

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



**Bc. Matěj Kotz**

Karyotypová evoluce u vybraných čeledí entelegynních pavouků  
Karyotype evolution of selected families of entelegyne spiders

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Jiří Král, CSc

Konzultant: Mgr. Martin Forman

Praha, 2020

**Prohlášení:**

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

V Praze, 09.08.2020

---

Matěj Kotz

## **Poděkování:**

Chtěl bych poděkovat svému vedoucímu práce doc. RNDr. Jiřímu Královi, CSc. a konzultantovi mé práce Mgr. Martinovi Formanovi za jejich cenné rady, ochotu a věnovaný čas při psaní této práce, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout. Dále bych chtěl poděkovat Ivalú Macarena Ávila Herrera, M.Sc. za pomoc při práci v laboratoři a Mgr. Evě Lízarové, PhD. a Mgr. Lucii Horové za instruktáž při FCM měření. Poděkování patří také Mgr. Pavel Just, RNDr. Milan Řezáč, Ph.D., MUDr. Kryštof Rückl, Dr. Akio Tanikawa, Dr. Halil Koç, Dr. Niclas Fritzen a Dr. Charles Haddad za dodání pavouků a pomoc při sběru materiálu. Poděkovat bych chtěl dále své rodině, přítelkyni a přátelům za projevenou podporu. Vznik práce byl podpořen grantovými projekty GAUK (č. 166218) a MŠMT (LTAUSA19142).

## Abstrakt

Araneoidea je nadčeledí entelegynních pavouků s obrovskou druhovou diverzitou. Celá nadčeď je však velmi konzervativní, co se pozorovaného karyotypu týče. Pravděpodobně ancestrálním stavem celé skupiny je v případě samců 24 akrocentrických chromozomů s chromozomovým systémem určení pohlaví  $X_1X_20$ . Cílem této práce bylo zmapovat karyotypovou diverzitu dvou čeledí – Araneidae a Mimetidae. Většina studovaných druhů odpovídá svým karyotypem ancestrálnímu stavu. V rámci těchto čeledí bylo však u některých zástupců pozorováno skokové zvýšení počtu chromozomů, u Araneidae až  $2n♂ = 52$ , v případě Mimetidae až na  $2n♂ = 57$ . Což představuje vůbec nejvyšší pozorovaný počet u Entelegynae. Zvýšené  $2n$  je doprovázeno i zvyšováním počtu pohlavních chromozomů, vedoucí až k  $X_1X_2X_3X_40$  u Araneidae, respektive k  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_70$  u Mimetidae. Jako možný mechanismus zvyšování počtu chromozomů navrhuji polyploidii. Tato hypotéza je v práci testována pomocí měření velikosti genomu za použití průtokové cytometrie a fluorescenční in situ hybridizace se sondami pro 18S rRNA a 5S rRNA geny. Pro jeden druh byla optimalizována sonda také pro U2 snRNA gen. U velké části studovaných druhů byly tyto techniky použity vůbec poprvé. V případě čeledi Mimetidae se podařilo odhalit zatím největší genomy v rámci Entelegynae. Všechny sledované parametry sice nedosahovaly očekávaných dvojnásobných hodnot mezi zástupci druhů s ancestrálním, respektive zvýšeným počtem chromozomů, některé z nich však podporují polyploidní hypotézu. Jelikož pohlavní chromozomy jsou často vnímány jako zábrana polyploidních událostí, jsou pavouci se svými unikátními systémy chromozomálního určení pohlaví ideální skupinou pro studium vztahu polyploidie a pohlavních chromozomů. Polyploidie byla v recentní době prokázána u jedné z pavoučích čeledí a je možné, že se v budoucnu povede získat podporu pro tento scénář i u dalších pavoučích skupin.

Klíčová slova: pohlavní chromozomy, karyotypová evoluce, fluorescenční in situ hybridizace, průtoková cytometrie, polyploidie, pavouk

## **Abstract**

The Araneoidea superfamily is a diverse clade of spiders with a great species diversity. The whole superfamily displays considerable conservativeness of observed karyotypes. Most likely ancestral karyotype in males is 24 acrocentric chromosomes with  $X_1X_2$  sex determination system. The goal of this study is to explore the karyotype diversity of two araneoid families – Araneidae and Mimetidae. The majority of studied species exhibit the ancestral karyotype. In some species of the aforementioned families was observed sudden increase in chromosome numbers, up to  $2n♂ = 52$  in Araneidae and up to  $2n♂ = 57$  in Mimetidae. The latter number is the highest chromosome count observed in Entelegynae so far. Increase in  $2n$  goes hand in hand with increase in sex chromosome numbers, leading up to  $X_1X_2X_3X_40$  system in Araneidae and up to  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_70$  in Mimetidae. I suggest polyploidy as a possible mechanism of the increase. To test this hypothesis, I measured the size of the genome using flow cytometry and used fluorescence in situ hybridization for the detection of 18S rRNA and 5S rRNA genes. For one species, probe for U2 snRNA gene was also optimized as part of this thesis. In many species studied, these techniques were used for the first time ever. In the case of the family Mimetidae, the largest genomes in Entelegynae so far were measured. Even though all the measured parameters didn't reach the expected double values between the species with ancestral and increased chromosome number, some of them support the polyploid hypothesis. Sex chromosomes are sometimes seen as an obstacle to polyploid events, spiders with their unique sex chromosome systems are thus ideal group for studying the relationship between polyploidy and sex chromosomes. Polyploidy was recently confirmed in one of the spider families and it is quite possible it could get more support in other spider groups in the future.

Key words: sex chromosomes, karyotype evolution, fluorescent in situ hybridization, flow cytometry, polyploidy, spider

# Obsah

Seznam použitých zkratk.....	3
1. Úvod.....	4
2. Cíle práce .....	5
3. Literární přehled.....	6
3.1. Systematika a diverzita pavouků.....	6
3.1.1. Biologie a systematika Araneidae .....	8
3.1.2. Biologie a systematika Mimetidae .....	9
3.2. Cytogenetika pavouků.....	12
3.2.1. Pohlavní chromozomy pavouků.....	13
3.3. Polyploidie u pavouků a ostatních živočichů.....	14
3.4. Polyploidie a dynamika molekulárních markerů .....	18
4. Materiál a metodika .....	21
4.1. Seznam studovaných druhů.....	21
4.2. Složení použitých roztoků.....	22
4.3. Příprava chromozomových preparátů .....	23
4.4. C – pruhování.....	24
4.5. Vyhodnocení preparátů .....	25
4.6. Fluorescenční in situ hybridizace – FISH .....	25
4.6.1. Příprava sond.....	26
4.6.1.1. Izolace DNA.....	26
4.6.1.2. Příprava sond a jejich značení .....	27
4.6.1.3. Sekvence.....	29
4.6.1.4. FISH .....	30
4.7. Průtoková cytometrie .....	33
5. Výsledky .....	35
5.1. Cytogenetická analýza karyotypu .....	35
5.1.1. Araneidae .....	35
5.1.1.1. C – pruhování.....	46
5.1.2. Mimetidae .....	48
5.2. Metody molekulární analýzy.....	56
5.2.1. FISH.....	56
5.2.2 Průtoková cytometrie .....	71
6. Diskuse.....	75
6.2. Trendy evoluce karyotypu nadčeledi Araneoidea.....	75
6.3. Specifika karyotypové diverzifikace čeledí Araneidae a Mimetidae .....	77
6.4. Evoluce pohlavních chromozomů.....	80

6.5. Organizace rRNA genů .....	82
6.6. Velikost genomu .....	85
7. Závěr .....	86
8. Seznam použité literatury.....	88

## Seznam použitých zkratek

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	páry bazí (base pair)
BP	<i>Bellis perenis</i> (sedmikráska chudobka)
BSA	bovinní sérový albumin
CGH	komparativní genomová hybridizace
COI	podjednotka I cytochrom c oxidázy
CSCP	cryptic sex chromosome pair
Cy3	Cyanin 3 - fluorescenční barvivo
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]oktan
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol
DF	dye factor
DMSO	dimethylsulfoxid
EtOH	ethanol
FISH	fluorescenční in situ hybridizace
gDNA	genomová DNA
H3	histon H3
hox gen	homeotický gen - skupina genů významných v ontogenezi
ITS	internal transcribed spacer
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NOR	nukleolární organizátor jadérka
NTS	non-transcribed spacer
PBS	fosfátový pufr
PCR	polymerázová řetězová reakce
PI	propidium jodid
PS	<i>Pisum sativum</i> (hrách setý)
rDNA	sekvence kódující geny pro rRNA
rRNA	ribosomální RNA
RT	pokojová teplota
SD	směrodatná odchylka
WGD	whole genome duplication



# 1. Úvod

Pavouci (Araneae) jsou kosmopolitně se vyskytující skupinou členovců a zároveň současně nejpočetnějším z třinácti řádů pavoukovců (Arachnida). Krom diverzity druhové vykazují také značnou diverzitu ve velikostech genomů a také diverzitu karyotypu a to zejména morfologie chromozomů a jejich počtu systémů určení pohlaví. Tato genetická diverzita z nich činí ideální modelovou skupinu pro studium evoluce karyotypů a evolučních fenoménů, díky kterým vysoká rozmanitost vznikla.

Jedním z takových jevů je i polyploidie (v zahraniční literatuře často označována zkratkou WGD – whole genome duplication), tedy jev, při kterém je v genomu počet chromozomových sad vyšší než dvě. Dlouhou dobu byl tento fenomén spojován hlavně s evolucí rostlin, v poslední době se ale objevuje stále více prací a důkazů o polyploidizaci u různých živočišných linií a to včetně pavouků (Král et al., 2019).

Hlavním předmětem zájmu této práce jsou dvě čeledi z nadčeledi Araneoidea – Mimetidae a Araneidae. Celá nadčeď Araneoidea je karyotypově poměrně konzervativní a pravděpodobným ancestrálním karyotypem je konstituce  $2n^{\text{♂}} = 24, X_1X_20$  – tedy 11 autozomových párů a dva nehomologní pohlavní chromozomy X ( $X_1$  a  $X_2$ ), přičemž všechny chromozomy mají akrocentrickou morfologii. U některých zástupců Araneidae došlo k poměrně značnému zvýšení celkového počtu chromozomů (Suzuki, 1954; Matsumoto, 1977; Filip Pajpach - diplomová práce, 2018). Chromozomy čeledi Mimetidae jsou až na jeden druh rodu *Ero* zcela neprostudovány (Spider Cytogenetic Database, 2020).

## 2. Cíle práce

Cílem této práce je získat a rozšířit cytogenetická data zástupců dvou čeledí nadčeledi Araneoidea - Mimetidae a Araneidae a navrhnout možné mechanismy hrající roli v průběhu jejich karyotypové evoluce. Vzhledem ke zjištěním možných polyploidizačních událostí u těchto skupin byla zvýšená pozornost věnována testování polyploidizačních hypotéz u vybraných modelových druhů a to metodami klasické a molekulární cytogenetiky a porovnáním velikostí genomů.

Dílními cíli práce je:

- Využitím klasických barvicích technik zjistit počty a morfologii chromozomů včetně určení systémů pohlavní determinace u dosud nestudovaných zástupců čeledí.
- Za použití techniky fluorescenční in situ hybridizace (FISH) zjistit základní trendy distribuce nejpoužívanějších molekulárně cytogenetických markerů - genů pro rRNA (rDNA).
- Objasnit chromozomové změny, které se podílely na evoluci a diverzifikaci karyotypu dvou modelových skupin, kde na základě publikovaných i mnou získaných dat bylo možno předpokládat polyploidizační události a to za použití FISH sond a měření velikosti genomu.

## 3. Literární přehled

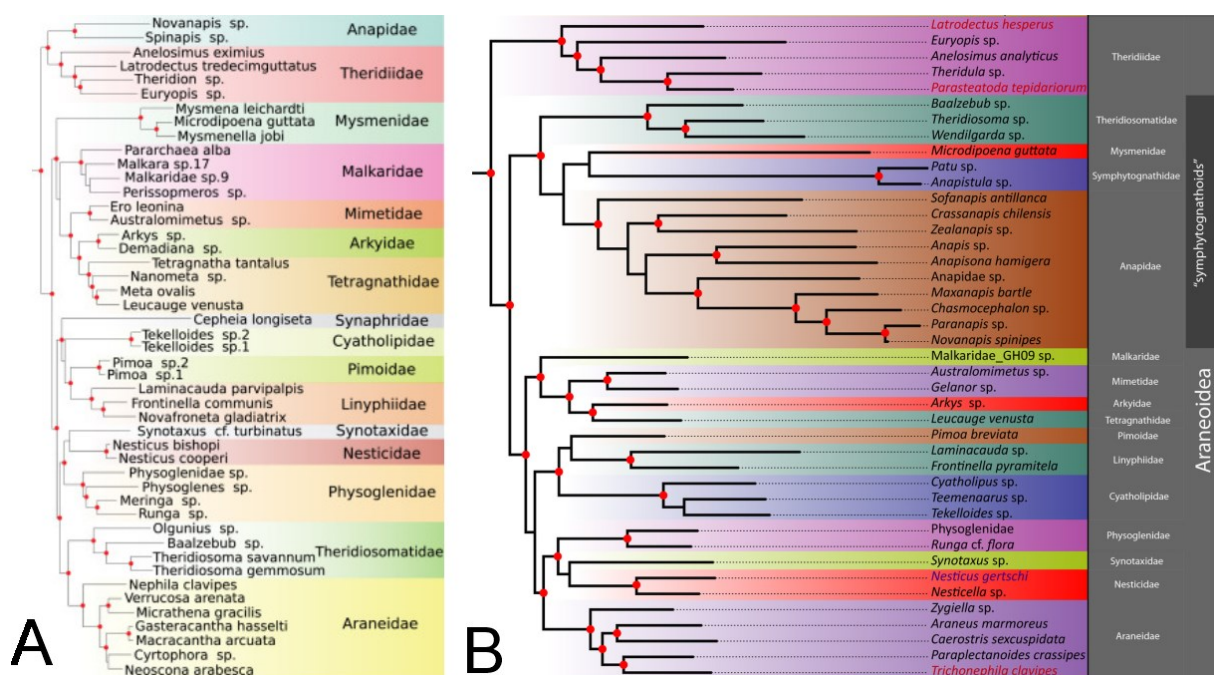
### 3.1. Systematika a diverzita pavouků

Pavouci (Araneae) jsou druhově nejpočetnějším řádem třídy pavoukoců. Podle aktuálních informací zahrnuje tento řád přes 48600 popsaných druhů a toto číslo se stále rozrůstá (World Spider Catalogue, 2020). Stejný zdroj zároveň uvádí 128 popsaných čeledí, ale lze předpokládat, že se i toto číslo bude ještě měnit, vzhledem k nerozřešené fylogenezi některých skupin. Řád Araneae se dělí do dvou podřádů – Mesothelae a Opisthothelae. Mesothelae (sklípkoši) zahrnují jedinou čeleď Liphistiidae (sklípkošovítí). Tato bazální skupina pavouků má zachovanou segmentaci abdomenu a čtyři páry snovacích bradavek, všichni zástupci skupiny jsou endemity východní Asie (Xin et al., 2015). Jedná se o reliktní skupinu čítající 137 druhů (World Spider Catalog, 2020). Opisthothelae se dále dělí na Mygalomorphae (sklípkaní) a Araneomorphae (dvouplicní pavouci). Toto postavení podporují už rané kladistické práce (Platnick et al., 1976), založené však čistě na morfologických charakteristikách, zejména na orientaci chelicer a počtu plicních vaků. Evolučně pokročilejší Araneomorphae se pak tradičně dělí na Haplogynae a Entelegynae podle komplexity stavby kopulačního ústrojí (Platnick et al., 1991). Více než 80% druhové diverzity pavouků pak náleží do skupiny Entelegynae, kde nejpočetnější linie jsou: RTA clade a Araneoidea. K rozřešení pavoučí systematiky se fenotypových, respektive morfologických dat využívá poměrně často, jako příklad může sloužit struktura reprodukčních orgánů, shrnuto například v Michalik et al. (2014), ale jde dnes už hlavně o rozřešení systematiky na nižší úrovni a největší posun tak v dnešní době přirozeně zaznamenávají přístupy založené na metodách molekulární fylogeneze. Haplogynae jakožto sesterskou skupinu k Entelegynae nepodporují relativně nedávné transkriptomické studie (Garrison et al., 2016) a místo toho jako sesterskou řadí skupinu Leptonetidae. Toto postavení zčásti podporuje i Wheeler et al. (2017), ačkoliv

monofýlie Leptonetidae nebyla v této studii potvrzena a jako sesterská skupina k Entelegynae je zde podle autorů společná skupina zahrnující část Leptonetidae a Austrochiloidea. Práce Wheeler et al. (2017) je zatím jednou z nejrozsáhlejších recentních prací studující fylogenezi pavouků na několika cílových genech. Tým pracoval s datasetem 932 druhů spadajících do 115 čeledí. Celá analýza byla vyhotovena s pomocí 6 genů - třech mitochondriálních a třech jaderných. Práce Fernández et al., (2018) a Kulkarni et al., (2020) jsou založené hlavně na fylogenomických přístupech.

Hlavním předmětem zájmu této práce je nadčeleď Araneoidea, která byla po dlouhou dobu řazena společně s Deinopoidea do společné skupiny Orbiculariae, tedy pavouků tvořících si primárně síť kruhového tvaru. Monofýlie této skupiny je však v dnešní době prakticky vyvrácena, jelikož ji nepodporuje naprostá většina recentních molekulárně fylogenetických prací (Wheeler et al., 2017; Garrison et al., 2016; Kulkarni et al., 2020). Ohledně postavení Araneoidea vůči Nicodamoidea, Deinopoidea a RTA kladu se stále vedou diskuse. Podle větší části recentních prací je Araneoidea sesterskou skupinou skupiny Nicodamoidea (Wheeler et al., 2017; Dimitrov et al., 2017; Fernández et al., 2018). Wheeler však zmiňuje, že tato topologie má v jejich práci poměrně nízkou podporu. Podle Kulkarni et al. (2020) je Araneoidea sesterskou skupinou společné linie všech 3 ostatních zmíněných skupin, na jejich bázi přitom stojí Nicodamoidea a Deinopoidea a RTA jsou vzájemně sesterské.

Samotná nadčeleď Araneoidea je extrémně diverzifikovanou skupinou (viz. Obrázek 1) a zahrnuje zhruba něco kolem 25% současné pavoučí diverzity (Dimitrov et al., 2017). Vzhledem k její obrovské rozmanitosti zde vztahy mezi jednotlivými čeleděmi nebudou rozebrány dopodrobna, jelikož stěžejním tématem této práce jsou pouze dvě její čeledi – Araneidae a Mimetidae. Rámcově ji však lze definovat jako entelegynní pavouky tvořící si síť, z dalších početných skupin se sem řadí například: Theridiidae (snovačkovití), Tetragnathidae (čelistnatkovití) či Lyniphiidae (plachetnatkovití), které jsou notoricky známou součástí české araneofauny (Kůrka et al., 2015).



Obrázek 1 – dva různé pohledy na fylogenezi skupiny Araneioidea; (A) Fernández et al. (2018) (B) Kulkarni et al. (2020)

### 3.1.1. Biologie a systematika Araneidae

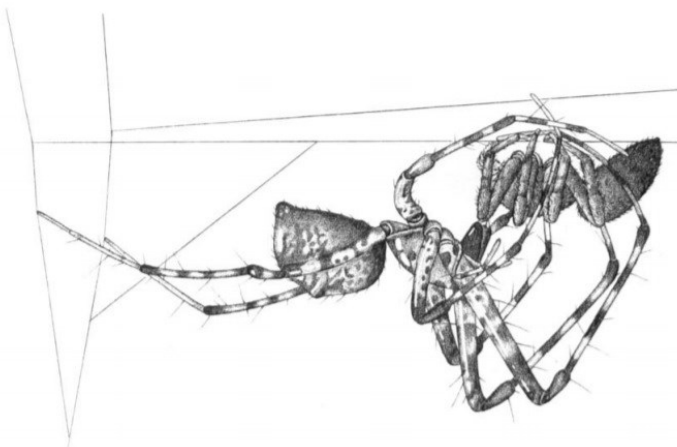
Araneidae - Křížákovití jsou kosmopolitně rozšířeni a co do počtu druhů třetí nejpočetnější čeleď pavouků, čítající přes 3000 druhů a 178 rodů (World Spider Catalogue, 2020). Svůj anglický název - orb-weavers nesou podle charakteristických kulatých sítí, které využívají k lovu potravy. Velmi častý je zde také poměrně výrazný sexuální dimorfismus, kde samice jsou podstatně větší než samci (Hormiga et al., 2000). V některých případech je tak výrazný, že může znesnadňovat taxonomickou identifikaci (Magalhaes et al., 2017). I přesto, že je tato čeleď notoricky známá i mezi laickou veřejností, je množství známých cytogenetických i molekulárně fylogenetických dat stále velmi nízké.

Fylogeneze skupiny zůstává dodnes problematická a z velké části nevyjasněná. Nejnovější fylogenetická studie Scharff et al. (2020), provedena na dvou mitochondriálních (COI a 16S rRNA) a třech jaderných genech (28S rRNA, 18S rRNA, histon H3), poskytuje základní členění pro tuto skupinu. Autoři ve studii vymezují 3 monofyletické linie se silnou podporou – I. Zygiellinae na samotné bázi celé čeledi (v souladu s předešlými studiemi – například Gregorič et al., 2015), II. Nephilinae + rod

*Paraplectanoides* a III. k celé této skupině sesterská skupina pracovně autory pojmenována jako ARA clade zahrnující všechny ostatní křížákovité. Zde se však situace dále komplikuje, jelikož vnitřní fylogeneze mnoha rodů zůstává nejasná. Zvláště fylogeneze rodu *Araneus*, který je hlavním předmětem zájmu této práce, je nerozřešená a rod je očividně polyfyletický. Autoři poukazují, že k uspokojivé analýze by bylo potřeba více fylogenomických dat, při velikosti čeledi je to však v dohledné době prakticky nemožné.

