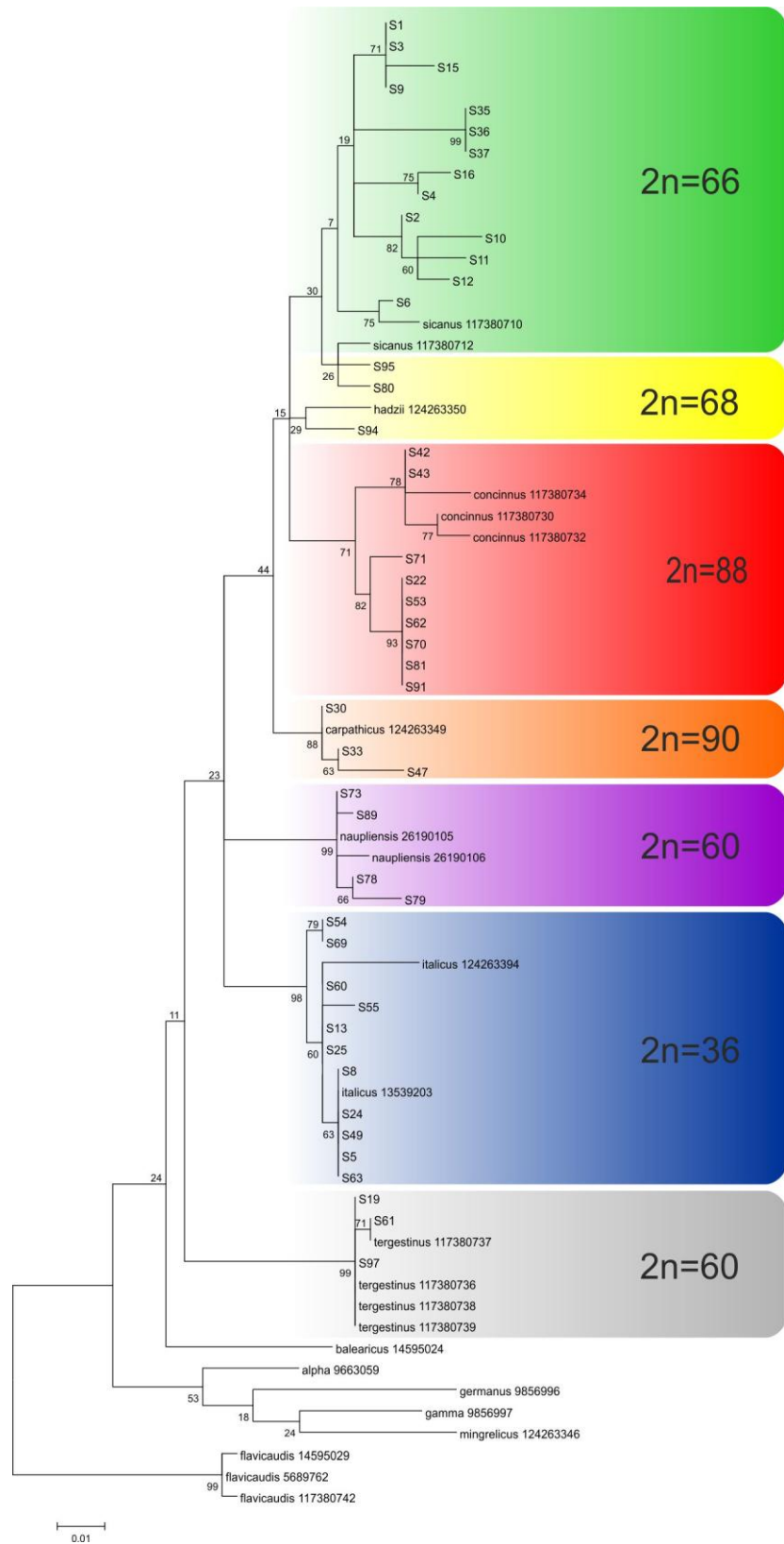
**Obrázek 12**

Zastoupení jednotlivých typů chromozomů v karyotypech vybraných druhů rodu *Euscorpis*. A - poměr M+SM chromozomů v karyotypu a diploidního počtu; B - poměr ST+T chromozomů v karyotypu a diploidního počtu; C - procentuální zastoupení M+SM chromozomů v karyotypu; D - procentuální zastoupení ST+T chromozomů v karyotypu; E - poměr počtu M+SM a počtu ST+T v karyotypu. M - metacentrické, SM - submetacentrické, ST - subtelocentrické, T - telocentrické chromozomy.



**Obrázek 13**

Fylogenetický strom sestavený na základě genu pro 16S rRNA metodou Neighbour-Joining s přidáním diploidními počty chromozomů a lokalitami sběru jedinců. Čísla označují hodnoty bootstrapu při 1000 replikacích. GR - Řecko, FR - Francie, IT - Itálie, CRO - Chorvatsko, SLO - Slovinsko, TUR - Turecko, AU – Rakousko.