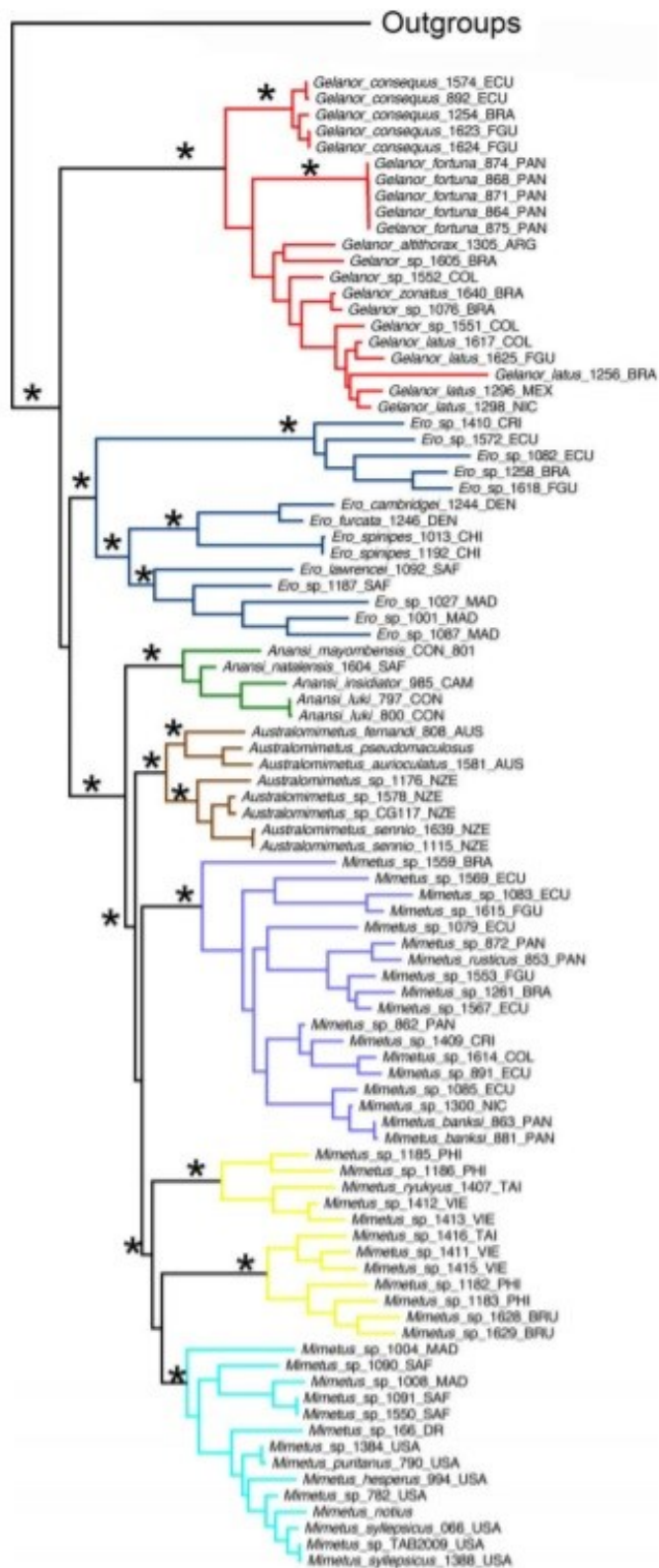
### 3.1.2. Biologie a systematika Mimetidae

Mimetidae – ostníkovití jsou menší skupinou araneoidních pavouků, čítající podle nejnovějších dat 8 rodů zahrnujících zhruba 154 druhů (World Spider Catalogue, 2020). Ostníci jsou potravní specialisté, jedná se totiž o skupinu převážně araneofágních pavouků. K lovu své kořisti netkají sítě, naopak napadají jiné pavouky v jejich sítích, kde využívají agresivních (Peckhamovských) mimikrů. Svým pohybem vytváří vibrace na síti, čímž imitují potenciální chycenou kořist, v některých případech dokonce napodobují námlouvací rituály lovených pavouků (Jackson a Whitehouse, 1986). Z tohoto chování je také odvozen jejich anglický název „pirate spiders“. Podle studie Kloock (2001) jsou nejčastější kořisti ostníků pavouci z čeledi Theridiidae (snovačkovití) a jako častou potravu je zmiňují i jiné práce (Jackson a Whitehouse, 1986). Jejich český název – „ostníci“ je odvozen od výrazných trnů, kterými jsou pokryty tibie a metatarsy jejich končetin, obzvláště přední dva páry. Tyto trny tvoří jakýsi „koš“ sloužící k chycení a udržení kořisti (Jackson a Whitehouse, 1986; Harms a Harvey, 2009) (viz. Obrázek 2). Historicky bylo debatováno zařazení Mimetidae do nadčeledi Palpimanoidea (Coddingtonaraujo, 2005), s čeledí Palpimanidae je pojí araneofagní způsob života,



Obrázek 2 – Ostník držící lapenou kořist, první tři páry nohou pokryté ostny, tvoří jakýsi koš sloužící k imobilizaci kořisti (Jackson a Whitehouse, 1986)

všechny recentní fylogenetické studie se ale shodují na zařazení Mimetidae jako skupiny sesterské ke společné skupině Arkyidae a Tetragnathidae (Wheeler et al., 2017; Benavides et al., 2017). Benavides et al. (2017) je také první rozsáhlou studií zkoumající vnitřní fylogenezi skupiny na základě molekulárních dat (dva jaderné ribozomální geny - 18S a 28S rDNA, dva mitochondriální ribozomální geny 12S a 16S rDNA a dále pak histon H3 a 1. podjednotka cytochrom c oxidázy – CO1) viz. Obrázek 3. Autoři získali podporu pro monofýlii rodů *Gelanor*, *Ero*, *Anansi* a *Australomimetus*. Monofýlie rodu *Mimetus* se autorům nepodařila dokázat žádným analytickým přístupem, upozorňují však, že některé větší linie v rámci rodu vycházely konzistentně i při použití různých přístupů.



Obrázek 3 – Vnitřní fylogeneze čeledi Mimetidae vyhotovena na základě Bayesianké analýzy 6 genů (18S, 28S, 12S, 16S, H3, CO1) zahrnuto je 7 z 8 rodů – jedince rodu *Arocha* se nepodařilo nasbírat a tudíž v analýze chybí. Černé hvězdičky značí posteriorní pravděpodobnost mezi 0.95 a 1.00. (Benavides et al., 2017)



### 3.2. Cytogenetika pavouků

Krom druhové diverzity jsou pavouci také charakterističtí obrovskou cytogenetickou komplexitou. Za evolučně původní se u nich považuje vysoký počet chromozomů (Suzuki, 1954). Vysoké počty chromozomů lze najít jak u Mesothelae ( $2n♂ = 80-96$ ) (Suzuki, 1954), tak u Mygalomorphae ( $2n♂ = 14-128$ ) (Král et al., 2013). V karyotypové evoluci Araneomorphae pak docházelo spíše k redukci počtu chromozomů oproti výše zmíněným skupinám (Král et al., 2006). U Haplogynae je rozsah počtu chromozomů na první pohled obrovský -  $2n♂ = 9-152$ . Tento rozsah je však způsoben přítomností polyploidní čeledi Caponiidae, pro kterou jsou typické obrovské genomy a vysoké diploidní počty chromozomů ( $2n♂ = 55-152$ ) (Král et al., 2019). Výjimečnou skupinou je také čeleď Dysderoidea, která je Caponiidae blízce příbuzná (možná se jedná i o vnitřní skupinu Caponiidae) a u které se vyvinuly holokinetické chromozomy (Král et al., 2006; Diaz et al., 2010; Král et al., 2019). U zbylých čeledí Haplogynae je rozsah počtu chromozomů typicky nižší ( $2n♂ = 9-33$ ) a morfologicky jde většinou o malé submetacentrické či metacentrické (Král et al., 2006, Král et al., 2019; Paula-Neto et al., 2017; Araujo et al., 2020).

Entelegynae jsou karyotypově poměrně konzervativní skupinou ( $2n♂ = 10-52$ ), obecný trend v karyotypové evoluci této skupiny je snižování diploidního počtu chromozomů (Šťáhlavský et al., 2020). Průměrný diploidní počet chromozomů je v případě této skupiny  $2n♂ = 27$  a morfologicky jde v naprosté většině případů o chromozomy jednoramenné, akrocentrické s vzácným výskytem chromozomů dvouramenných (Kořínková a Král, 2013; Šťáhlavský et al., 2020; Spider Cytogenetic Database, 2020). V takovém případě jde často o chromozomy vzniklé centrickou fúzí, kde dochází k takzvanému „all or nothing“ fenoménu, kdy sfúzí všechny akrocentricky v daném karyotypu (Rowell, 1990; Gorlova et al., 1997; Král et al., 2011; Stávale et al., 2011). Tento fenomén se vyskytuje i u zástupců v této práci studované čeledi Araneidae. Byl pozorován u některých zástupců rodů *Zygiella* a *Larinioides* a je dopodrobna rozebrán v diplomové práci F. Pajpacha (2018). Výjimečnou situací je změna morfologie chromozomů pomocí pericentrických inverzí (Stávale et al., 2010).

Za původní stav u Entelegynae bývá považováno 42 chromozomů (Král et al. 2006), v jednotlivých skupinách pak dochází k redukci počtů chromozomů při zachování jejich akrocentrické morfologie (Suzuki, 1954). Možnými mechanismy těchto redukcí

mohou být tandemové fúze postupné translokace nebo centrické fúze následované inverzí (Šťáhlavský et al., 2020).

### 3.2.1. Pohlavní chromozomy pavouků

Další pozoruhodnou kapitolou pavoučí cytogenetiky jsou chromozomové systémy určení pohlaví. Ancestrálním je s největší pravděpodobností  $X_1X_20$  systém (Suzuki, 1954), což je specifický systém samčí heterogametrie kde samci mají konstituci pohlavních chromozomů  $X_1X_2$  a samice  $X_1X_1X_2X_2$  a 0 znamená absenci chromozomu Y. Tento systém se však v evoluci mnoha skupin modifikoval, například u Mygalomorphae můžeme u samců najít až 13 různých X chromozomů. Ke změnám počtu pohlavních chromozomů docházelo mnoha různými způsoby jako jsou rozpady či fúze chromozomů, v úvahu připadají i nondisjunkce pohlavních chromozomů (Kořínková a Král, 2013; Araujo et al., 2012). Pozorovány byly i fúze X chromozomů s autozomy vytvářející tzv. neopohlavní chromozomy (Maddison, 1982; Král, 2007). Předpokládanou fúzí dvou X chromozomů vznikl u některých skupin  $X0$  systém a u dalších skupin se také objevuje chromozom Y, Systém  $X_1X_2Y$  je dlouhodobě konzervován a je pravděpodobně ancestrálním stavem pro několik čeledí Haplogynae (Král et al., 2006; Král et al., 2020). Y se dále objevuje u skupin s neopohlavními chromozomy, jelikož po fúzi gonozomu s autozomem vzniká chromozom Y právě z původního homologního autozomu (Král, 2007; Král et al., 2013; Maddison et al., 2013).

Mimo přítomnosti diferencovaných pohlavních chromozomů Král et al. (2011) předpokládají také přítomnost morfologicky uniformního páru XY (CSCP – cryptic sex chromosome pair) na základě specifického chování v samičí meioze a ultrastrukturních studií samčí meiozy (Král, 2007; Král et al., 2011). Molekulárně cytogenetické analýzy předpokládají jeho nízkou míru diferenciacce (Sember et al., 2020). Tento chromozomový pár je detekovatelný pomocí specifického chování v premeiotickém dělení u sklípkanů (Král et al., 2011; Král et al., 2013). Ačkoliv podle některých představ by se mohl vyskytovat u všech pavouků, u skupiny Entelegynae se jej nepodařilo konvenčními metodami odlišit.

Rozmanité systémy určení pohlaví lze nalézt hlavně u Mygalomorphae a Haplogynae. Entelegynae jsou v tomto ohledu stejně jako v celkovém rozsahu počtu chromozomů poměrně konzervativní skupinou a u většiny se vyskytuje  $X_1X_20$  systém. U

některých skupin se však vyskytuje i  $X_0$  a systémy  $X_1X_2X_3$  a poměrně vzácně i  $X_1X_2X_3X_4$ , oba zmíněné pravděpodobně vznikly nondisjunkcí (Kořínková a Král, 2013), review všech popsanych pohlavních systémů pavouků a diskuse o možných mechanismech jejich vzniku je zpracována v Araujo et al., (2012).

Přesný mechanismus determinace pohlaví u pavouků stále není znám (Cordellier et al., 2020), je proto důležité podrobit dalšímu výzkumu sekvence identifikované na pohlavních chromozomech, které se s rozvojem sekvenačních a bioinformatických přístupů teprve recentně daří identifikovat (Bechsgaard et al., 2019).

### 3.3. Polyploidie u pavouků a ostatních živočichů

Polyploidie je fenomén známý už od počátku první poloviny 20. století – například DeVries (1915), Muller (1925). Polyploidie se v literatuře nejčastěji dělí podle původu na dva základní typy – autopolyploidie vzniklá duplikací jednoho původního genomu a allopolyploidie vzniklá kombinací dvou nebo více geneticky divergentních genomů (např. po hybridizaci). Vzhledem k výskytu nadpočetných chromozomových sad je fixace polyploidních linií problematická, jelikož musí být zajištěny správné mechanismy rozchodu chromozomů v meioze. Další překážkou může být jiná dávka genové exprese a epigenetická nestabilita duplikovaných sad (Comai, 2005).

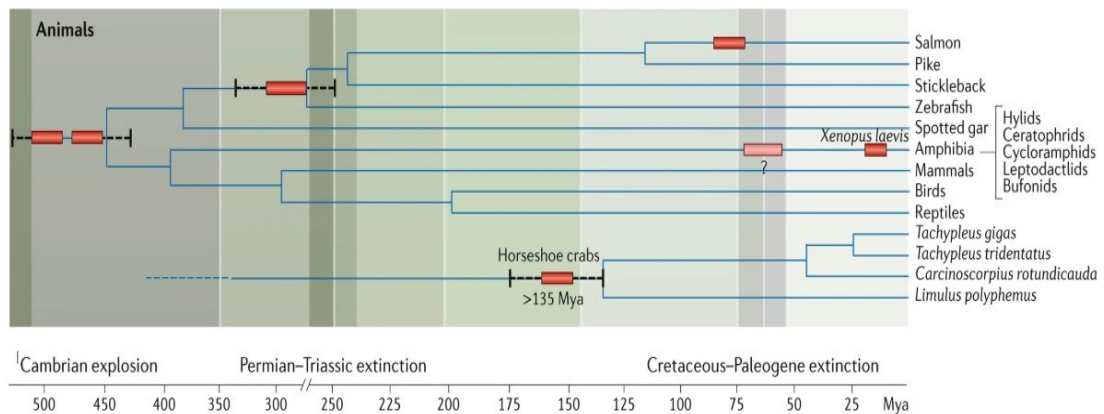
Mimo své negativní implikace s sebou však polyploidie přináší i určité výhody. Příkladem může být heterózní efekt polyploidních hybridů a větší buněčná i tělesná velikost v důsledku vyššího obsahu DNA (Edger a Pires, 2009). Nejzásadnější je však genová redundance, jelikož nadbytečné kopie genů vzniklé polyploidizací mohou mutovat bez zásadního vlivu na životaschopnost organismu (Van De Peer et al., 2017). Po duplikaci mohou nastat tři základní scénáře – 1) jeden z genů nahromaděním škodlivých mutací zcela ztratí svou funkci, případně dojde k jeho deleci - nonfunkcionalizace 2) jeden z duplikovaných genů získá novou, evolučně výhodnou funkci - neofunkcionalizace 3) funkce původního genu se rozdělí mezi oba vzniklé paralogy a zachovány jsou oba – subfunkcionalizace (Lynch a Connery, 2000). O retenci genů po polyploidizaci a jejich mechanismech toho zatím víme poměrně málo, velká část studií zabývajících se tímto tématem je provedena na rostlinných modelech. Studie Roulin et al., (2013) prováděná na příkladu *Glycine max* (sója luštinatá) ukazuje, že rychlost s jakou dojde k subfunkcionalizaci genů může přispívat k retenci vzniklých

paralogů, jelikož rozdělení funkce genu mezi obě kopie vyvolává selekční tlak pro zachování obou kopií. Autoři dodávají, že subfunkcionalizace se jako proces značně urychlí, pokud probíhá na úrovni genové exprese oproti modelu, který počítá s jejím vznikem skrz mutace. Tato studie také ukazuje, že subfunkcionalizace je pravděpodobně nejčastější scénář a může být předběžným krokem pro neofunkcionalizaci, která je poměrně vzácná a evolučně se jedná o pomalý proces. K podobným závěrům došli i He a Zhang (2005).

Genetická plasticita mohla polyploidním liniím pomoci se adaptovat na měnící se prostředí a důkazem toho by teoreticky mohla být možná časová spjitost některých paleopolyploidních a extinkčních událostí (Van De Peer et al., 2017) (viz. Obrázek 4). Stále nové důkazy o polyploidních událostech nám přináší moderní sekvenační metody umožňující rychlou sekvenaci celých genomů a transkriptomů.

Vědci, kteří se této problematice věnovali si také velmi brzy všimli, že je polyploidie výrazně častější u rostlin než u živočichů. Tato problematika je ve větším rozsahu blíže rozebrána v Mable (2004) a byla také předmětem mé bakalářské práce – (Kotz, 2017). Do dnešní doby bylo formulováno několik hypotéz snažících se rozdíly ve frekvenci výskytu mezi rostlinnými a živočišnými taxony vysvětlit. Vůbec poprvé se problematice frekvence výskytu polyploidie u různých skupin organismů věnoval Muller ve své práci z roku 1925 a tvrdil, že polyploidie naruší proces determinace pohlaví u živočichů, jejichž pohlaví závisí na poměru gonozomů ku autozomům, jak je to například u *Drosophila*. Toto samotné tvrzení je sice správné, systém determinace pohlaví závisící na poměru X:A však není u živočichů častý. Další autoři navazující na Mullerovu práci navrhovali, že polyploidie narušuje kompenzaci genové dávky na pohlavních chromozomech (Orr, 1990), toto by mělo být dáno hlavně degenerací alozomu u heterogametických jedinců daného pohlaví. Obě hypotézy jsou pro problematiku této práce alespoň z části relevantní a to právě kvůli unikátnímu systému pohlavních chromozomů a determinace pohlaví, který můžeme u pavouků najít. Jak ukazují studie Král, (2007) a Král et al. (2011), existují modifikace v samičí meióze pavouků, které zabraňují výměně genetické informace mezi jednotlivými gonozomy. Tento mechanismus podle autorů pravděpodobně umožnil vznik pohlavních systémů  $X_1X_2X_3$  a  $X_1X_2X_3X_4$ . Chromozomy jsou v průběhu profáze I inaktivovány a tento mechanismus tedy zabraňuje rekombinaci mezi homeologickými chromozomy a podporuje tím jejich vzájemnou diverzifikaci. Tento mechanismus tedy pomáhá zabezpečovat správné párování pohlavních chromozomů během meiozy a potenciálně tím

usnadnit případnou polyploidizaci.



Obrázek 4 – Polyploidizační události v rámci živočišných taxonů (Van De Peer et al., 2017)

Dnes je už dobře známo, že polyploidie sehrála v evoluci živočichů významnou roli a problémem je hlavně její obtížná detekce, která je navíc tím obtížnější, čím je polyploidní událost starší, jelikož po polyploidizaci dochází v genomu k zásadním přestavbám a mnohdy k delecím duplikovaných úseků (review v Kotz – bakalářská práce, 2017). V případě obratlovců jsou paleopolyploidizační události zdokumentovány a všeobecně přijímány jako platné evoluční hypotézy již několik desetiletí, od doby, kdy Susumu Ohno v roce 1970 publikoval svou knihu o genové duplikaci. V evoluci obratlovců dnes reflektujeme dvě paleopolyploidní události na počátku vývoje obratlovců – obecně známé jako 2R hypotéza. Další pak byly detekovány u kostnatých ryb Teleostei a v linii lososovitých ryb – Salmonidae (Van De Peer et al., 2017). Další příklady polyploidních obratlovcích taxonů mohou být jeseteři, dále pak některé skupiny plazů a obojživelníků (Otto a Whitton, 2000; Vasil’ev, 2008). Debata dodnes probíhá také kolem hlodavce *Tympanoctomys barrerae*, který má největší genom ze všech savců. Jelikož vykazuje zhruba dvojnásobný počet chromozomů i velikost genomu oproti nejbližšímu příbuznému, byl Gallardo et al. (2006) klasifikován jako allotetraploid. Tento závěr potvrzují i Suárez-Villota et al. (2012), kteří genom zmíněného druhu testovali pomocí CGH.

V případě bezobratlých jsou doloženy případy recentní polyploidie u korýšů (Yacobi, 2006), hmyzu (Tsutsui et al., 2008; Milani et al., 2009) i dalších skupin, vzhledem k obrovské diverzitě těchto skupin je však množství známých cytogenetických dat o nich nedostačující pro to, abychom si mohli udělat skutečný obraz o výskytu polyploidie napříč jednotlivými skupinami (Gregory a Mable, 2005). První dobře

doloženou paleopolyploidní událostí v rámci bezobratlých taxonů lze najít v práci Flot et al. (2013), šlo však o skupinu třídy pijavenky z kmene vírníků, která je velmi atypická kompletní absencí pohlavního rozmnožování a meiózy.

V případě samotného podkmene klepítkačů pak studiem paralogních sekvencí hox genů bylo zjištěno, že k polyploidizaci došlo ve větvi zahrnující všechny tři v dnešní době žijící rody ostrorepů, tedy skupině sesterské pavoukvcům (Kenny et al., 2016). Tato událost je podle autorů nejméně 135 milionů let stará. Nejnovější studie provedena Nong et al. (2020), prorovnávací počet kopií a klastrů jednotlivých hox a parahox genů a dále také některých microRNA úseků ukazuje, že u linie ostrorepů došlo až k třem kolům polyploidizace a že k některým došlo nejspíš ještě v linii společného předka hrotnatců a pavoukvců. S hox geny pracovali také Schwager et al. (2017), kteří komparativní genomickou analýzou snovačky *Parasteatoda tepidariorum* a štíra *Centruroides sculpturatus* zjistili, že sdílí společnou polyploidizační událost, starou pravděpodobně cca 450 milionu let a sdílenou tedy celým kladem Arachnospulmonata (Scorpiones, Araneae, Amblypygi, Uropygi, Schizomida). Konzervace jednotlivých klastrů a míra pozorované syntenie paralogních sekvencí ukazují právě na polyploidizaci, kterou navíc podporují i rozdíly v expresi jednotlivých paralogů, které naznačují, že v jejich vývoji došlo k neo-, či subfunkcionalizaci. Dalším zajímavým pozorováním je specifická situace u roztoče *Haemaphysalis longicornis*, kde partenogenetická metapopulace normálně diploidního druhu vykazuje triploidní karyotyp (Chen et al., 2014). Na možnou polyploidii u sekáčů v rámci skupiny Laniatores poukazuje Schneider et al., (2009) ačkoliv není jasné, zda ke změnám počtu chromozomů nedošlo skrze rozpady a následné přestavby.

Král et al. (2013) spekulovali o možné polyploidii uvnitř skupiny sklípkanů - Mygalomorphae. Studie Král et al. (2019) pak prokázala polyploidizaci haplogynních pavouků čeledi Caponiidae, jelikož počty chromozomů u těchto pavouků zdaleka převyšují počty u jim nejbližší příbuzných skupin a velikost jejich genomu je vyšší než u všech ostatních pavouků.

S poslední zmíněnou studií tak vyvstává otázka, jak polyploidizace ovlivňuje velikost genomu. V souvislosti s velikostí genomu se nejčastěji používá C-hodnota, která udává obsah DNA v pikogramech v nezreplikovaném haploidním jádře. Ačkoliv by se dalo teoreticky předpokládat, že by velikost genomu polyploidního organismu odpovídala zhruba příslušnému násobku velikosti diploidního předka v případě autopolyploidie, či součtu velikostí mateřských genomů v případě allopolyploidie,

dochází po polyploidizační události v genomu k významným přestavbám a delecím v procesu který se označuje jako zpětná diploidizace (Wolfe, 2001). Studie Leitch a Bennett (2004) ukazuje, že u krytosemenných rostlin po polyploidizaci dochází častěji k snížení obsahu DNA oproti diploidnímu předkovi než ke zvýšení. Toto snižování se obecně označuje jako genomický downsizing.

### 3.4. Polyploidie a dynamika molekulárních markerů

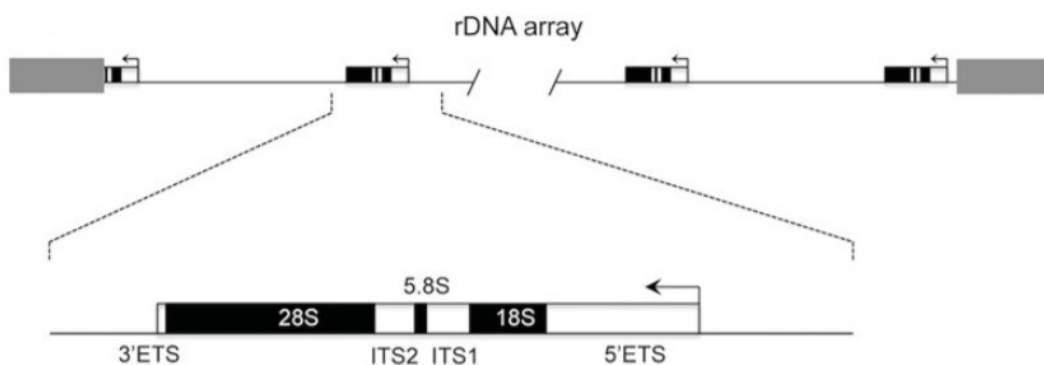
Jak bylo již zmíněno výše, po polyploidii dochází k reorganizaci genomu a mechanismy a povaha proběhlých přestaveb se dají odvozovat sledováním vhodných genetických markerů. Počet a lokalizace jednotlivých genů či genetických klastrů může být zásadně odlišný od diploidního předka. Jedním z takových markerů jsou nukleolární organizátory jadérka (NOR). NOR jsou části chromozomů obsahující tandemové repetice genů pro rRNA (rDNA) – 28S, 5.8S, 18S rRNA, které jsou základními stavebními jednotkami eukaryotických ribozomů. Organizace tandemových repetic je napříč eukaryotickými organizmy velmi konzervovaná (viz. Obrázek 5) a prepisované jednotky jsou vzájemně odděleny NTS jednotkami (non-transcribed spacer). Velkou podjednotku ribozomu dále tvoří 5S rRNA. Gen který ji kóduje, ale není součástí NOR a nachází se často v jiné oblasti genomu, ve srovnání s NOR je kódující oblast tohoto genu je menší a vyskytuje se v nižším počtu tandemových repetic (D'Hont, 2005). V případě člověka jsou NOR situovány na krátkých raménkách akrocentrických chromozomů.

Některé NOR během interfáze tvoří strukturu zvanou jadérko. To následně zaniká během profáze a v telofázi se znovu formuje (McStay, 2016). Jadérek v samotném jádru může být několik a jsou to místa, kde probíhá prepis rDNA do pre-rRNA, která je následně sestřihem obsažených spacerů přeměněna na hotovou rRNA, která se podílí na stavbě ribozomálních podjednotek. NOR se mohou vyskytovat i na pohlavních chromozomech, což je pozorovatelné hned u několika skupin pavouků (Kráal et al., 2011). Jejich přítomnost pak také může napomáhat správnému párování pohlavních chromozomů (Stitou et al., 1997; McKee a Karpent, 1990).

U pavouků je také známý případ nárůstu v počtu NOR v důsledku ektopických rekombinací u slíďáka *Wadicosa fidelis* až na deset loci (Forman et al., 2013). Většina dosud studovaných entelegynních pavouků má však nižší počet NOR (1-4) (Rincão et al. 2017; Šťáhlavský, 2020). I přes relativně velký rozsah počtu NOR je jejich poloha u

Entelegynae velmi konzervativní a je omezena na distální (vzdálenější od centromery) konec dlouhého raménka (Forman et al., 2013). NOR na pohlavních chromozomech byly u Entelegynae dosud detekovány pouze stříbřením (viz. níže) a to u Tetragnathidae (Král et al., 2011) a Nephilinae (Araujo et al., 2015). U Haplogynae jsou oproti tomu NOR na pohlavních chromozomech častější (Král, 2006). Zajímavá situace je i u sklípkanů kdy NOR mohou zabírat většinu raménka (Král et al., 2013).

Goodpasture a Bloom (1975) zjistili, že díky specifickým proteinům vyskytujícím se v oblasti jádřerka je možno tyto struktury specificky barvit dusičnanem stříbrným ( $\text{AgNO}_3$ ). Protokol pro běžné cytogenetické použití pak následně zdokonalili Howell a Black (1980). Fontana ve své studii (1994) využil barvení  $\text{AgNO}_3$  pro identifikaci NOR u polyploidních linií jeseterů. Ryby jsou zde rozděleny do dvou skupin podle počtu chromozomů – druhy se 120 chromozomy a druhy s 240-250 chromozomy. Druhá zmíněná skupina přitom vykazovala dvakrát větší počet NOR než skupina s méně chromosomy (8:4).



Obrázek 5 – schéma NOR repetice u člověka, sekvence je ve stejné podobě konzervována u všech eukaryot. ITS a ETS jsou internal a external transcribed spacers, celá transkripční jednotka je přepisována vcelku polymerázou I a v jádřerku dále editována (McStay, 2016)

Zajímavým jevem je v tomto kontextu také takzvaná nukleolární dominance, kdy epigeneticky dochází k silencingu kopií NOR z jednoho mateřského genomu u hybridů – allotetraploidů. Tento jev byl pozorován například u allotetraploidní linie *Arabidopsis thaliana* x *Cardaminopsis arenosa* ve studii Chen et al. (1998). Studie Reeder a Roan (1984) popisuje tento jev také u hybridů *Xenopus laevis* x *Xenopus borealis*, kde docházelo k silencingu rRNA genů *Xenopus borealis*, jelikož v promotoru těchto genů se u *Xenopus laevis* nacházelo víc enhancerů vázajících transkripční faktory.

Pro vizualizaci NOR či 5S rDNA je vhodná technika fluorescenční in situ hybridizace –



FISH. Tuto metodu pro identifikaci počtu signálů u předpokládaných diploidních a polyploidních linií použil např. D'Hont (2005). Ačkoliv bylo v této studii objeveno u polyploidních linií více repetic, než u jejich diploidních příbuzných, byl zde podle autora trend k redukci některých lokusů.

Studie Qin et al. (2010), prováděná na kódující oblasti 5S rDNA genu a přilehlé NTS sekvenci (nontranscribed spacer) ukazuje, že u tetraploidních hybridů *Carassius auratus* red Var X *Megalobrama amblycephala* se ze čtyřech parentálních typů 5S rDNA objevují u tetraploidní linie tři, jeden je deletován a dále se objevuje nový typ, lišící se v sekvenci NTS. Autoři se domnívají, že takovéto přestavby mohou allopolyploidnímu druhu pomáhat v úspěšné divergenci od parentálních druhů a mohou napomáhat jeho fertilitě.

Jak geny pro NOR, tak 5S rDNA, jsou spolu s geny pro histony a podjednotky RNA spliceozomů (snRNA) vhodné a nejčastěji využívané cytogenetické markery. Kvůli jejich častému uspořádání v mnoha po sobě jdoucích repeticích, se jejich klastry mnohem snáze vizualizují kvůli síle pozorovaného signálu při aplikaci FISH. Jejich použití pro studii evoluce živočišných karyotypů lze doložit hned několika studiemi (např. Cabral-de-Mello et al., 2011; Utsunomia et al., 2014; Sochorová et al., 2018)

## **4. Materiál a metodika**

### **4.1. Seznam studovaných druhů**

V této práci bylo analyzováno 16 druhů čeledi Araneidae, u 12 z nich byly stanoveny základní karyotypové vlastnosti, u 4 druhů vůbec poprvé, u ostatních druhů byl karyotyp revidován, případně doplněn o molekulární data. U 8 druhů byl změřen poměr pohlavních chromozomů. Velikost genomu byla změřena u 9 zástupců rodu *Araneus*, z toho u 8 poprvé. V práci jsem dále analyzoval 8 druhů čeledi Mimetidae, u 6 z nich jsem stanovil základní karyotypové vlastnosti, z toho u všech druhů vůbec poprvé.

U 7 druhů čeledi byla změřena velikost genomu, jedná se o první data o velikosti genomu této čeledi vůbec - viz. Tabulka 1.

Studovaný druh	Lokalita	Provedené techniky
<b>Araneidae</b>		
<i>Araniella cucurbitina</i>	ČR (Lednice)	KA, FISH (18S)
<i>Eriophora</i> sp.	Austrálie (Hornsby park)	KA, FISH (18S)
<i>Gibbaranea bituberculata</i>	Severní Makedonie (Katlanovo)	KA, FISH (18S)
<i>Cyclosa conica</i>	Itálie (Foresta di Mercadante)	KA, FISH (18S)
<i>Nuctenea umbratica</i>	ČR (Veselí n. Lužnicí)	KA, FISH (18S)
<i>Singa</i> sp.	Severní Makedonie (Katlanovo)	KA
<i>Araneus diadematus</i>	ČR (Pardubice)	KA, CB, FCM
<i>Araneus marmoreus</i>	ČR (Lednice)	KA, FISH (18S)
<i>Araneus quadratus</i>	ČR (Suchdol n. Odrou)	FCM
<i>Araneus nordmanni</i>	ČR (Horská Kvilda), Finsko (Vaasa)	FCM
<i>Araneus saevus</i>	ČR (Horská Kvilda)	FCM
<i>Araneus alsine</i>	ČR (Horská Kvilda)	FCM
<i>Araneus uyemurai</i>	Japonsko (Utatsu)	KA, CB, FISH (18S), FCM
<i>Araneus angulatus</i>	Albánie (Butrint), ČR (Kokořínsko)	KA, FISH (18S,5S), FCM
<i>Araneus ventricosus</i>	Japonsko (Tokio)	KA, CB, FISH (18S), FCM
<i>Araneus grossus</i>	Severní Makedonie (Katlanovo)	KA, FCM
<b>Mimetidae</b>		
<i>Ero aphana</i>	ČR (Praha; Velvary)	KA, FISH (18S,5S,U2), FCM
<i>Ero tuberculata</i>	ČR (Praha)	KA, FCM
<i>Ero cambridgei</i>	Severní Makedonie (Katlanovo)	FCM
<i>Ero</i> sp.	JAR (Bloemfontein)	FCM
<i>Mimetus laevigatus</i>	Turecko	KA, FCM
<i>Mimetus</i> sp.	Namibie (Etosha)	KA, FISH (18S,5S)
<i>Mimetus</i> sp.	JAR (Bloemfontein)	KA, FISH (18S, 5S), FCM
<i>Mimetus</i> sp.	USA	KA, FISH (18S), FCM

Tabulka 1 – seznam studovaných druhů, jejich lokalit a aplikovaných metod; KA – karyotypová analýza, CB – C- banding, FISH – fluorescenční in situ hybridizace, FCM – průtoková cytometrie (flow cytometry)

#### 4.2. Složení použitých roztoků

- Fyziologický roztok Ephesita (Lockwood, 1961): 0.15M NaCl; 5.6mM KCl, 2.4mM NaHCO<sub>3</sub>; 3mM CaCl<sub>2</sub>;

pH=7.0

- Hypotonizační roztok: 0,075 M KCl (Sigma Aldrich)
- Giemsa barvicí roztok: 5% Giemsa (Merck) v modifikovaném Sørensenově pufru (0.033M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0.013M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O; pH = 6.8)
- 2x SSC pufr: 0.3M NaCl; 0.03M C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Na<sub>3</sub> · 2H<sub>2</sub>O; pH=7.0
- Blokační roztok bovine serum albumin (BSA, frakce IV, GmbH): 2,5% BSA ve 4x SSC
- 5x Denhartovo reagens: 0,1% (v/v) Ficoll (typ 400); 0,1% (v/v) polyvinylpyrolidin; 0,1% (v/v) BSA
- 1x PBS pufr: 0.015M NaCl, 0.015 M KCl, 0.015M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.015M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O; pH= 7.3
- DABCO antifade: 0,21M 1,4- diazabicyclo[2.2.2]oktan; 1M Tris- HCl (pH= 8.0); 0.9% (v/v) glycerol
- Fluormix: 0.25mM dATP; 0.25mM dCTP; 0.25mM dGTP; 0.17mM dTTP; 0.2mM značených dUTP (biotin-16-UTP, Sigma Aldrich) - značené biotinem
- 1x TAE elektroforezní pufr: 40 mM Trizma Base (Sigma-Aldrich), 20 mM kys.octová, 1 mM EDTA (pH= 8.3)
- Otto pufr I: RNáza (50 µg/ml), 0.1 M monohydrát kyseliny citronové, 0.5 % (v/v) Tween 20, doplnit H<sub>2</sub>O do 200 ml, přídavek barviva DAPI/PI (4 µg/ml), filtrovat přes 0.22 µm filtr
- Otto pufr II: RNáza (50 µg/ml), 0.4M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, doplnit H<sub>2</sub>O do 200 ml, přídavek barviva DAPI/PI (4 µg/ml), filtrovat přes 0.22 µm filtr

Seznam použitých komerčních kitů:

DNeasy (Qiagen)

PPP mix (Top Bio)

Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)

Qubit dsDNA BR Assay Kit (ThermoFisher Scientific)

BioNick Labeling system (Invitrogen)

### 4.3. Příprava chromozomových preparátů

Pro přípravu chromozomových preparátů byly ve většině případů použity samčí gonády, v některých případech také srdce a střevo nebo vaječníky. Pavouk se před

samotnou pitvou imobilizoval umístěním do  $-20^{\circ}\text{C}$ , většinou po dobu 3-5 minut podle velikosti jedince. Celá pitva následně probíhá pod stereomikroskopem. Hlavohrud' se propíchně entomologickým špendlíkem a pomocí něj se pavouk zafixuje v pitevní misce vyplněné voskem a zalité předchlazeným fyziologickým roztokem typu Ephesita. Další špendlík je poté použit k fixaci zadečku a následně je pomocí pitevních nůžek přerušena stopka mezi ním a hlavohrudí. Zadeček je následně rozstřížen a pomocí pinzet jsou opatrně vypreparovány požadované orgány, které jsou ihned přeneseny do misky s hypotonickým roztokem. V případě malé velikosti pavouka je možné přenést celý rozstřížený abdomen. Hypotonizace pak probíhá 14-25 minut v závislosti na velikosti tkáně. Po hypotonizaci se tkáň přenáší do fixáže Ethanol (p.a. Sigma Aldrich) + kyselina octová (glacial, Sigma Aldrich) (3:1). Fixuje se po dobu 10 minut, poté je tkáň přenesena do čerstvé fixáže, kde se fixuje dalších 20 minut, případně déle. V případě preparátů pro C-pruhování bylo použito fixativum methanol (p.a., Sigma Aldrich) + kyselina octová (3:1). Kousek tkáně je pak přenesen pomocí pinzety na čisté podložní sklíčko a následně zakápnut 3-5 kapkami 60% kyseliny octové. Tkáň je poté rozmělněna pomocí skleněných tyčinek zakončených wolframovým drátkem. Preparát je následně přenesen na histologickou ploténku předeřátou na  $40^{\circ}\text{C}$  (teplota snížena na  $35^{\circ}\text{C}$  v případě preparátů pro C pruhování), kde je pomocí tyčinek s drátkem kapka roztírána dokud se téměř nevypaří, zbylá kapka obsahující vesměs pouze nečistoty je poté ze sklíčka oklepnuta. Sklo je následně buď dehydrováno ve vzestupné alkoholové řadě (70%, 80% a 96% ethanol, vždy 1 minuta) a po oschnutí uskladněno v ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) pro pozdější použití nebo barveno v Giemsa barvicím roztoku (27 minut, RT).

#### **4.4. C – pruhování**

Metoda C-pruhování patří mezi selektivní pruhovací techniky a byla poprvé vyvinuta a použita Pardue a Gall (1970) na myších chromozomech. V principu metoda působením zásady umožňuje silnější barvitelnost konstitutivního heterochromatinu při následném barvení preparátů. Během buněčného cyklu je pro úseky konstitutivního heterochromatinu charakteristická časná kondenzace a pozdní replikace (Lui et al., 2012), v oblastech jeho výskytu se také často nachází satelitní DNA a úseky jsou transkripčně umlčeny.

Skla v této práci byla zpracována podle následujícího protokolu: Preparáty jsou

kvůli tzv. „agingu“ umístěna na jednu hodinu do inkubátoru při teplotě 60°C. Skla jsou následně po dobu 45 minut inkubována v 0,1 N HCl, kde dojde k rozvolnění chromatinu. Skla jsou následně omyta destilovanou vodou a 2,5 hodiny ponechána schnout. Následně se připraví nasycený roztok Ba(OH)<sub>2</sub> v deionizované H<sub>2</sub>O, který se rozlije do kyvet umístěných ve vodní lázni (50°C). Na hladině se obvykle vysráží povlak Ba(OH)<sub>2</sub>, který je nutno z hladiny odstranit tamponem buniny. Poté jsou do roztoku vložena skla na 3-5 minuty. Preparáty jsou následně omyty v teplé (37°C) destilované vodě pro dokonalé odstranění povlaku Ba(OH)<sub>2</sub>. Skla jsou poté opět ponechána schnout po dobu 2,5 hodiny. Skla jsou poté na 75 minut umístěna do 2xSSC (60°C), kde dochází k rekonstituci chromatinu a po následném promytí destilovanou vodou a oschnutí je možno je barvit Giemsa barvicím roztokem. Oproti standardnímu barvení se skla po C-pruhování musí barvit delší dobu (75 minut, RT).

#### **4.5. Vyhodnocení preparátů**

Skla barvená Giemsou a skla s C-pruhováním byla pozorována a vybrané figury byly foceny na mikroskopu Olympus BX50, vybaveném digitální kamerou Olympus DP71, pod imerzním objektivem planAPO 100x. Fotky byly snímány pomocí programu Olympus Cell<sup>^</sup>D. Chromozomy byly proměřeny ručním modem programu ImageJ (LOCI, University of Wisconsin). Ke stanovení poměru pohlavních chromozomů bylo použito minimálně 5 diakinezí/metafází I. Morfologie chromozomů byla stanovena na základě pozorování metafází II. Karyogramy byly konstruovány u vybraných druhů pomocí programu CorelDRAW 2020 (Corel Corporation).

#### **4.6. Fluorescenční in situ hybridizace – FISH**

Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) představuje jednu z klíčových cytogenetických metod, umožňující vizualizaci konkrétních sekvencí na chromozomovém preparátu. V této práci byly použity biotinem značené sondy pro sekvence kódující geny organizované v repeticích (18S rRNA, 5S rRNA, U2 snRNA). Postup práce zahrnoval izolaci celogenomové DNA, PCR amplifikaci cílových úseků a jejich kontrolní sekvenaci, značení sond biotinem a samotnou FISH. Pro přípravu 18S rDNA sondy byl použit fragment rutinně používaný na pavouky kolegy z naší laboratoře

ze stepníka *Gandanameno* sp., který jsem dále naznačil. Zbylé sondy jsem připravil *de novo* z gDNA cílových nebo jim blízké příbuzných druhů.

## **4.6.1. Příprava sond**

### **4.6.1.1. Izolace DNA**

Vzorky pavoučí tkáně pro izolaci DNA byly po pitvě skladovány v 96% EtOH. Genomová DNA byla izolována pomocí sady DNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN). Ze vzorku bylo odebráno  $\leq 25$  mg tkáně (většinou nohy) a byla vložena do sterilní mikrozkušavky a rozstříhána na menší kousky. Zkušavka byla následně umístěna do termobločku (37°C) s otevřeným víčkem, aby došlo k úplnému odpaření ethanolu, který může blokovat lysis. Ke tkáni bylo následně přidáno 180  $\mu$ l ATL pufru a 20  $\mu$ l proteinasy K (20mg/ml). Celá směs se pak nechala inkubovat při 56°C na míchacím termobločku (Eppendorf) dokud se tkáň úplně nerozložila. Poté bylo přidáno 200  $\mu$ l AL pufru a směs byla inkubována po dalších 10 minut (56°C). Po ukončení inkubace se ke vzorku přidalo 200  $\mu$ l 96% ethanolu a celá směs byla přenesena do filtrační kolony (DNeasy mini spin column), kolonka byla umístěna do 2 ml sběrné zkušavky a centrifugována při 6000 g po dobu 1 minuty. Sběrná zkušavka je následně vyhozena a nahrazena čistou, na kolonku je následně nanese 500  $\mu$ l AW1 pufru a vzorek je znovu centrifugován při 6000 g po dobu 1 minuty. Sběrná zkušavka je vyhozena a nahrazena čistou, na kolonku se nanese 500  $\mu$ l AW2 pufru a vzorek je centrifugován při 14000 g po dobu 1 minuty. Sběrná zkušavka je následně vyhozena a nahrazena sterilní mikrozkušavkou a na kolonku je nanese 200  $\mu$ l elučního AE pufru a vzorek je centrifugován při 6000 g po dobu 1 minuty. Tím dochází k eluci izolované DNA. Kvalita izolované DNA byla elektroforeticky ověřena na 1-2% agarosovém gelu. Koncentrace DNA byla proměřena na fluorimetru Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific).