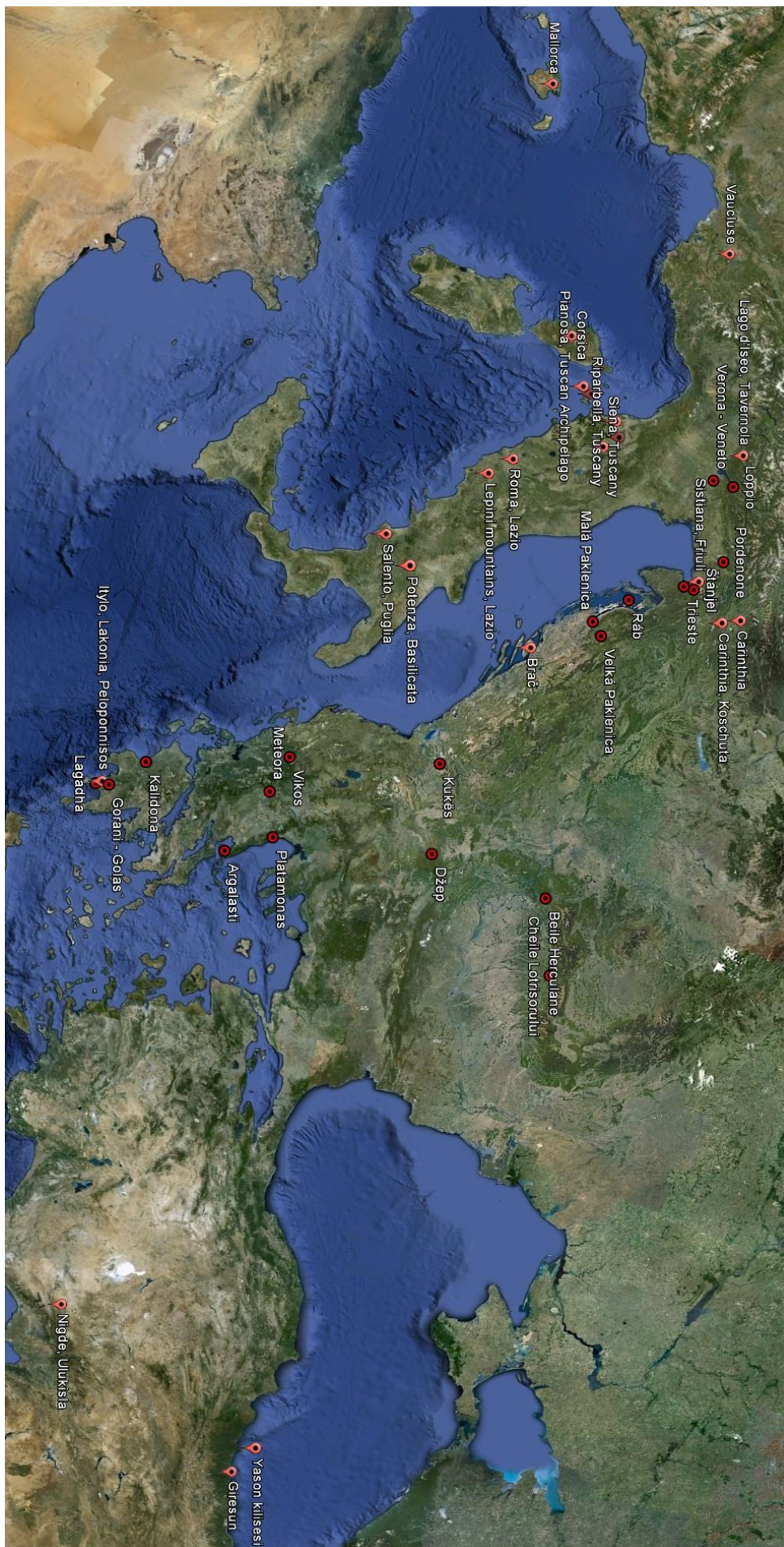


**Obrázek 14**

Fylogenetický strom sestavený na základě genu pro 16S rRNA metodou Maximum Likelihood s přidáním diploidními počty chromozomů. Čísla označují hodnoty bootstrapu při 1000 replikacích.

druh	2n=	M	SM	ST	T
<i>Euscorpius carpathicus</i>	90	26 (29%)	40 (44%)	24 (27%)	0
<i>Euscorpius concinnus</i>	88	36 (41%)	30 (34%)	22 (25%)	0
<i>Euscorpius hadzii</i>	68	52 (76%)	16 (24%)	0	0
<i>Euscorpius sicanus</i>	66	32 (49%)	28 (42%)	6 (9%)	0
<i>Euscorpius naupliensis</i>	60	46 (77%)	14 (23%)	0	0
<i>Euscorpius italicus</i>	36	22 (61%)	10 (28%)	0	4 (11%)

**Tabulka 12** Porovnání morfologických typů chromozomů u analyzovaných druhů rodu *Euscorpius*. V závorce: relativní zastoupení v karyotypu. Vysvětlivky: n= haploidní počet chromozom., M= metacentrický chr., SM= submetacentrický chr., ST= subtelocentrický chr., T= telocentrický chr.



**Obrázek 15**  
 Lokality sběru  
 analyzovaných  
 štírů a jedinců  
 z GenBank.