#### 4.6.1.2. Příprava sond a jejich značení

Marker	Zdroj gDNA	Primery a jejich sekvence	Ideální teplota nasedání	Reference
18S rRNA	<i>Gandanameno</i> sp.	F: CGAGCGCTTTTATTAGACCA R: GGTTCACCTACGGAAACCTT	56°C	Forman et al. (2013)
5S rRNA	<i>Araneus grossus</i>	F: GCCAACGTCCATACCAAYGYTGA R: AAGCCAACGNACGYGGT	56°C	Hladová (2015)
5S rRNA	<i>Ero aphana</i>	F:GCCAACGTCCATACCAAYGYTGA R: AAGCCAACGNACGYGGT	56°C	Hladová (2015)
U2 snRNA	<i>Ero aphana</i>	F: ATCGCTTCTCGGCCTTATG R: TCCCGGCGGTACTGCAATA	56°C	Bueno et al. (2013)
H3	<i>Ero aphana</i>	F: TANGCACGYTCNCCNCGGAT R: ATGGCNCGTACNAARCARAC	-	Entomologický ústav AV ČR
28S rRNA	<i>Ero aphana</i>	F: GACCCGTCTTGAAACACGGA R: TCGGAAGGAACCAGCTACTA	-	Whiting et al. (1997)
5S rRNA	<i>Araneus marmoreus</i>	F: GCCAACGTCCATACCAAYGYTGA R: AAGCCAACGNACGYGGT	-	Hladová (2015)

Tabulka 2 – tabulka použitých sond pro FISH, zdroj gDNA udává druh pavouka, jehož DNA byla použita pro značící PCR a přípravu sondy, červeně vyznačené jsou neúspěšně testované sady primerů, které nebyly použity kvůli nedostatku produktu na kontrolním gelu

Pro přípravu nových sond bylo použito existujících primerů, designovaných v jiných pracech. Izolovaná celogenomová DNA byla použita jako templát pro PCR reakci (viz. Tabulka 2). PCR reakce byla připravována standardně na 25 µl (viz. Tabulka 3). Pro amplifikaci byl používán LifeECO Thermal Cycler (BIOER). Po proběhnutí reakce bylo z PCR produktu odebráno 1-3 µl vzorku, který byl nanesen na 1-2% agarosový gel pro kontrolní vizualizaci průběhu reakce. Optimální podmínky PCR reakce byly testovány při gradientu annealingové teploty 51°C - 60°C, v některých případech také přidáním PCR enhanceru (TopBio) či DMSO4 (TopBio). Při pozitivním výsledku byl následně zbylý objem nanesen na gel a cílový produkt byl purifikován vyříznutím. Případně, pokud na kontrolním gelu nebyly patrné jiné proužky kromě předpokládaného cílového produktu, byl fragment purifikován přímo z PCR reakce. Purifikace byla v obou případech prováděna kolonkovou metodou na Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up



System (Promega) podle následujícího protokolu – k PCR produktu bylo přidáno stejné množství Membrane Binding Solution, v případě vyřezávání produktu z gelu bylo přidáno zhruba 150  $\mu$ l tohoto roztoku a gel byl inkubován při 60°C v třepacím termobločku, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění. Protokol je následně stejný jak pro PCR produkt, tak pro izolaci fragmentu z gelu. Směs je přenesena na filtr kolonky umístěné ve sběrné zkumavce. Vzorek je následně centrifugován po dobu 1 minuty při 14000 g. Proteklá kapalina ze sběrné zkumavky se následně vyprázdní a do zkumavky se vrátí kolonka na kterou se nanese 700  $\mu$ l Membrane Wash Solution k promytí vzorku. Vzorek se opět centrifuguje po dobu 1 minuty při 20000 g a proteklá kapalina ze sběrné zkumavky se opět vyprázdní. Promývání se následně opakuje s 500  $\mu$ l Membrane Wash Solution za stejných podmínek. Sběrná zkumavka je následně opět vyprázdněna a po vrácení kolonky do zkumavky se ještě jednou centrifuguje 1 minutu při 14000 aby došlo k vyloučení zbylého promývacího roztoku. Sběrná zkumavka je nakonec vyhozena a kolonka se umístí do čisté 1,5 ml zkumavky a je na ní nanese 50  $\mu$ l Nuclease-free water a vzorek je opět zcentrifugován po dobu 1 minuty při 20000 g. Kolonka je následně vyhozena a ve zkumavce je přečistěný vzorek.

Sondy byly značeny biotinem. Pro značení kratších fragmentů bylo použito PCR značení, delší fragmenty (18S rDNA sonda) byla značena pomocí Nick translace, při které se mimo inkorporace biotinu také štěpí DNA na kratší fragmenty vhodné pro FISH.

Izolovaná DNA byla použita jako templát pro značící PCR reakci. Ta byla prováděna se dvěma druhy polymeráz – LA DNA Polymerases Mix (TopBio) a Taq DNA polymeráza Unis (TopBio) podle protokolu v Tabulce 4, každá z polymeráz byla dodávána s komerčním pufrem. Jako sonda byla následně použita ta, která měla lepší výsledek na kontrolním agarosovém gelu. Fragment pro 18S rDNA byl předpřipraven kolegy a laskavě darován k označení. Všechny sondy připravované v rámci této práci byly po optimalizaci připravovány podle stejného teplotního profilu – počáteční denaturace 5 minut (95°C), následně 40 cyklů: denaturace 70 s (95°C), annealing 30 s (56°C), elongace 240 s (72°C) (podle zkušeností mých kolegů, je pro inkorporaci značených nukleotidů důležité prodloužit čas), na konci posledního cyklu závěrečná elongace 10 minut (72°C).

PPP Master Mix	12,5 $\mu$ l
gDNA	2 $\mu$ l
F primer	1 $\mu$ l
R primer	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	8,5 $\mu$ l
Celkem	25 $\mu$ l

Tabulka 3 – protokol prováděné PCR reakce

Primer F	2 $\mu$ l
Primer R	2 $\mu$ l
Fluormix	2,5 $\mu$ l
Polymeráza	0,1 $\mu$ l
Pufr	5 $\mu$ l
gDNA	3 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	35,4 $\mu$ l
Celkem	50 $\mu$ l

Tabulka 4 – protokol prováděné značící PCR reakce

Sonda pro 18S rDNA byla značena biotin-14-ATP pomocí Nick translace kitem BioNick™ (Invitrogen). 1  $\mu$ g templátové DNA bylo smícháno s enzym mixem, mixem nukleotidů a pufrům a doplněn do objemu 45  $\mu$ l H<sub>2</sub>O dle instrukcí výrobce. Směs byla následně inkubována v termocykleru při teplotě 16°C. Po jedné hodině byla reakce pozastavena (vložením na led) a 1  $\mu$ l vzorku bylo elektroforeticky zkontrolováno. Průběh reakce indikovalo štěpení fragmentu na kratší části, které se na gelu zobrazovalo jako smear. V případě nedostatečného naštěpení reakce pokračovala opět při 16°C. V případě dosažení cílené velikosti smearu (rozsah mezi 100 a 400 bp) byla reakce zastavena přidáním 5  $\mu$ l stop bufferu. Ideální čas značení se pohyboval mezi 1-1,5 hodinou.

#### 4.6.1.3. Sekvenace

Vzorky pro sekvenaci byly po změření koncentrace připraveny pro sekvenaci. Každý vzorek pro sekvenaci se připravoval na celkový objem 8  $\mu$ l – 1  $\mu$ l příslušného primeru v 5  $\mu$ M koncentraci, templátová DNA v koncentraci 5ng/100pb. Podle potřeby se pak vzorek na konečný objem 8  $\mu$ l doplnil PCR vodou. Každý fragment byl sekvenován z obou směrů.

Samotná sekvenace byla prováděna na zakázku v Laboratoři sekvenace DNA v centru BIOCEV (Vestec). Přístroj použitý pro sekvenaci byl MiSeq Illumina. Kontrola kvality a úprava hotových sekvencí byly prováděny pomocí softwaru BioEdit, homologie pak byla studována pomocí Nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) na stránkách amerického NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Výsledná sekvence U2 snRNA sondy připravené z gDNA *Ero aphanus* byla následující:

```
TATCGCTTCTCGGCCTTATGGGCTAAGATCAAAGTG TAGTATCTGTTCTTATCAGCT
TGACTTCTGATACGGTGTTTCATTGAACGCCTTCGATTGTCAACTAATTTTTGAACAC
AGGCTTGCGGTCTGGAATTCATTCCGCCCTCGCCACGGGTTGGCCCGCTATTGCAGT
ACCGCCGGGA
```

Tato sekvence se shoduje z 83% s NCBI Reference Sequence: XR\_004760607.1 - *Stegodyphus dumicola* U2 spliceosomal RNA (LOC118203633) (Liu et al., 2019) a je 181 bp velká.

V případě sekvence 5S rRNA sondy připravené z gDNA *Ero aphanus* se nepodařilo sekvenovat produkt reverse primeru, sekvence forward primeru je následující:

```
ATCACGAAGTCAGCATCATCGGGCGCGGTTAGTACTTGGGAGGGTGACCACCTGGG
AACACCGCGTGCCGTTGGCTTA
```

Tato sekvence se z 93% shoduje s NCBI Reference Sequence: XR\_004756721.1 – *Stegodyphus dumicola* 5S ribosomal RNA (LOC118180724) (Liu et al., 2019) a je 78 bp velká.

V případě sekvence 5S rRNA sondy z gDNA *Araneus grossus* se stejně jako u *E. aphanus* nepodařilo získat smysluplnou sekvenci v reverse směru. Sekvence forward primeru je následující:

```
GCAGCATCGGGCGCGGTCAGTACTTGGGAGAGGTGACCACCTGGGAACACCGCGT
GCCGTTGGCTTA
```

Tato sekvence se z 97% shoduje s NCBI Reference Sequence: XR\_004756721.1 - *Stegodyphus dumicola* 5S ribosomal RNA (LOC118180724) (Liu et al., 2019) a je 67 bp velká.

#### 4.6.1.4. FISH

Pro FISH se může využívat buď přímo či nepřímo značené sondy. Pro přímé značení se využívá nukleotidů, na které je přímo navázán fluorochrom, v případě

nepřímého značení je sonda značena nefluorescenční molekulou, která je detekována protilátkou konjugovanou s fluorochromem. V práci jsem používal sondy značené biotinem, který byl detekován streptavidinem konjugovaným s Cy3 a pomocí imunochemické reakce s antistreptavidinem-biotinem a opětovnou aplikací streptavidinu-Cy3 se tento signál ještě dále zesílil. FISH v této práci jsou dělány podle následujícího protokolu.

Hybridizační směs se připravuje smícháním sondy (10ng na sklo pro 18S rDNA a 50ng na sklo pro ostatní markery) s kompetitorovou DNA – tedy sonikovanou DNA izolovanou z lososích spermií (Sigma Aldrich) (10 µg/l) 2,5 µl na jedno sklo. V dalším kroku je sonda s kompetitorem pročištěna ethanolovou precipitací, smícháním s 3M acetátem sodným (Top Bio) (10% původního objemu) a předchlazeným 96% ethanolom (250% původního objemu). Celá směs je následně umístěna do -80°C po dobu nejméně 1 hodiny, během které dojde k precipitaci DNA. Následně je směs centrifugována při 20000 g po dobu 20 minut se zapnutým chlazením. Po centrifugaci je odstraněn supernatant a pro odstranění zbytkových solí je přidán předchlazený (-20°C) 70% Ethanol a zkumavka je centrifugována opět při 20000 g do dobu 15 minut se zapnutým chlazením. Po centrifugaci je znovu odstraněn supernatant a na dně zkumavky by měl být viditelný pelet vysrážené DNA. Zkumavka je umístěna s otevřeným víčkem do termbloku (37°C) dokud se neodpaří zbytky ethanolu. Pelet pročištěné DNA je následně rozpuštěn v deionizovaném formamidu (Sigma Aldrich) (5µl na sklo) po dobu 30 minut (37°C). Po uplynutí této doby je ke směsi přidán 20% dextran sulfát (5µl na sklo) předehřátý na 37°C a celá směs je přenesena do vodní lázně (90°C) a denaturována po dobu 5 minut. Směs je následně skokově podchlazena na ledové tříšti po dobu 3 minut. Směs je tím následně připravena pro aplikaci na denaturované preparáty.

Pokud byla skla barvena Giemsou a pozorována pod imerzí, jsou nejdříve odmyta oplachem v xylenu (Penta), následně minutovým oplachem v lékařském benzínu (Penta) a poté v methanolové fixáži. Pro samotnou přípravu preparátů na FISH jsou skla odvodněna v ethanolové řadě (70%, 80%, 96% - 1 minuta) a po jejich oschnutí umístěna na 1 hodinu do termoboxu (60°C) pro tzv. aging, který zlepšuje přilnutí figur k podkladu. Pro odstranění RNA, která by v případě sond pro kodující sekvence mohla způsobit nežádoucí pozadí, je následně na sklo aplikováno 100 µl směsi RNázy A (2µl RNáza A (c= 10mg/ml) + 10µl 20xSSC + 88µl H<sub>2</sub>O), sklo je následně přikryto krycím sklíčkem a inkubováno ve vlhké komůrce (uzavíratelná krabička vlhčená 2xSSC) při 37°C po dobu 1 hodiny. Následně jsou skla promyta po dobu 2x5min v 2xSSC (37°C, třepání ve vodní

lázni). Skla jsou následně promývána v kyvetě s 5x Denhartovým reagens po dobu 30 minut (37°C, třepání ve vodní lázni). Skla jsou následně denaturována. Po aplikaci 100µl deionizovaného 70% formamidu je na podložní sklo umístěno krycí sklíčko a sklo je umístěno na přehřátý termoblok (68°C) po dobu 3 minut. Skla jsou následně vyndána, krycí sklíčka odstraněna a skla okamžitě zchlazena v kyvetě s předchlazeným 70% ethanolem, skla jsou následně dokončením ethanolové řady (80%, 96%) dehydrována ponechána uschnout. Po jejich uschnutí je na ně nanášeno 10µl hybridizační směsi a sklo je zakryto krycím sklem (24x32 mm) a okraje zalepeny modelářským rubber cementem aby bylo zabráněno vysychání. Skla jsou následně umístěna do vlhké komůrky a inkubována přes noc v termostatu (37°C).

Ve druhém dnu je ze skel odstraněn rubber cement a krycí sklo a dochází k odmyváni nespecifických signálů. Nejprve promytím v 50 % formamidu v 2x SSC (opakováno třikrát v čerstvém roztoku po dobu 5 min, při 46°C) , následně pětkrát po dobu 2 min v 2x SSC (46°C) a třikrát po dobu 5 min v 0,1xSSC (62°C). Všechny tyto kroky probíhají v kyvetách ve třepací vodní lázni. Poté jsou preparáty promývány po dobu 5 minut v 4xSSC/0,1Tween 20 ve tmě (RT).

Následně dochází k detekci sondy. Na každé sklo je aplikováno 500µl blokačního roztoku (2,5% BSA v 4xSSC), skla jsou zakryta krycím sklem a dána do vlhké komůrky a inkubována po dobu 20 minut ve tmě a pokojové teplotě (RT). Krycí skla jsou následně odstraněna na každé sklo je aplikováno 100µl směsi Cy3-streptavidinu v BSA, která detekuje biotin, znovu jsou zakryta krycím sklem a inkubována ve vlhké komůrce po dobu 20 minut ve tmě a pokojové teplotě (RT). Skla jsou po tomto kroku promyta třikrát po dobu 3 minut v 4xSSC/0,1Tween 20 (37°C) ve třepací vodní lázni. Signál je v následujících krocích zesilován navazováním antistreptavidinu konjugovaného s biotinem (Biot-As) na již přítomné molekuly streptavidinu a následnou opětovnou aplikací Cy3-streptavidinu na nově přítomné molekuly biotinu. Na každé sklo je znovu aplikováno 500µl blokačního roztoku pro zablokování nespecifických vazebných míst, skla jsou zakryta krycím sklem a dána do vlhké komůrky a inkubována po dobu 10-20 minut ve tmě (RT). Následně je na každé sklo nanášeno 50µl směsi antistreptavidinu konjugovaného s biotinem v BSA, skla jsou zakryta krycím sklem a inkubována ve vlhké komůrce po dobu 20 minut ve tmě (37°C). Preparáty jsou poté promývány v 4xSSC/0,1Tween jak je popsáno výše. Na každé sklo je poté opět aplikováno 500µl blokačního roztoku, skla jsou zakryta krycím sklem a dána do vlhké komůrky a inkubována po dobu 20 minut ve tmě (37°C). Po odstranění krycích skel je na každé sklo

naneseno 100µl směsi Cy3-streptavidinu v BSA, znovu jsou zakryta krycím sklem a inkubována ve vlhké komůrce po dobu 20 minut ve tmě (37°C). Preparáty jsou poté znovu třikrát promývány po dobu 5 minut v 4xSSC/0,1Tween 20 ve tmě (37°C) ve vodní lázni se zapnutým třepáním.

Skla jsou poté v několika následujících krocích podbarvena DAPI. Všechny následující kroky probíhají za tmy v pokojové teplotě. Nejprve jsou skla po dobu 5 minut ponořena do kyvety s 1% TritonX (Sigma Aldrich) v 1x PBS, následně jsou přenesena na 8 minut do DAPI barvicího roztoku (0,005% DAPI v 1% TritonX/1x PBS), následně přenesena na 2-5 minut do 1% PhotoFlo (Kodak)/1xPBS a v posledním kroku na 1 minutu do 1% PhotoFlo/H<sub>2</sub>O. Po vyjmutí z poslední kyvety se skla nechají zlehka oschnout a je na každé naneseno 25 µl antifade DABCO. Skla jsou zakryta krycími sklíčky (24x40 mm) a po rovnoměrném rozprostření DABCO pod krycím sklem se okraje krycího skla zalakují lakem na nehty, aby preparát nevysychal. Po zatuhnutí laku jsou skla připravena k pozorování.

#### 4.7. Průtoková cytometrie

Pro měření velikosti genomu byly použity vzorky pavoučí tkáně uložené v deepfreezu (-80°C). Nejčastěji šlo o nohy, či celou hlavohrud' daného druhu. Průtoková cytometrie byla realizována pomocí dvou fluorescenčních barviv - propidium jodid (PI) a 4',6-diamidin-2-fenylindol (DAPI). zatímco PI interaguje s DNA nespecificky, DAPI je známé preferenčním barvením AT bohatších úseků. Hodnoty z PI byly použity ke stanovení velikosti genomu. Konfrontace hodnot z obou barviv mi umožnila stanovit celkový poměr bazí v genomech studovaných pavouků.

Pro přípravu byl použit stejný protokol jako v Král et al. (2019), který postupoval podle původního protokolu Otto (1990). Ke kousku pavoučího těla byl přidán odpovídající kus čerstvého listu jednoho z rostlinných standardů - *Pisum sativum* „Ctirad“ (2C = 8.018 pg, GC = 41.77%) pro Mimetidae a *Bellis perenis* (2C=3.159 pg, GC = 39.54%) v případě Araneidae; měření byla prováděna v Laboratoři průtokové cytometrie na Masarykově univerzitě v Brně, genomické parametry referenčních standardů byly převzaty z Šmarda et al., (2019). Standard s pavoučí tkání byly poté zalaty pufrem Otto I a rozsekány žiletkou. Vzniklá suspenze byla přefiltrována přes 0.2 µm nylonový filtr a poté smíchána s pufrem Otto II (obsahujícím DAPI nebo PI).

Směs byla poté umístěna pro inkubaci na led do tmy zhruba na 20 minut. Samotné měření bylo prováděno na dvou cytometrech, pro každý fluorochrom zvlášť – Sysmex Partec GmbH CyFlow ML (DAPI) a CyFlow SL (PI). Pro každé měření bylo měřeno 5000 jader. Výsledky byly zpracovány pomocí softwaru FloMax®, dodávaným společností Sysmex Partec GmbH.

Naměřená hodnota se následně vynásobila 2C hodnotou příslušného standardu, vzniklá hodnota je pak výslednou hodnotou pro dané měření velikosti genomu měřeného jedince. Metodika výpočtu velikosti genomu a obsahu bazí byla použita stejná jako v doposud jediné práci zabývající se těmito charakteristikami u pavouků. Kdy byl každý jedinec stejného pohlaví a druhu měřen opakovaně (2-3x dle velikosti těla, na každém fluorochormu). Směrodatná odchylka a průměr odrážející velikost genomu pro druh a pohlaví byla stanovena z jednotlivých měření (replikantů). Pro kalkulaci poměrů bazí byl použit algoritmus odvozený od Barow a Meister (2002) automatizovaný v předpřipravené tabulce (Šmarda et al., 2008). Pro kalkulaci GC% v genomu byly použity průměrné hodnoty ze všech měření. Poměr obsahu bazí byl stanoven podle následujícího výpočtu: Nejdříve je potřeba spočítat tzv. dye factor (DF) podle vzorce 1. Následně je tato hodnota dosazena do vzorce 2 a společně s dosazením známých hodnot poměru bazí použitého standardu a vazebné délky pro použité barvivo (DAPI,  $n=4$ ) dostaneme výsledek AT obsahu, tuto hodnotu převedeme na procenta a odečtením od 100 získáme procentuální hodnotu GC zastoupení. Protokol pro výpočet převzat od Šmarda et al. (2008).

$$DF_{sample} = \frac{sample / reference \text{ ratio with base specific dye}}{sample / reference \text{ ratio with base unspecific dye}}$$

Vzorec 1 – výpočet DF

$$f(AT_{sample}) - DF_{sample} \times f(AT_{reference}) = 0 \Rightarrow$$

$$\frac{(1 - AT_{sample})AT_{sample}^n}{1 - AT_{sample}^n} - DF_{sample} \times \frac{(1 - AT_{reference})AT_{reference}^n}{1 - AT_{reference}^n} = 0$$

Vzorec 2 – výpočet zastoupení AT bazí v měřeném vzorku  $n$  je vazebná délka, tedy počet za sebou jdoucích bazí stejného typu (AT či GC) potřebných k navázání specifického barviva. Pro DAPI je to v tomto případě  $n = 4$ .

## 5. Výsledky

### 5.1. Cytogenetická analýza karyotypu

#### 5.1.1. Araneidae

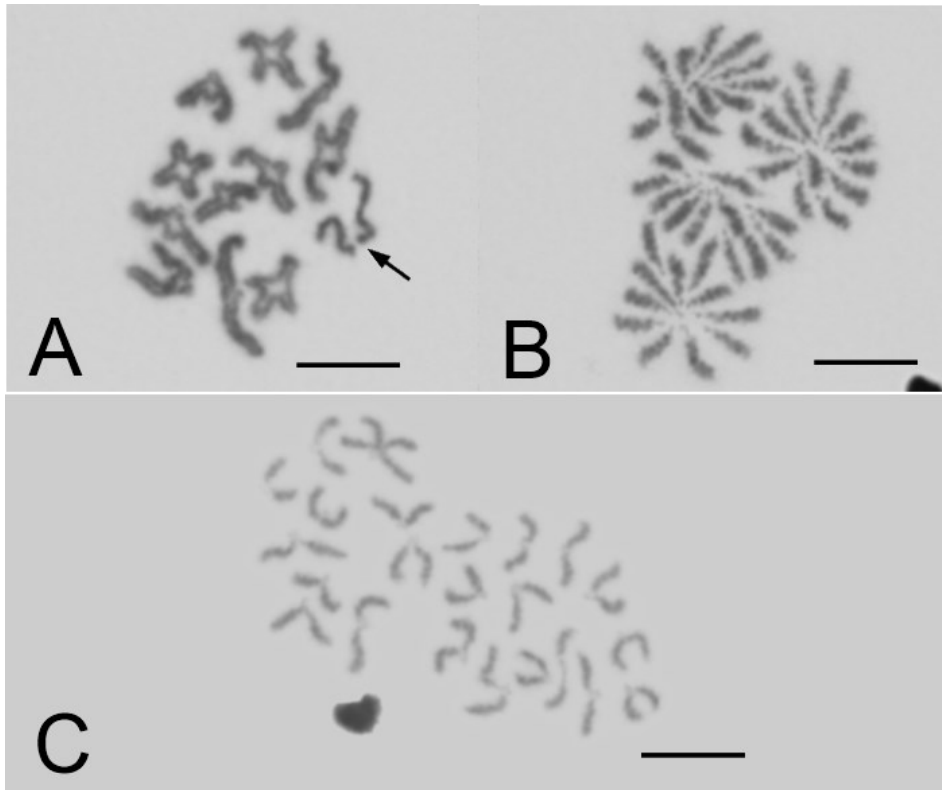
##### *Araniella cucurbitina*

Diploidní počet chromozomů je 24 v případě samců, autozomových párů je 11, systém pohlavních chromozomů je  $X_1X_20$  (viz. Obrázek 29 v podkapitole 5.2.1.). Poměr pohlavních chromozomů je  $1:0,905 \pm 0,084$  (měřeno na pěti diakinezích/metafázích I  $\rightarrow n=5$ ). Všechny chromozomy vykazují akrocentrickou morfologii. Celý karyotyp včetně poměru pohlavních chromozomů byl vyhodnocován ze skel, na kterých byla provedena 18S rRNA FISH.

##### *Eriophora sp.*

Diploidní počet chromozomů je 24 v případě samců, autozomových párů je 11, systém pohlavních chromozomů je  $X_1X_20$  (viz. Obrázek 6, fig. A) a všechny chromozomy vykazují akrocentrickou morfologii (viz. Obrázek 6, fig. C). Na pozorovaných figurách jsou pohlavní chromozomy izopyknotické. Poměr pohlavních chromozomů je  $1:0,785 \pm 0,064$  (měřeno na pěti diakinezích/metafázích I).

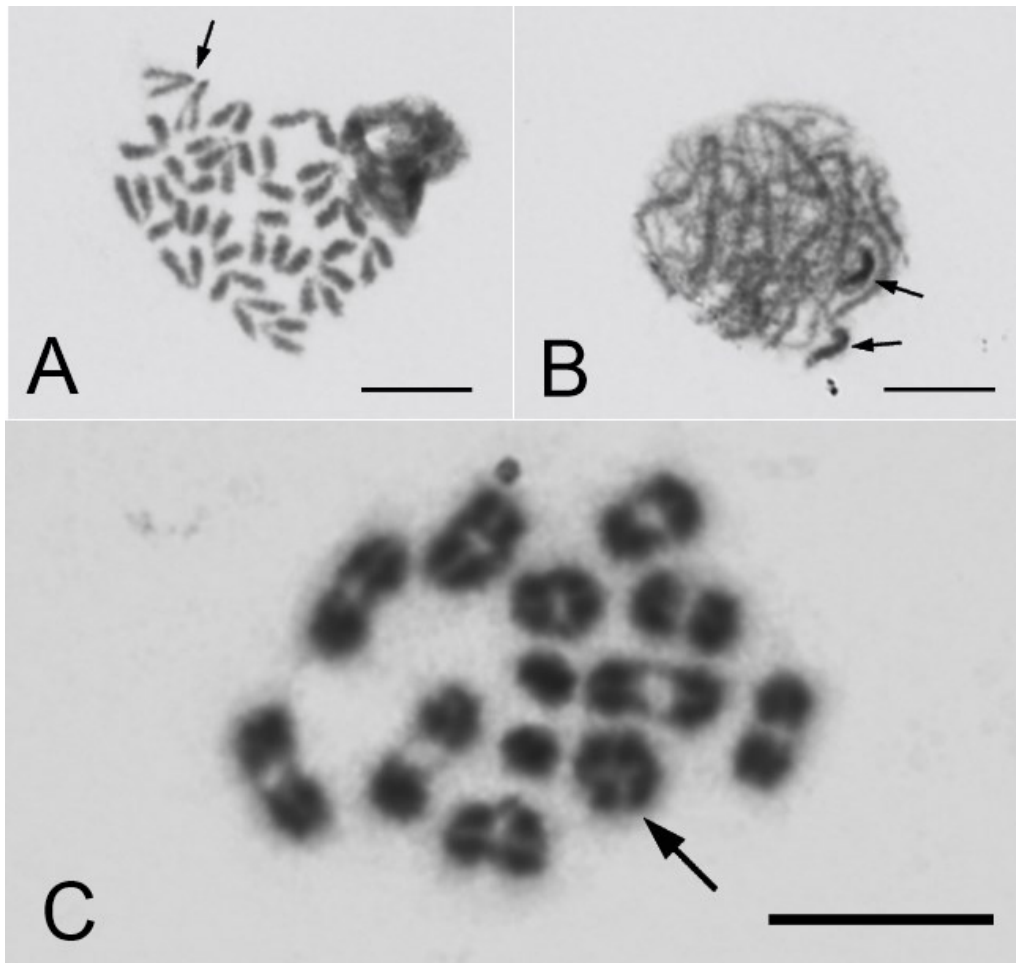




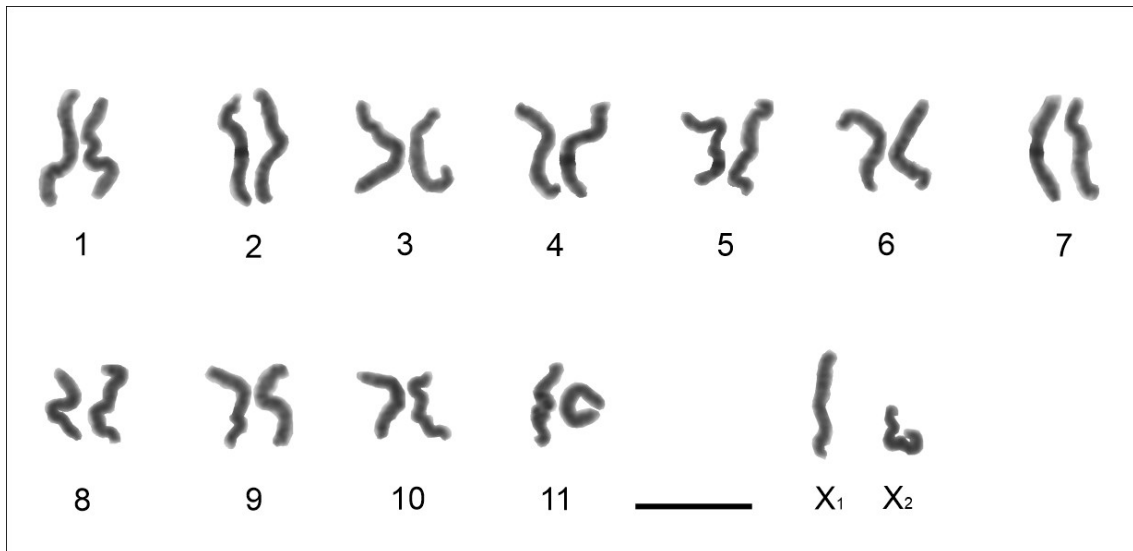
Obrázek 6 – *Eriophora* sp. samec – chromozomové figury, (A) diakineze – je patrných 11 autozomových párů a chromozomy X1 a X2 označené šipkou; (B) anafáze II – na obrázku patrné čtyři sesterské figury, ve dvou spodních je patrných 11 chromozomů, dvě figury nad nimi obsahují každá po 13 chromozomech – tento pattern prokazuje segregaci pohlavních chromozomů do poloviny tvořených gamet; (C) metafáze II – je patrných 24 chromozomů s akrocentrickou morfologií, tvořící v této fázi tvar písmene „V“. Měřítka u všech figur je 10  $\mu\text{m}$ .

### ***Gibbaranea bituberculata***

Diploidní počet chromozomů je 24 v případě samců, autozomových párů je 11, systém pohlavních chromozomů je  $X_1X_20$  (viz. Obrázek 7, fig. C) a všechny chromozomy vykazují akrocentrickou morfologii (viz. Obrázek 7, fig. A). Od zygotene po konec pachytene jsou pohlavní chromozomy pozitivně heteropyknotické (viz. Obrázek 7, fig. B). Poměr pohlavních chromozomů je  $1:0,929 \pm 0,063$  ( $n=5$ ). Pro tento druh byl zpracován karyogram (viz. Obrázek 8).



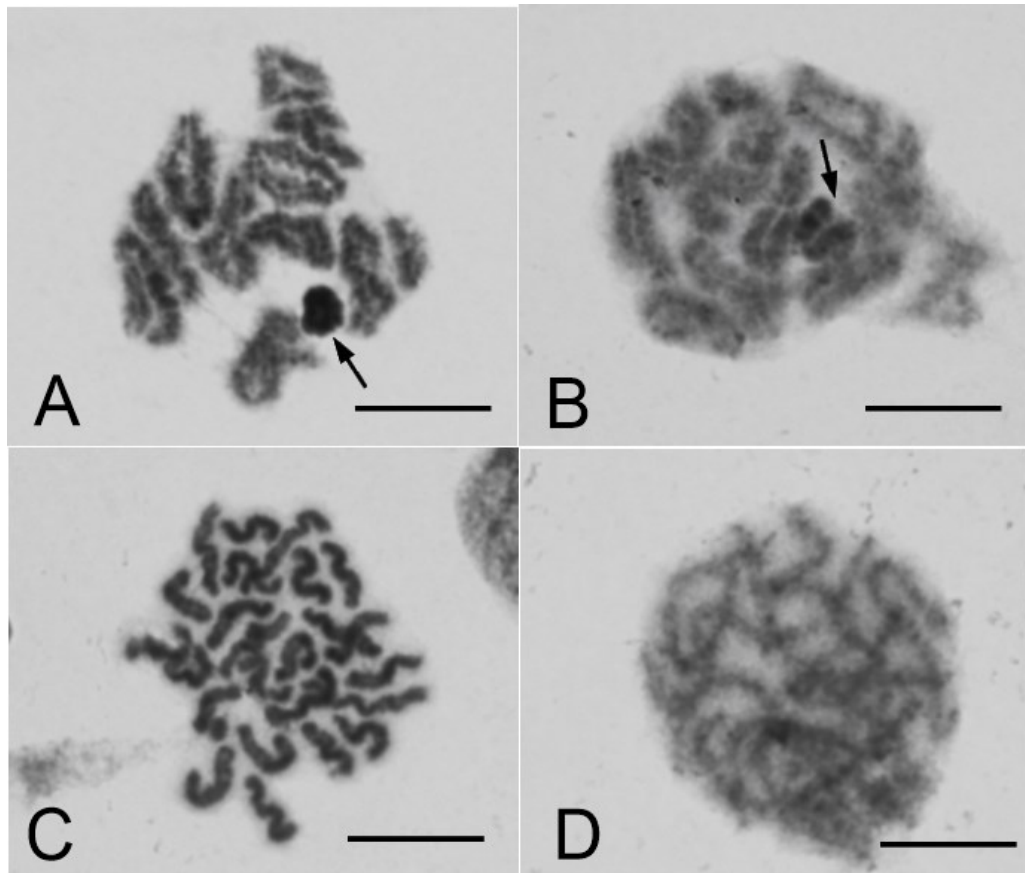
Obrázek 7 – *Gibbarenea bituberculata* samec – chromozomové figury, (A) metafáze II – je patrných 24 chromozomů s akrocentrickou morfologií, šipka ukazuje na pravděpodobný pár pohlavních chromozomů, který je odlišný svým párováním; (B) zygotene – pohlavní chromozomy jsou viditelně heteropyknotické, v této fázi stále ještě nespárované; (C) metafáze I – je patrných 11 autozomálních párů a párující chromozomy  $X_1$  a  $X_2$ . Měřítka u všech figur je 10  $\mu\text{m}$ .



Obrázek 8 – *Gibbarenea bituberculata* samec – karyogram sestavený ze spermatogoniální prometafáze, všechny chromozomy jsou akrocentrické, pohlavní chromozomy jsou dva -  $X_1$  a  $X_2$ , chromozomy jsou seřazené sestupně podle velikosti, která plynule mírně klesá. Měřítka je 10  $\mu\text{m}$ .

### *Cyclosa conica*

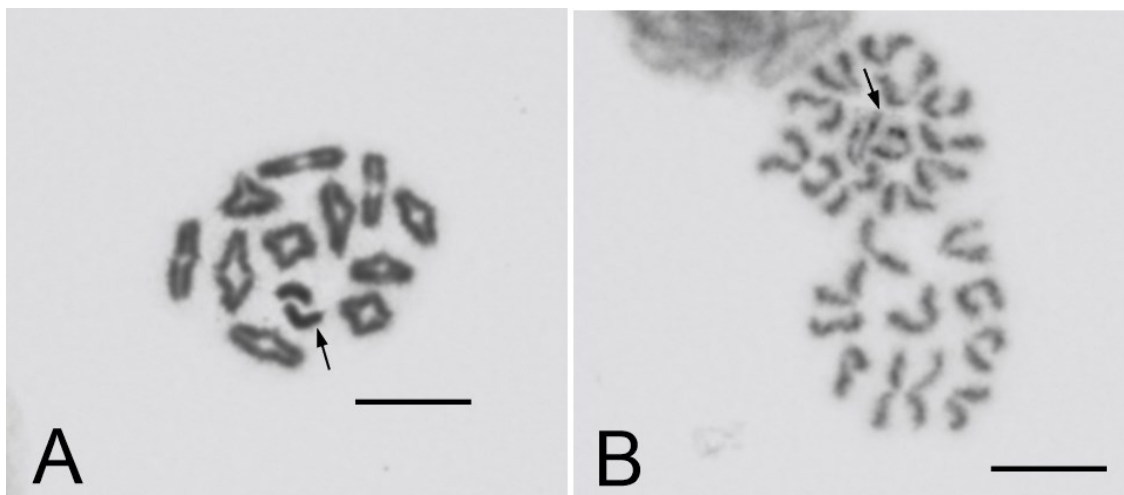
Diploidní počet chromozomů je 24 v případě samců, autozomových párů je 11, systém pohlavních chromozomů je  $X_1X_20$  (viz. Obrázek 9, fig. A) a všechny chromozomy pravděpodobně vykazují akrocentrickou morfologii. Během pachytene není zřetelná pozitivní heteropyknóza pohlavních chromozomů (viz. Obrázek 9, fig. D). Pozitivně heteropyknotický sex vesicle je však pozorovatelný v průběhu diakineze až do metafáze I (viz. Obrázek 9, fig. A a B). Kvůli nedostatku kvalitních figur nebyl měřen jejich poměr.



Obrázek 9 – *Cyclosa conica* samec – chromozomové figury, (A) diakineze/metafáze I – pozorovatelných 11 autozomálních párů, šipka ukazuje na sex vesicle tvořený pohlavními chromozomy (B) metafáze I – figura je nízké kvality přesto je viditelných pravděpodobně 11 autozomálních párů a spárované pohlavní chromozomy (C) spermatogoniální metafáze – v prostředku figury je překryv, figura však ukazuje 24 chromozomů akrocentrické morfologie. (D) pachytene – na figuře není zřetelná heteropyknóza pohlavních chromozomů. Měřítko u všech figur je 10 µm

### *Nuctenea umbratica*

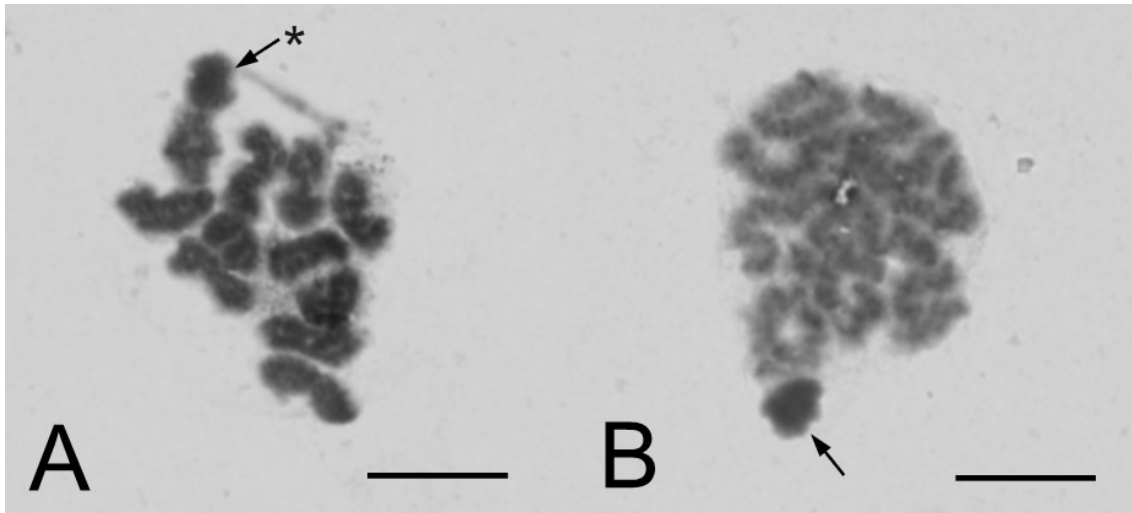
Diploidní počet chromozomů je 24 v případě samců, autozomových párů je 11, systém pohlavních chromozomů je  $X_1X_20$  (viz. Obrázek 10, fig. A) a všechny chromozomy vykazují akrocentrickou morfologii (viz. Obrázek 10, fig. B). Poměr pohlavních chromozomů je  $1:0,905 \pm 0,052$  ( $n=5$ ).



Obrázek 10 – *Nuctenea umbratica* samec – chromozomové figury, (A) diakineze – pozorovatelných 11 autozomálních párů, šipkou jsou označené pohlavní chromozomy; (B) metafáze II – dvě sesterské figury, chromozomy jsou v nich zastoupeny v poměru 13:11 (horní:spodní), šipkou jsou označeny pohlavní chromozomy vykazující lehce odlišnou spiralizaci. Měřítko u všech figur je 10 µm.

#### ***Singa* sp. – Severní Makedonie**

Diploidní počet chromozomů je 24 v případě samců (viz. Obrázek 11, fig. A), autozomových párů je 11, systém pohlavních chromozomů je  $X_1X_20$  a všechny chromozomy jsou pravděpodobně akrocentrické morfologie. Pohlavní chromozomy jsou heteropyknotické během pachytene a jsou odlišitelné až do diakineze (viz. Obrázek 11, fig. B). Vzhledem k nízké kvalitě skel nelze měřit poměry pohlavních chromozomů ani s naprostou jistotou určit jejich morfologii.



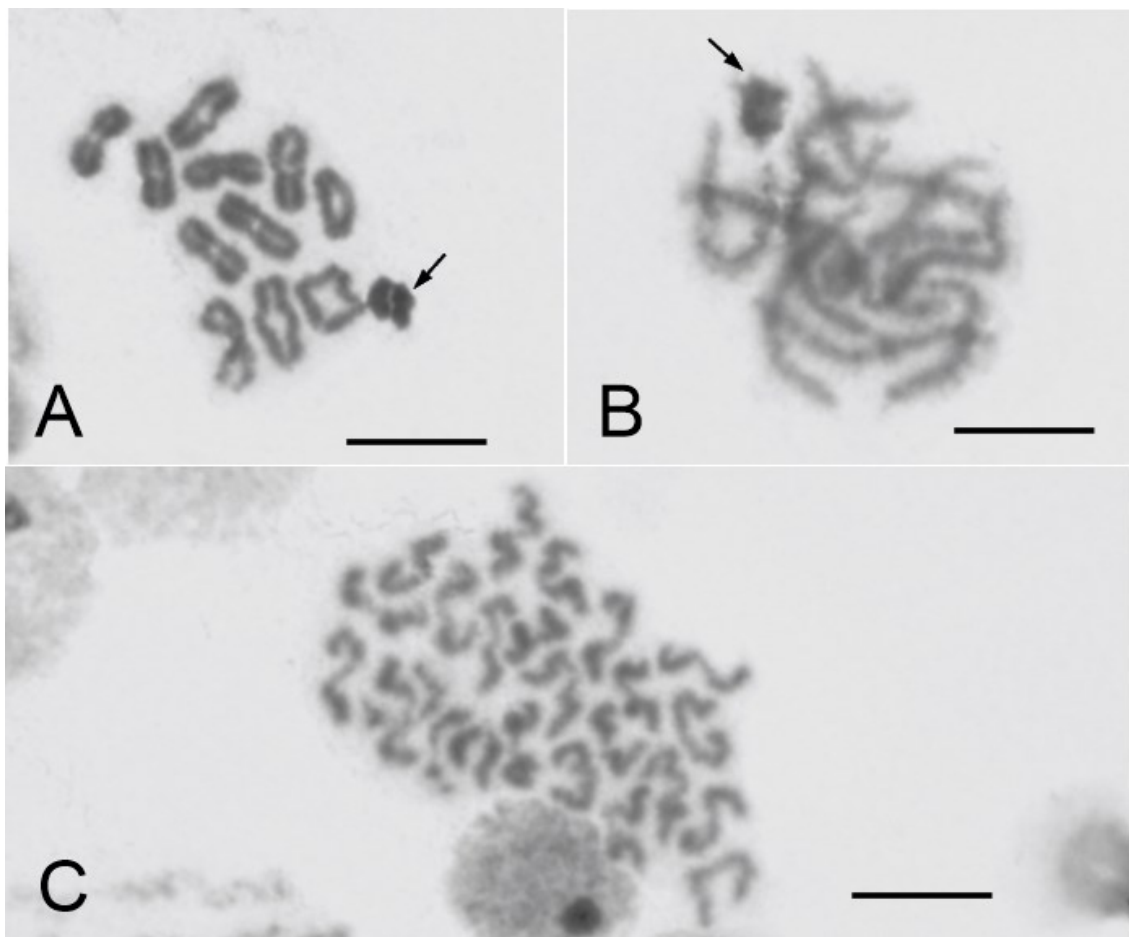
Obrázek 11 – *Singa* sp. (Severní Makedonie) samec – chromozomové figury (A) metafáze I – je patrných 12 chromozomových párů, šipka označená hvězdičkou ukazuje na předpokládanou pozici pohlavních chromozomů, vzhledem k nízké kvalitě figury jde však pouze o odhad (B) diakineze – jednotlivé autozomální páry od sebe jsou těžko rozlišitelné, šipka ukazuje sex vesicle tvořený pohlavními chromozomy. Měřítko u všech figur je 10  $\mu$ m.

### *Araneus diadematus*

Diploidní počet chromozomů je 24 v případě samců, autozomových párů je 11, systém pohlavních chromozomů je  $X_1X_20$  a všechny chromozomy vykazují akrocentrickou morfologii. Karyotyp byl stanoven pouze ze skel, na kterých bylo vyhotoveno C-pruhování (viz. Obrázek 15, fig. A, podkapitola „C – pruhování“).

### *Araneus marmoreus*

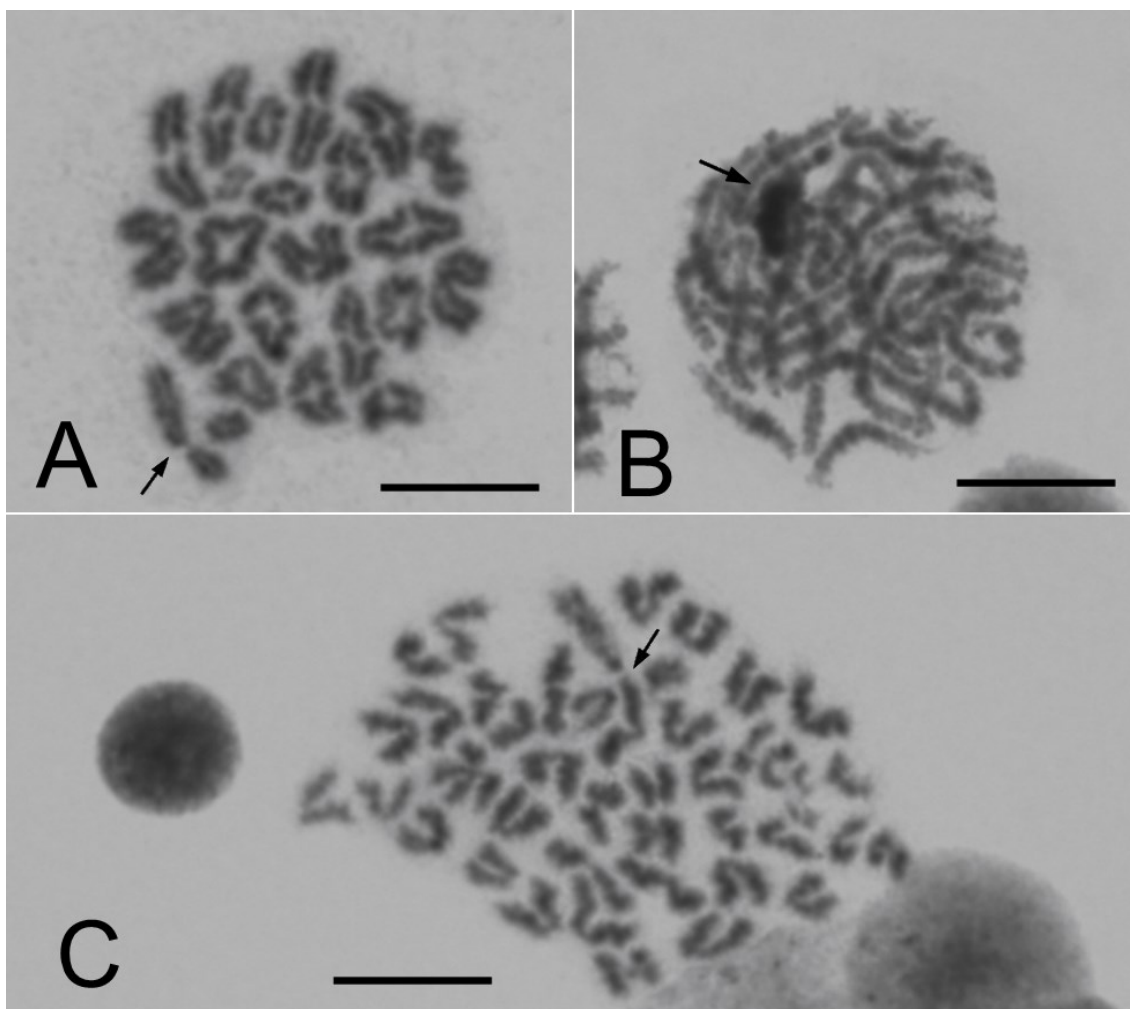
Diploidní počet chromozomů je 24 v případě samců (viz. Obrázek 12, fig. A), autozomových párů je 11, systém pohlavních chromozomů je  $X_1X_20$  a všechny chromozomy vykazují akrocentrickou morfologii (viz. Obrázek 12, fig. C). Pohlavní chromozomy spolu v průběhu pachytene párují (viz. Obrázek 12, fig. B) a jsou díky pozitivní heteropyknoze odlišitelné až do diakineze. Poměr pohlavních chromozomů je  $1:0,935 \pm 0,097$  ( $n=5$ ).



Obrázek 12 – *Araneus marmoreus* samec – chromozomové figury, (A) diakineze/metafáze I – je patrných 11 autozomových párů a heteropyknotické paralelně párující chromozomy  $X_1$  a  $X_2$  označené šipkou; (B) pachytene, šipka ukazuje pár pohlavní chromozomy v těsné asociaci; (C) metafáze II – je patrných 24 chromozomů s akrocentrickou morfologií, tvořící v této fázi tvar písmene „V“. Měřítka u všech figur je 10  $\mu\text{m}$ .

### *Araneus uyemurai*

Diploidní počet chromozomů je 45 v případě samců, autozomových párů je 21, systém pohlavních chromozomů je  $X_1X_2X_30$  (viz. Obrázek 13, fig. A) a všechny chromozomy vykazují akrocentrickou morfologii (viz. Obrázek 13, fig. C). Poměr pohlavních chromozomů je  $1:0,533 \pm 0,073 : 0,451 \pm 0,056$  ( $n=10$ ).

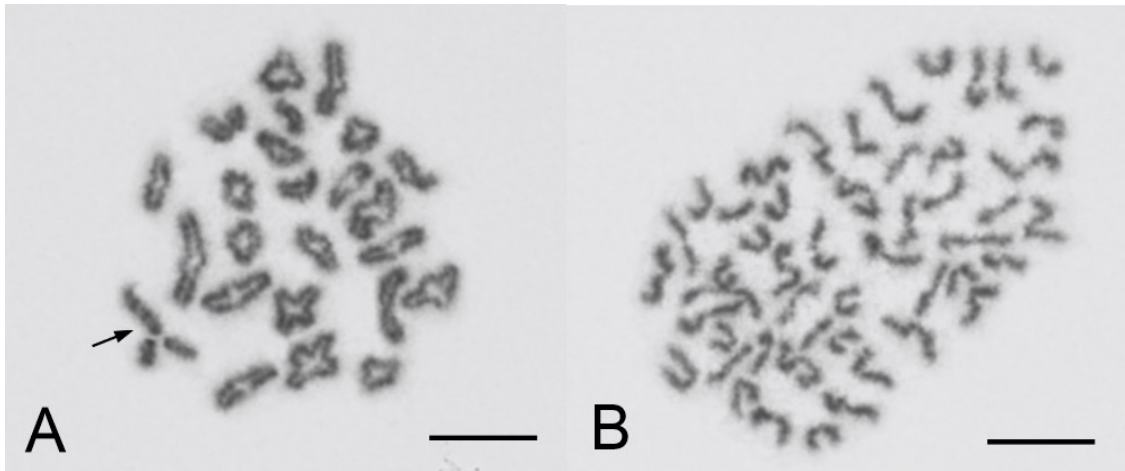


Obrázek 13 – *Araneus uyemurai* samec – chromozomové figury, (A) diakineze/metafáze I – je patrných 21 autozomových párů, šipkou označené pohlavní chromozomy  $X_1X_2X_3$  párují společně v centromerické oblasti (B) pachytene - šipka ukazuje sex vesicle heteropyknotických pohlavních chromozomů, které nejde v této fázi o sebe odlišit (C) metafáze II – je patrných 45 chromozomů s akrocentrickou morfologií, šipka ukazuje na skupinu tří pohlavních chromozomů. Měřítko u všech figur je 10  $\mu\text{m}$

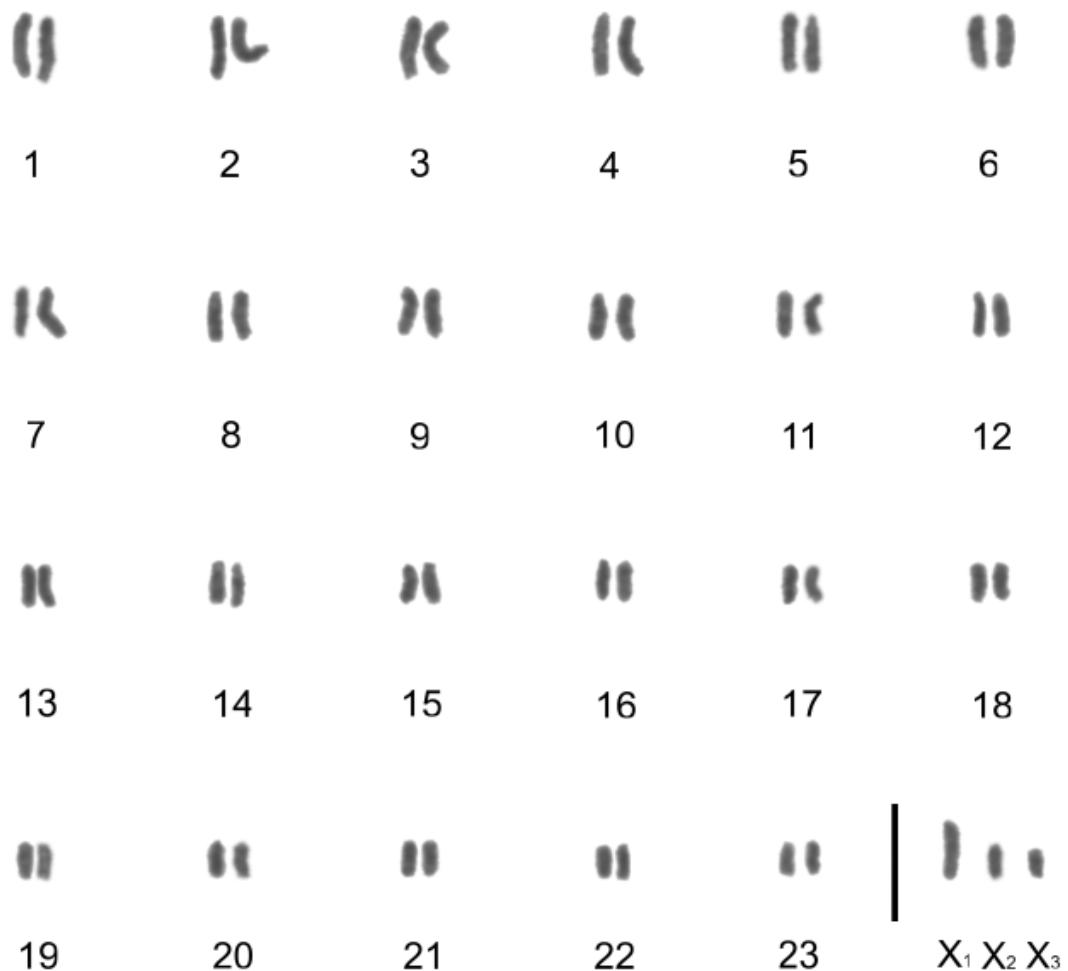
### *Araneus ventricosus*

Diploidní počet chromozomů je 49 v případě samců, autozomových párů je 23, systém pohlavních chromozomů je  $X_1X_2X_30$  (viz. Obrázek 14, fig. A) a všechny chromozomy jsou akrocentrické morfologie (viz. Obrázek 14, fig. B). Poměr pohlavních chromozomů je  $1:0,591 \pm 0,059 : 0,503 \pm 0,051$  ( $n=10$ ). Pro tento druh byl sestaven karyogram (viz. Obrázek 15), na kterém je patrné postupné zmenšování velikosti autozomálních párů.





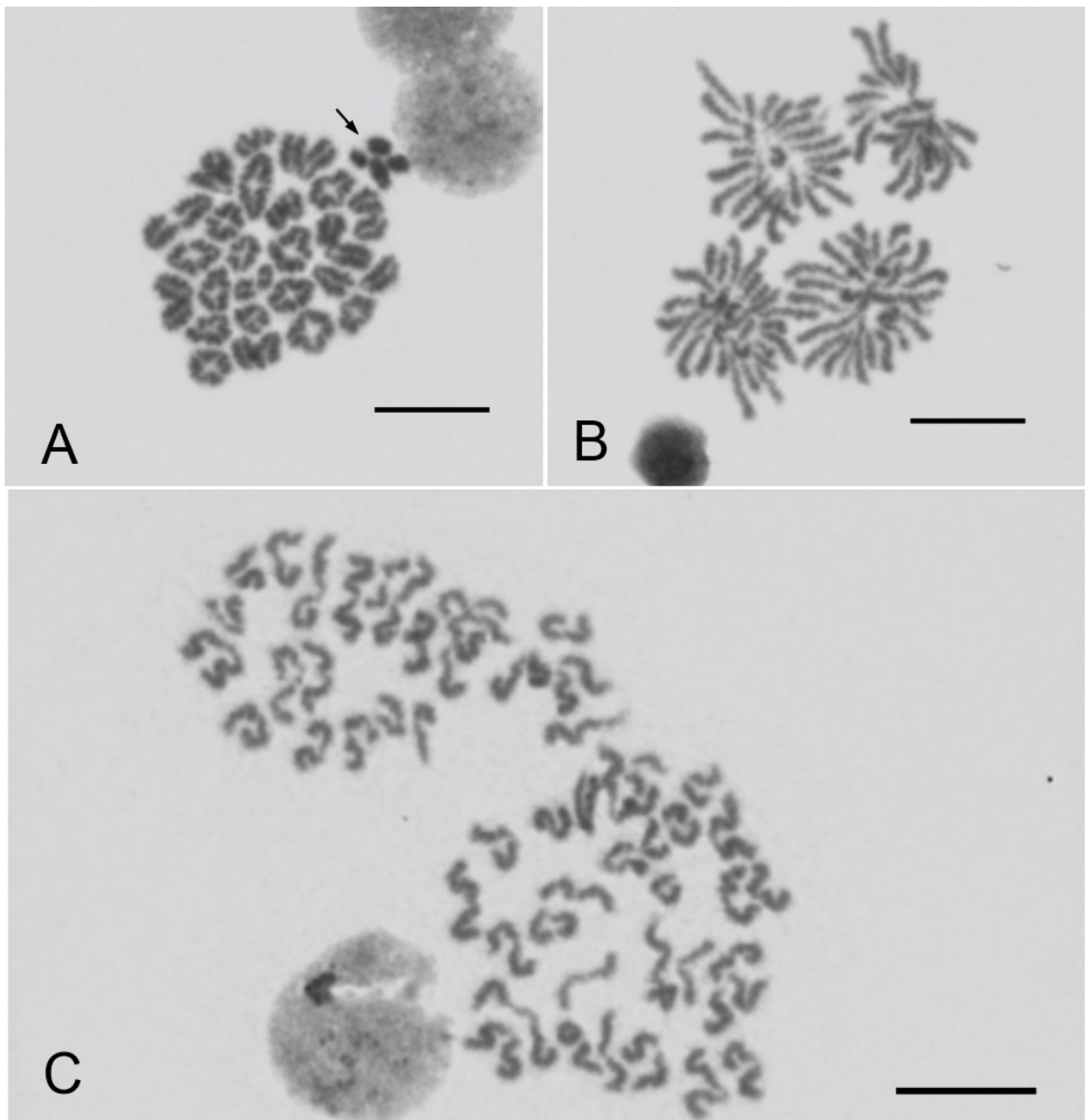
Obrázek 14 – *Araneus ventricosus* samec – chromozomové figury, (A) diakineze/metafáze I – je patrných 23 autozomálních párů, šipkou označené pohlavní chromozomy  $X_1X_2X_3$  párují společně ve vzájemné centromerické orientaci (B) metafáze II – je patrných kompletních 49 chromozomů akrocentrické morfologie. Měřítko u všech figur je 10  $\mu\text{m}$



Obrázek 15 – *Araneus ventricosus* samec – karyogram sestavený z mitotické spermatogoniální metafáze. Autozomálních párů je 23, pohlavní chromozomy jsou tři -  $X_1$ ,  $X_2$  a  $X_3$ . Všechny chromozomy jsou akrocentrické morfologie a jsou seřazené sestupně podle velikosti. Měřítko je 10  $\mu\text{m}$ .

## *Araneus angulatus*

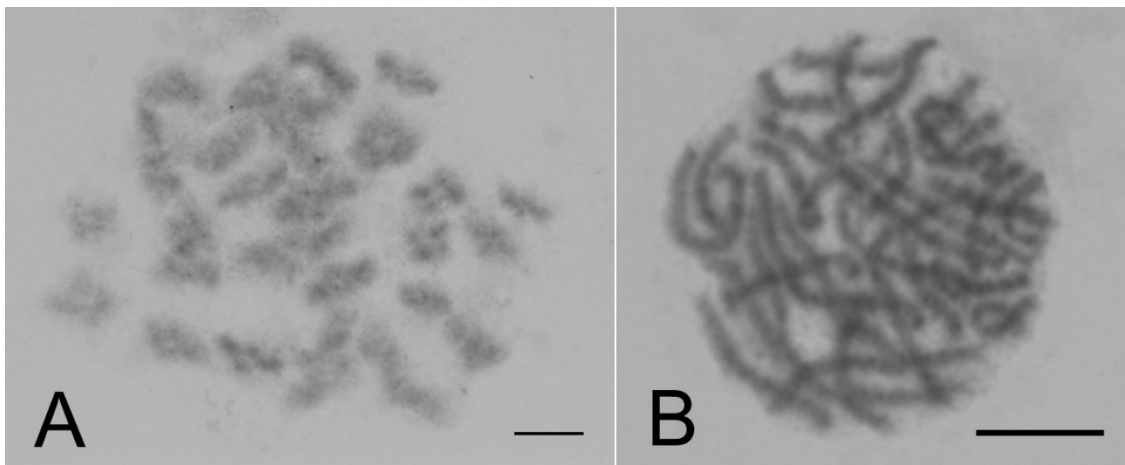
Diploidní počet chromozomů je 52 v případě samců, autozomových párů je 24, systém pohlavních chromozomů je  $X_1X_2X_3X_4$  (viz. Obrázek 16, fig. A) a všechny chromozomy vykazují akrocentrickou morfologii (viz. Obrázek 16, fig. C). Poměr pohlavních chromozomů je  $1:0,759 \pm 0,105 : 0,655 \pm 0,103 : 0,534 \pm 0,057$  (n=5).



Obrázek 16 – *Araneus angulatus* samec – chromozomové figury, (A) diakineze/metafáze I – je patrných 24 autozomových párů, šipkou označené pohlavní chromozomy  $X_1X_2X_3X_4$  párují společně na okraji figury (B) anafáze II – čtyři sesterské figury, u horních dvou je patrných 24 chromozomů, dvě figury pod nimi jich obsahují 28 a čtyři pohlavní chromozomy jsou díky mírné pozitivní heteropyknóze viditelné zhruba v jejich střezech (C) metafáze II – dvě prolínající se sesterské figury, je patrných 52 chromozomů s akrocentrickou morfologií. Měřítka u všech figur je 10  $\mu$ m.

## *Araneus grossus*

Pro tento druh byla pozorována pouze skla z jednoho exempláře samičího pohlaví. Na samičích preparátech se často vyskytují mitotické figury, v tomto případě byla pozorována i samičí meióza, figury se však nacházely v tzv. „difuzním stadiu“. Nebylo možné s jistotou odlišit pohlavní chromozomy. Počet je tudíž orientační. Karyotyp by mohl zahrnovat až 28 párů chromozomů (viz. Obrázek 17, fig A). Pohlavní chromozomy jsou po hypotonizaci izopyknotické v průběhu pachytene (viz. Obrázek 17, fig. B).

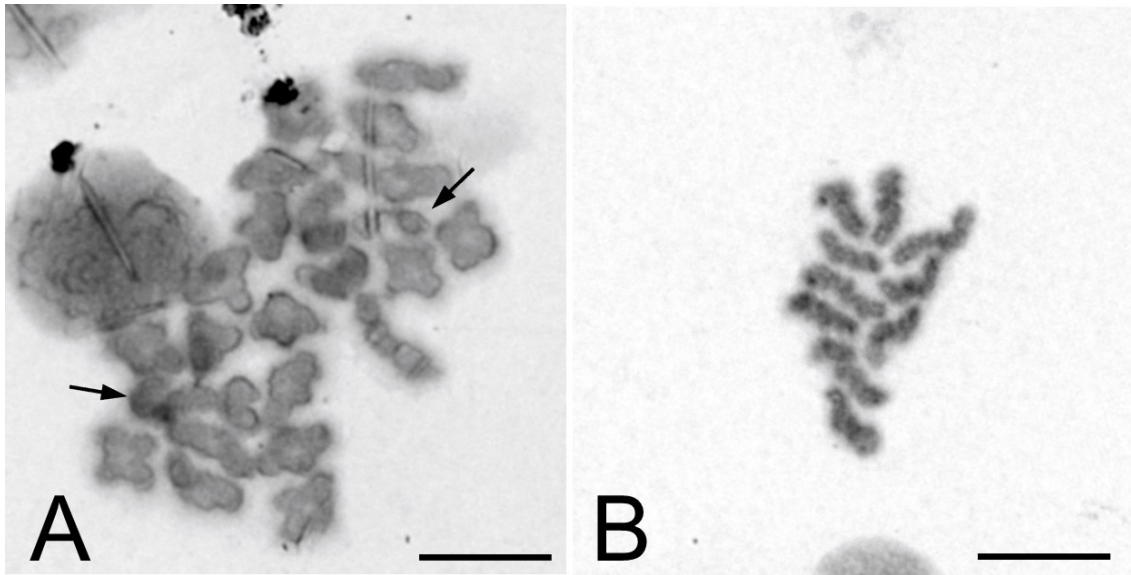


Obrázek 17 – *Araneus grossus* samice – chromozomové figury, (A) diplotene – difuzní stadium, patrně 28 chromozomových párů (případně pohlavních chromozomů), pohlavní chromozomy nicméně nelze odlišit (B) pachytene – pohlavní chromozomy jsou izopyknotické a nelze odlišit od ostatních. Měřítko u všech figur je 10 µm.

### 5.1.1.1. C – pruhování

#### *Araneus diadematus*

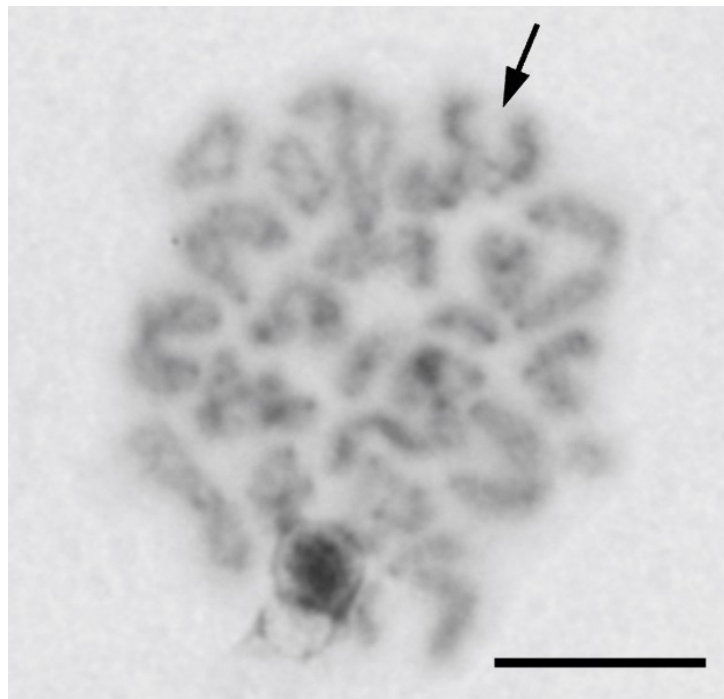
Na zpracovaných sklech byla bohužel kvalita provedeného C-pruhování nízká a na většině figur nebyl pattern příliš patrný. Ze skel šel stanovit předpokládaný karyotyp  $2n♂ = 24, X_1X_20$ , silnější zbarvení bylo pozorovatelné v některých centromerických oblastech (viz. Obrázek 18, fig. A), detailnější pattern byl pozorovatelný u jedné nekompletní figury (viz. Obrázek 18, fig. B).



Obrázek 18 – *Araneus diadematus* samec – chromozomové figury, C - pruhování, (A) dvě kompletní diakineze vedle sebe, šipky ukazují na odhadovanou pozici pohlavních chromozomů (B) nekompletní figura pravděpodobně metafáze I postrádající 2 páry chromozomů včetně pohlavních – na chromozomech je pozorovatelný pattern heterochromatinu. Měřítko u všech figur je 10  $\mu$ m.

### *Araneus uyemurai*

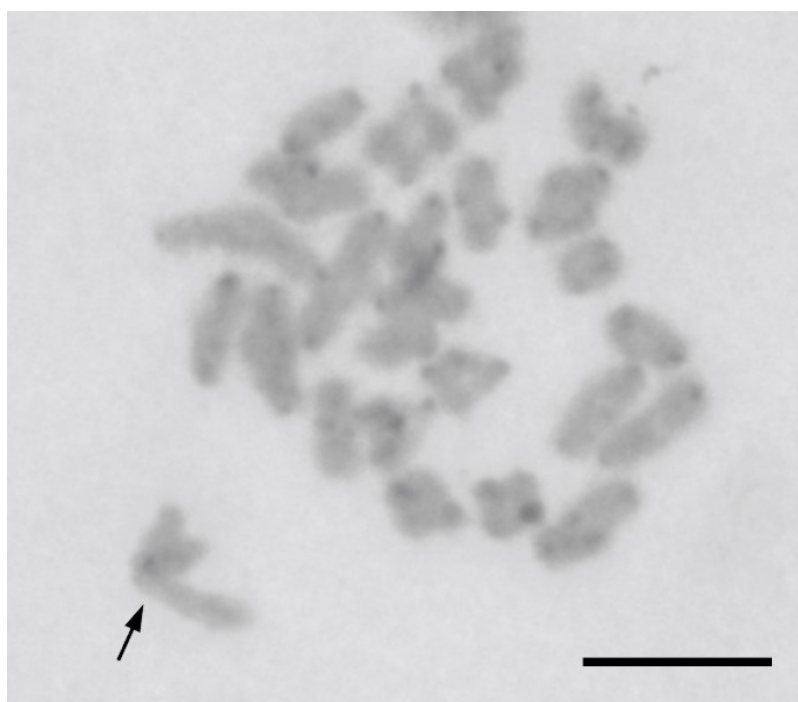
Na figurách jsou patrné pozitivně heteropyknotické úseky heterochromatinu, především v centromerických oblastech (viz. Obrázek 19).



Obrázek 19 – *Araneus uyemurai* samec – chromozomová figura, C - pruhování, samčí diakineze/metafáze I, na chromozomech je pozorovatelný pattern heterochromatinových bloků, šipka ukazuje na pravděpodobnou skupinu tří pohlavních chromozomů X. Měřítko je 10  $\mu$ m.

### *Araneus ventricosus*

Na figurách jsou patrné bloky konstitutivního heterochromatinu v centromerických oblastech, není pozorován výraznější blok heterochromatinu v jiných oblastech chromozomů (viz. Obrázek 20).



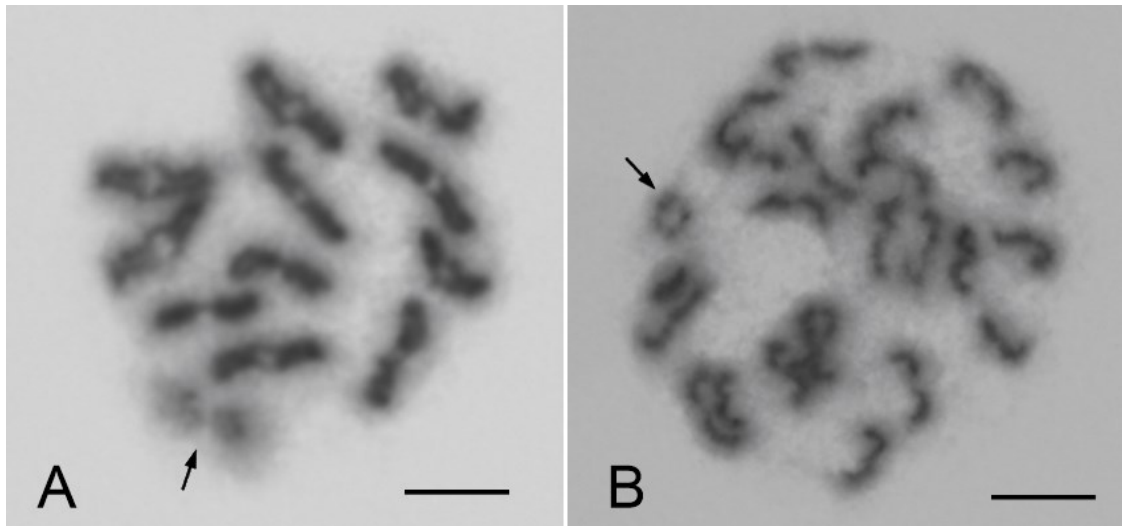
Obrázek 20 – *Araneus ventricosus* samec – chromozomová figura, C - pruhování, samčí diakineze/metafáze I, na chromozomech je pozorovatelná pozitivní heteropyknóza centromer a heterochromatinizovaných úseků. Šipka ukazuje na skupinu tří pohlavních chromozomů X. Měřítko je 10  $\mu$ m.

## 5.1.2. Mimetidae

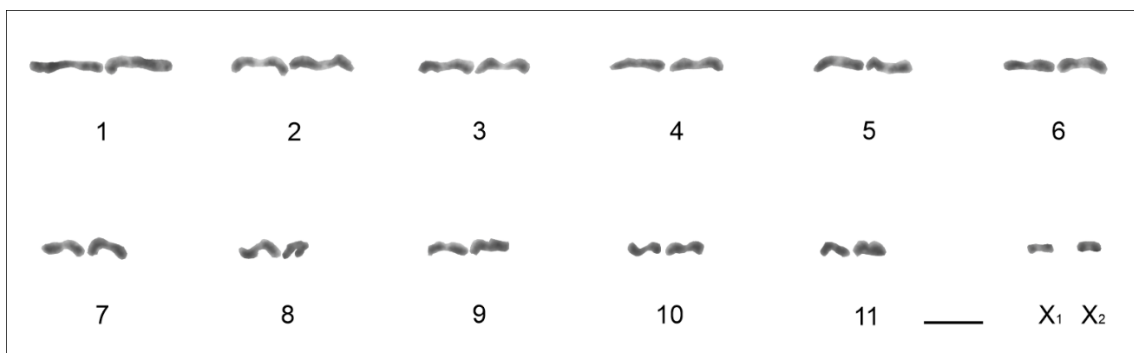
### *Ero aphana*

Diploidní počet chromozomů je 24 v případě samců, autozomových párů je 11, systém pohlavních chromozomů je  $X_1X_20$  (viz. Obrázek 21, fig. A) a všechny chromozomy vykazují akrocentrickou morfologii (viz. Obrázek 21, fig B). Pohlavní chromozomy

vykazují vyšší míru spiralizace a jsou nejmenšími chromozomy v karyotypu, z tohoto důvodu u většiny figur těžko měřitelná velikost. Metafáze II však ukazují, že je morfologie celého karyotypu akrocentrická. V případě tohoto druhu byl sestaven karyogram (viz. Obrázek 22). Z něj je patrné, že se velikost chromozomových párů pozvolna snižuje.



Obrázek 21 – *Ero aphana* samec – chromozomové figury, (A) metafáze I – 11 autozomálních párů, šipka označuje pohlavní chromozomy  $X_1$  a  $X_2$  (B) metafáze II – figura obsahuje pravděpodobně všech 24 chromozomů, které jsou akrocentrické morfologie, pohlavní chromozomy jsou izopyknotické a jsou označeny šipkou. Měřítka u všech figur je 10  $\mu\text{m}$ .

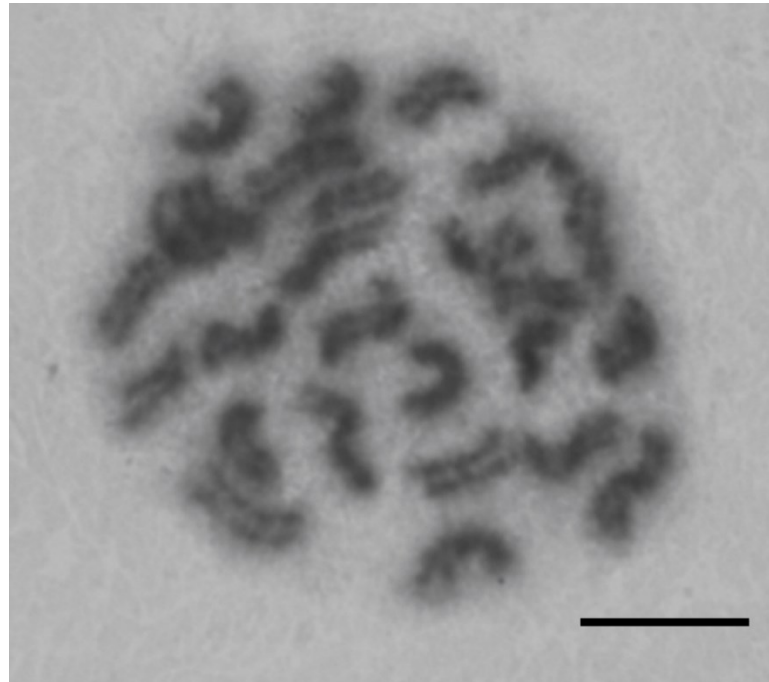


Obrázek 22 – *Ero aphana* samec – karyogram sestavený z meiotické metafáze II, všechny chromozomy jsou akrocentrické, pohlavní chromozomy jsou dva -  $X_1$  a  $X_2$ , chromozomy jsou seřazené sestupně podle velikosti, která plynule klesá. Měřítka je 10  $\mu\text{m}$ .

### *Ero tuberculata*

Na samičí mitóze tohoto druhu je patrných 26 chromozomů pravděpodobně akrocentrické morfologie (viz. Obrázek 23). V důsledku nedostatku meiotických figur u samců pro

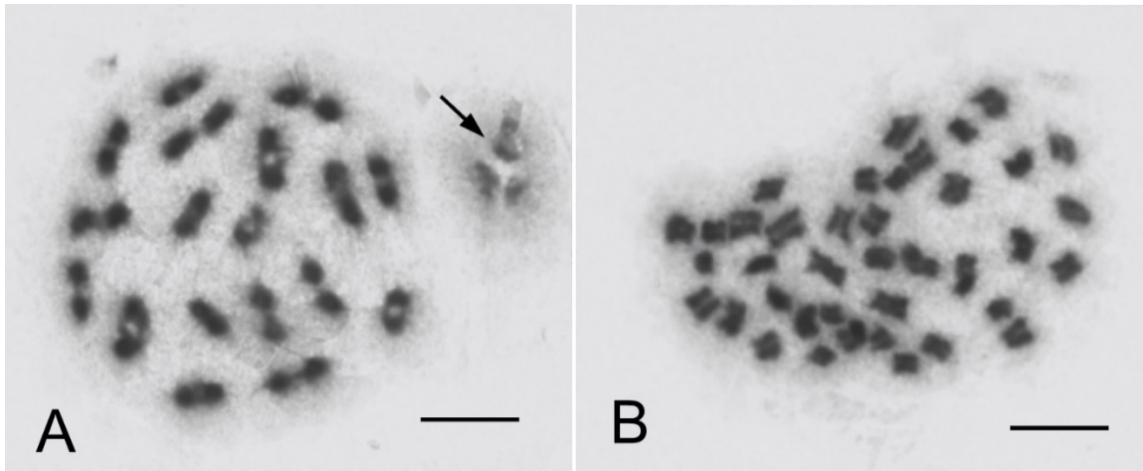
tento druh je tato figura jediná vhodná pro potřeby cytogenetické analýzy. Tento počet však odpovídá předpokládanému schématu 11 autozomálních párů s pohlavním systémem  $X_1X_20$ .



Obrázek 23 – *Ero tuberculata* samice – chromozomová figura, mitotická metafáze, zřetelných 26 chromozomů pravděpodobné akrocentrické morfologie. Měřítko je 10  $\mu\text{m}$ .

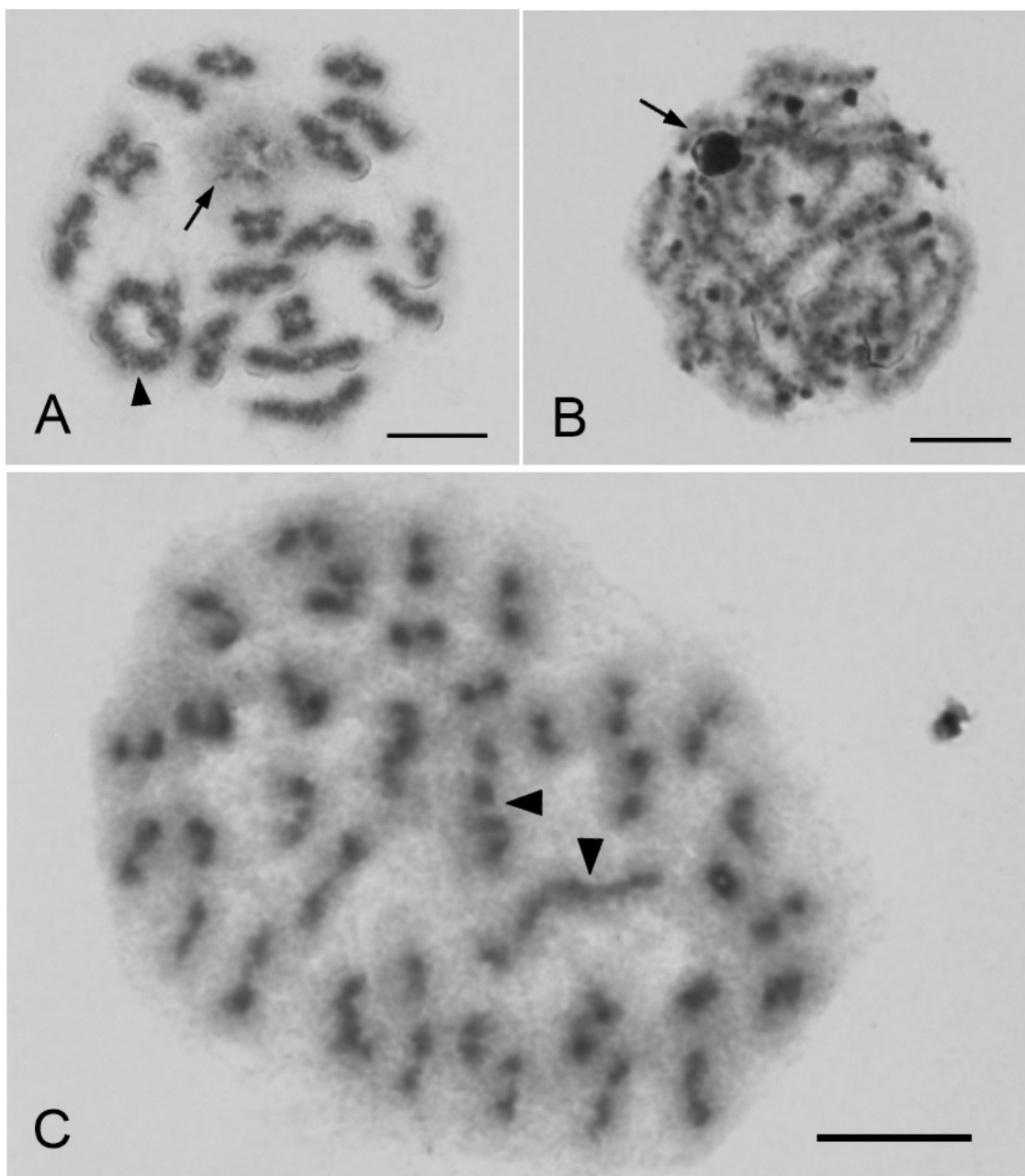
### *Mimetus laevigatus*

Diploidní počet chromozomů je 39 v případě samců, autozomových párů je 18 (viz. Obrázek 24, fig. A), systém pohlavních chromozomů  $X_1X_2X_30$ . Všechny chromozomy jsou akrocentrické morfologie (viz. Obrázek 24, fig. B). V případě tohoto druhu byl pozorován heterozygot pro translokaci jednoho z chromozomů, formující v meioze I trivalent (Obrázek 25, fig. A), morfologie sfúzovaného chromozomu nebyla z dostupných figur zcela zřetelná. Karyotyp tohoto druhu je tedy  $2n^{\text{♂}} = 39, X_1X_2X_30$  (potvrzen u dvou jedinců, v případě jedince s translokací  $2n^{\text{♂}} = 38, X_1X_2X_30$  (viz. Obrázek 25). Pohlavní chromozomy vykazovaly silně pozitivní heteropyknozu v pachytene, v pozdějších stádiích meiozy byly naopak silně podspiralizované (viz. Obrázek 25, fig. C).



Obrázek 24 – *Mimetus laevigatus* samec – chromozomové figury, (A) metafáze I – patrných 18 autozomálních párů, šipka ukazuje na skupinu tří pohlavních chromozomů X (B) spermatogoniální mitoza – metafáze – je pozorovatelných všech 39 chromozomů, pohlavní chromozomy nelze odlišit Měřitko u všech figur je 10  $\mu\text{m}$ .

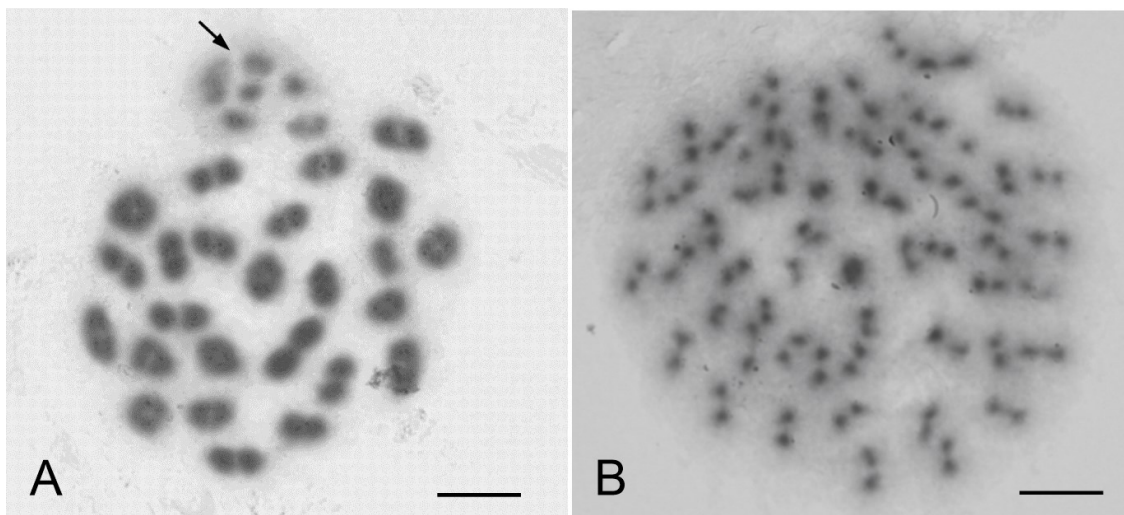




Obrázek 25 – *Mimetus laevigatus* samec – jedinec s translokací dvou auzozomálních chromozomů – chromozomové figury, (A) diakineze/metafáze I – patrných 18 autozomálních párů, dlouhá šipka ukazuje na skupinu tří pohlavních chromozomů X, kratší šipka ukazuje na fúzovaný chromozom (B) pachytene, patrná pozitivní heteropyknoza pohlavních chromozomů (označených šipkou) a centromer autozomálních párů (C) metafáze II – patrných 37 chromozomů, všechny akrocentrické morfologie. Měřítko u všech figur je 10 μm.

### *Mimetus* sp. (Namibie)

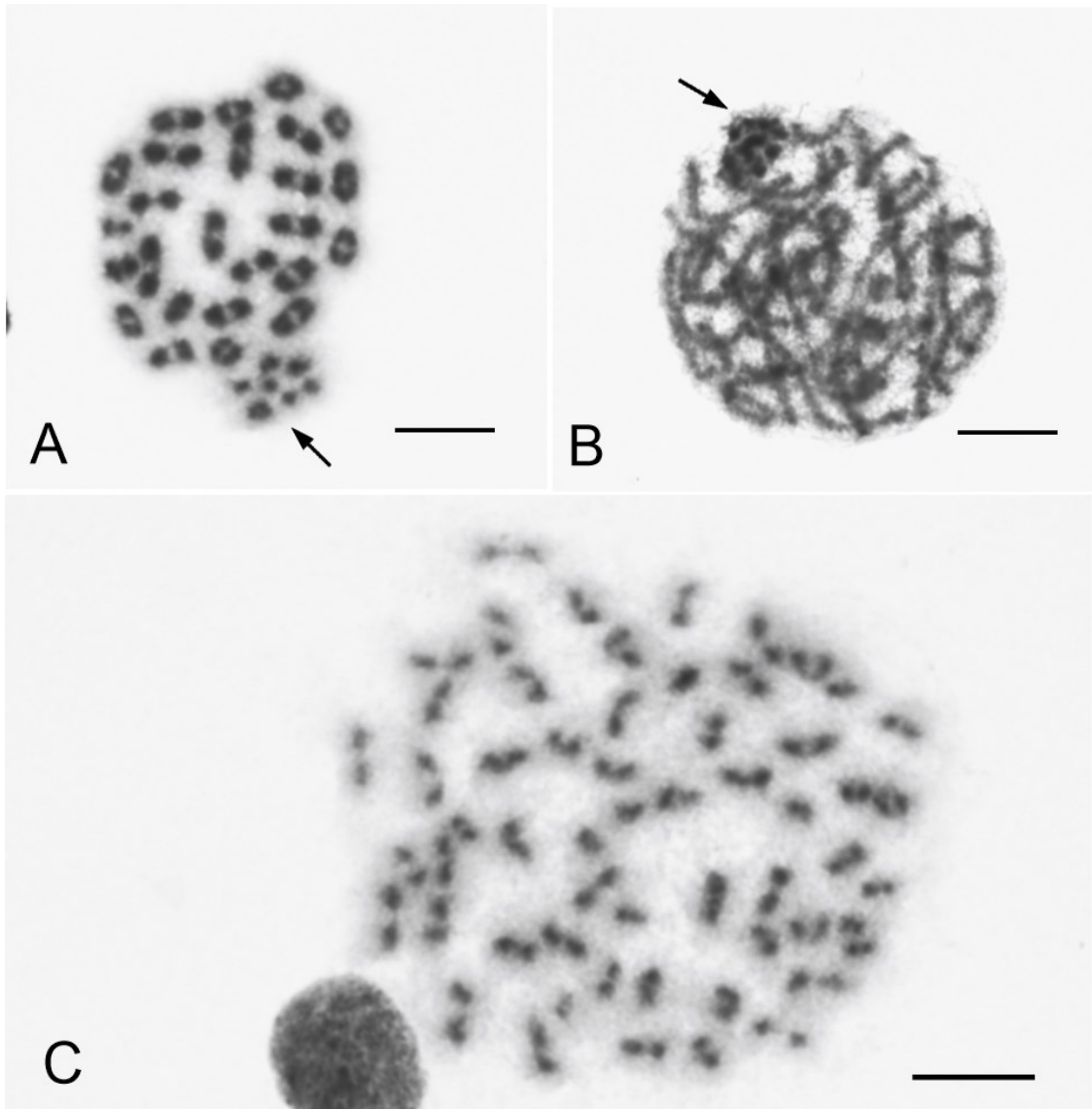
Diploidní počet chromozomů je 57 v případě samců, autozomových párů je 26 (viz. Obrázek 26, fig. A), systém pohlavních chromozomů  $X_1X_2X_3X_4X_50$ . Všechny chromozomy jsou pravděpodobně akrocentrické morfologie (viz. Obrázek 26, fig. B).



Obrázek 26 – *Mimetus* sp. Namibie samec – chromozomové figury, (A) metafáze I – patrných 26 autozomálních párů, šipka ukazuje na skupinu pěti pohlavních chromozomů X (B) metafáze II – pravděpodobně kompletní figura obsahující všech 57 chromozomů akrocentrické morfologie. Měřítka u všech figur je 10  $\mu$ m.

### ***Mimetus* sp. (Jihoafrická republika)**

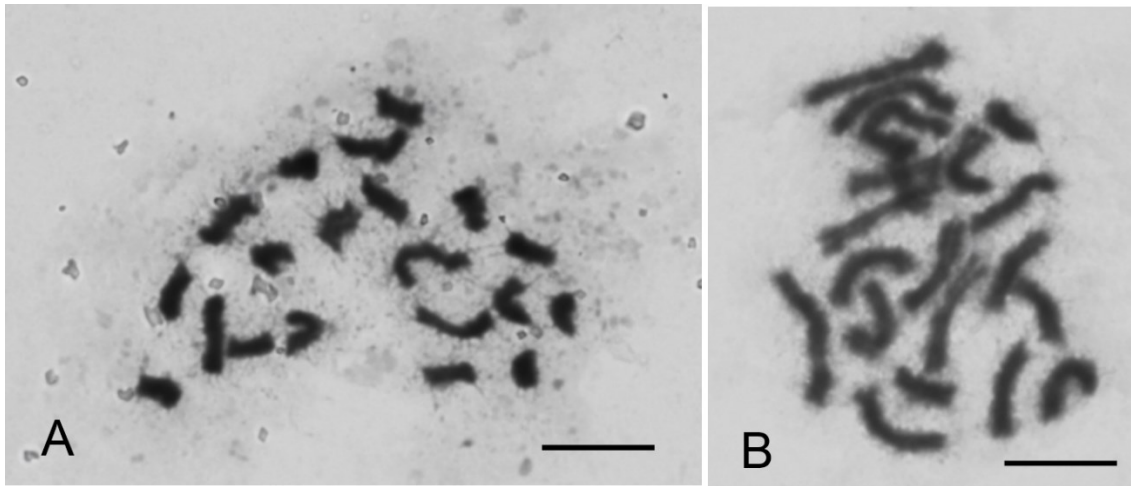
Diploidní počet chromozomů je 57 v případě samců, autozomových párů je 25 (viz. Obrázek 27, fig. A), systém pohlavních chromozomů  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_70$ . Všechny chromozomy jsou pravděpodobně akrocentrické morfologie (viz. Obrázek 27, fig. C). Pohlavní chromozomy jsou během pachytene heteropyknotické a asociují spolu na okraji figur (viz. Obrázek 27, fig. B).



Obrázek 27 – *Mimetus* sp. JAR samec – chromozomové figury, (A) metafáze I – patrných 26 autozomálních párů, šipka ukazuje na skupinu sedmi pohlavních chromozomů X (B) pachytene se zřetelnou pozitivní heteropyknozou pohlavních chromozomů (C) metafáze II – pravděpodobně kompletní figura obsahující všech 57 chromozomů akrocentrické morfologie. Měřítko u všech figur je 10  $\mu$ m.

### ***Mimetus* sp. (USA)**

V případě tohoto druhu byl studován jeden jedinec samičího pohlaví. Na mitotických figurách je patrných 20 chromozomů (viz. Obrázek 28). Všechny pravděpodobně akrocentrické morfologie. Pohlavní chromozomy nelze z pozorovaných figur odlišit.



Obrázek 28 – *Mimetus* sp. USA samice – chromozomové figury, (A) mitotická metafáze, (B) mitotická metafáze, obě figury jsou v jiném stadiu kondenzace, z čehož plynou velikostní rozdíly u jednotlivých figur. Měřítka u všech figur je 10 µm.

## 5.2. Metody molekulární analýzy

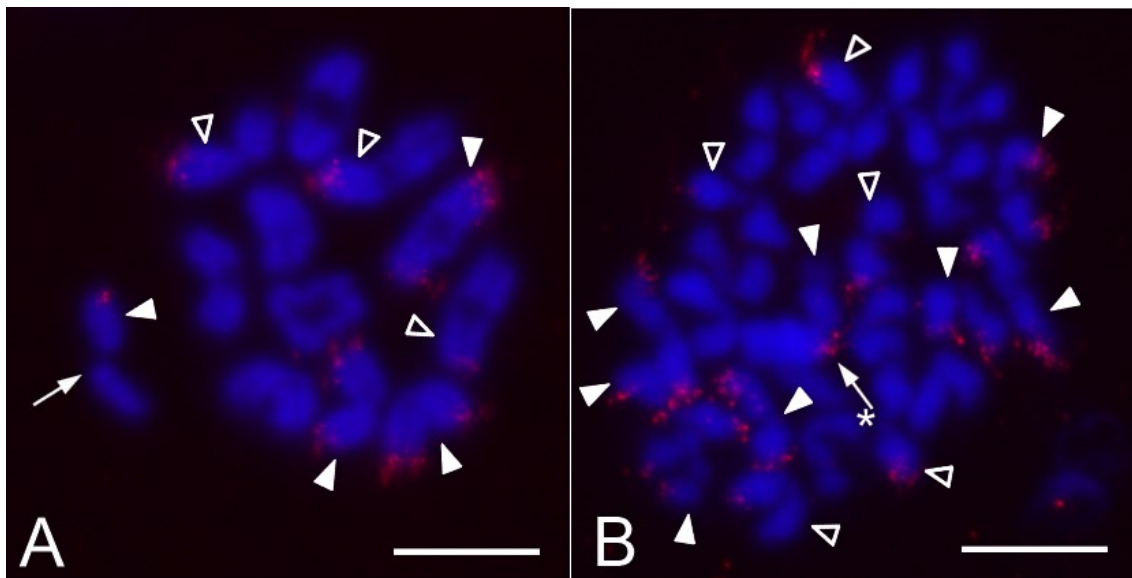
### 5.2.1. FISH

Araneidae

18S rRNA

*Araniella cucurbitina*

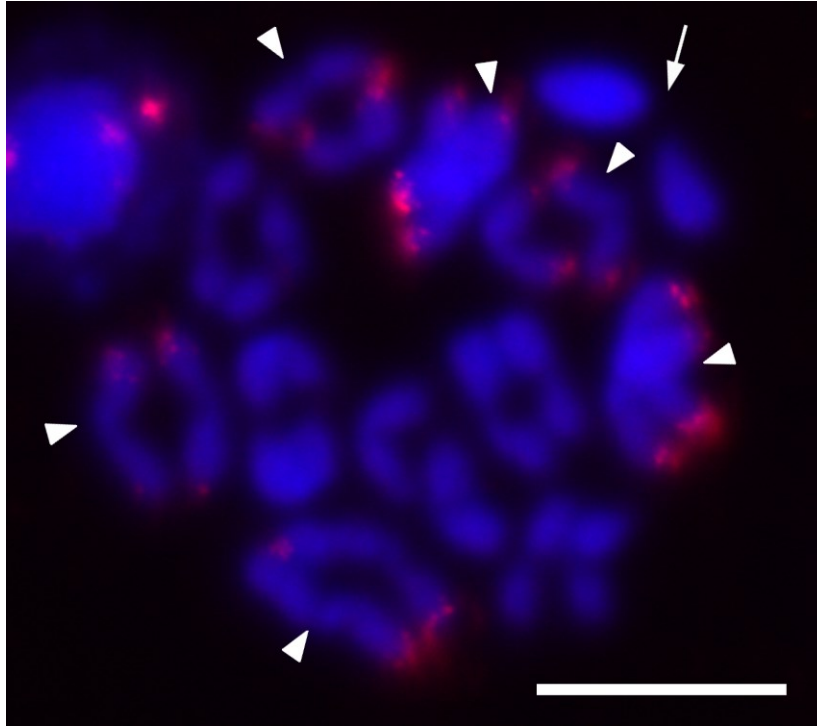
Byly pozorovány signály na 6 autozomálních párech a jednom z chromozomů X (viz. Obrázek 29, fig. A). Všechny signály vycházejí z distálních částí q ramének akrocentrických chromozomů (viz. Obrázek 29, fig. B). Na některých chromozomech se zdá být signál heteromorfní – tedy vycházející pouze z jedné chromatidy.



Obrázek 29 – *Araniella cucurbitina* samec – 18S rDNA FISH, (A) diakineze/metafáze I – dlouhá šipka ukazuje na pár pohlavních chromozomů, z nichž jeden nese signál, zbylé šipky ukazují na páry chromozomů nesoucí signál (B) metafáze II – je patrných všech 13 chromozomů nesoucích signál v distální části, dlouhá šipka označená hvězdičkou označuje pravděpodobnou lokalizaci X chromozomu nesoucího signál, nelze však určit s jistotou, zbylé šipky ukazují na chromozomy nesoucí signál. Krátké šipky bez výplně u obou figur označují chromozomy nesoucí heteromorfní signály. Měřítka u všech figur je 10  $\mu$ m.

*Eriophora* sp.

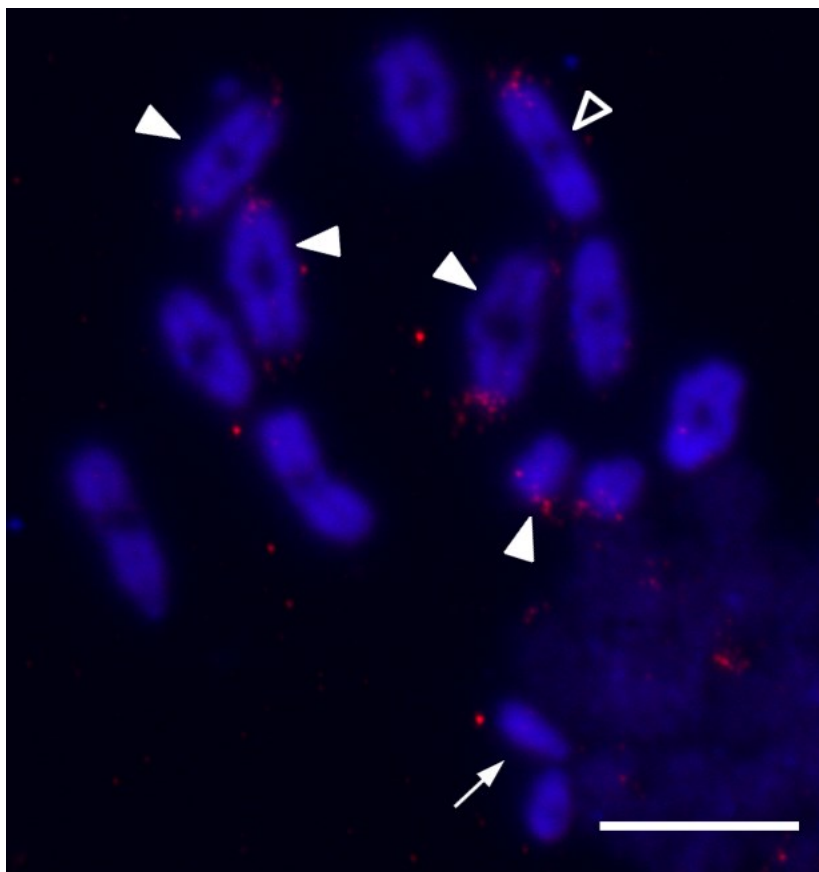
Byly pozorovány signály na 6 autozomálních párech, všechny signály jsou v distální části q raménka akrocentriků (viz. Obrázek 30).



Obrázek 30 – *Eriophora* sp. samec – 18S rDNA FISH, pozdní metafáze I – dlouhá šipka ukazuje na pár pohlavních chromozomů, zbylé šipky ukazují na segregující bivalenty nesoucí signály v distálních oblastech. Měřítko je 10  $\mu$ m.

### ***Gibbaranea bituberculata***

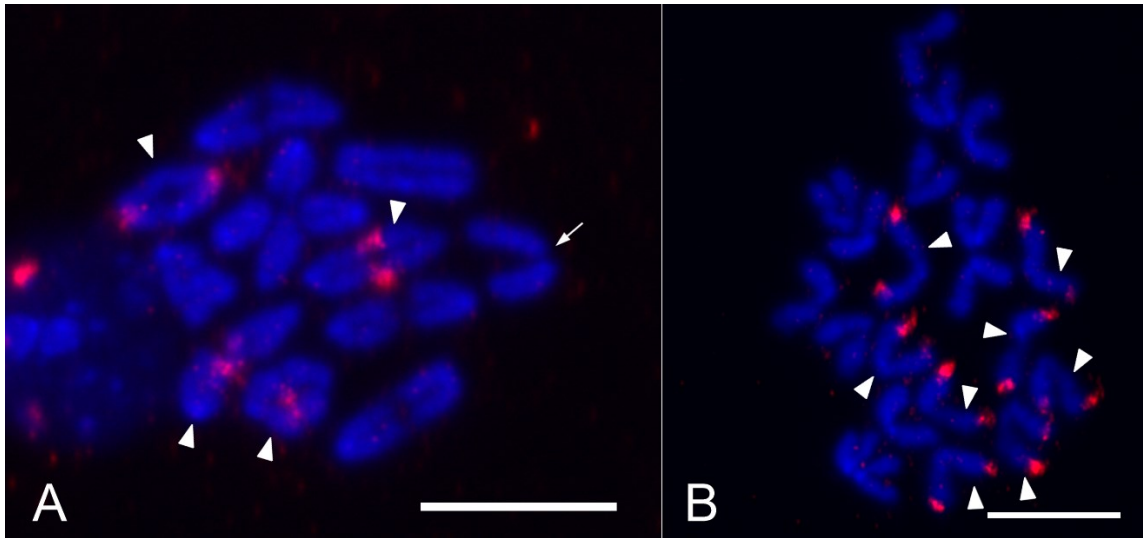
Byly pozorovány signály na 5 autozomálních párech (viz. Obrázek 31), signál se v případě jednoho páru zdá být heteromorfní, může se však jednat pouze o artefakt způsobený slabším signálem vycházejícím z jednoho z dlouhých ramének. Většina signálů prokazatelně vychází z distální části dlouhých ramének. Pohlavní chromozomy signál nenesou.



Obrázek 31 – *Gibbaranea bituberculata* samec – 18S rDNA FISH, metafáze I – dlouhá šipka ukazuje na pár pohlavních chromozomů, zbylé šipky ukazují na páry chromozomů nesoucí signál. Šipka bez výplně označuje chromozomy nesoucí heteromorfní signál. Měřítko je 10  $\mu\text{m}$ .

### *Nuctenea umbratica*

Byly pozorovány signály na 4 autozomálních párech (viz. Obrázek 32, fig. A). Všechny signály vycházejí z distální oblasti q ramének. (viz. Obrázek 32, fig. B)

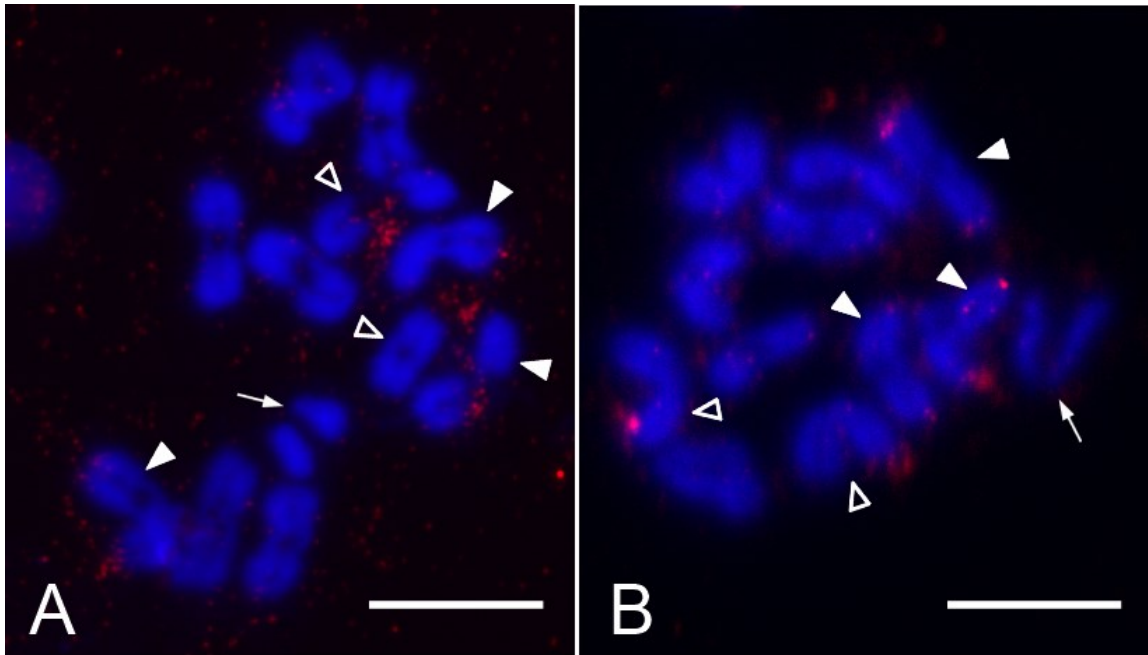


Obrázek 32 – *Nuctenea umbratica* samec – 18S rDNA FISH (A) metafáze I – dlouhá šipka ukazuje na pár pohlavních chromozomů, zbylé šipky ukazují na páry chromozomů nesoucí signál (B) nekompletní figura metafáze II – chromozomy nesoucí signál jej mají na koncích dlouhého raménka (celkem 8 chromozomů označených šipkou). Měřítko u všech figur je 10

### *Araneus marmoreus*

Byly pozorovány signály na 5 autozomálních párech (viz. Obrázek 33), některé signály se opět stejně jako u *Araniella cucurbitina* a *Gibbaranea bituberculata* zdají být heteromorfní, může se však jednat o artefakt způsobený nedostatečnou silou signálu. Signály vycházejí z distální oblasti q ramének. Pohlavní chromozomy jsou bez signálu.



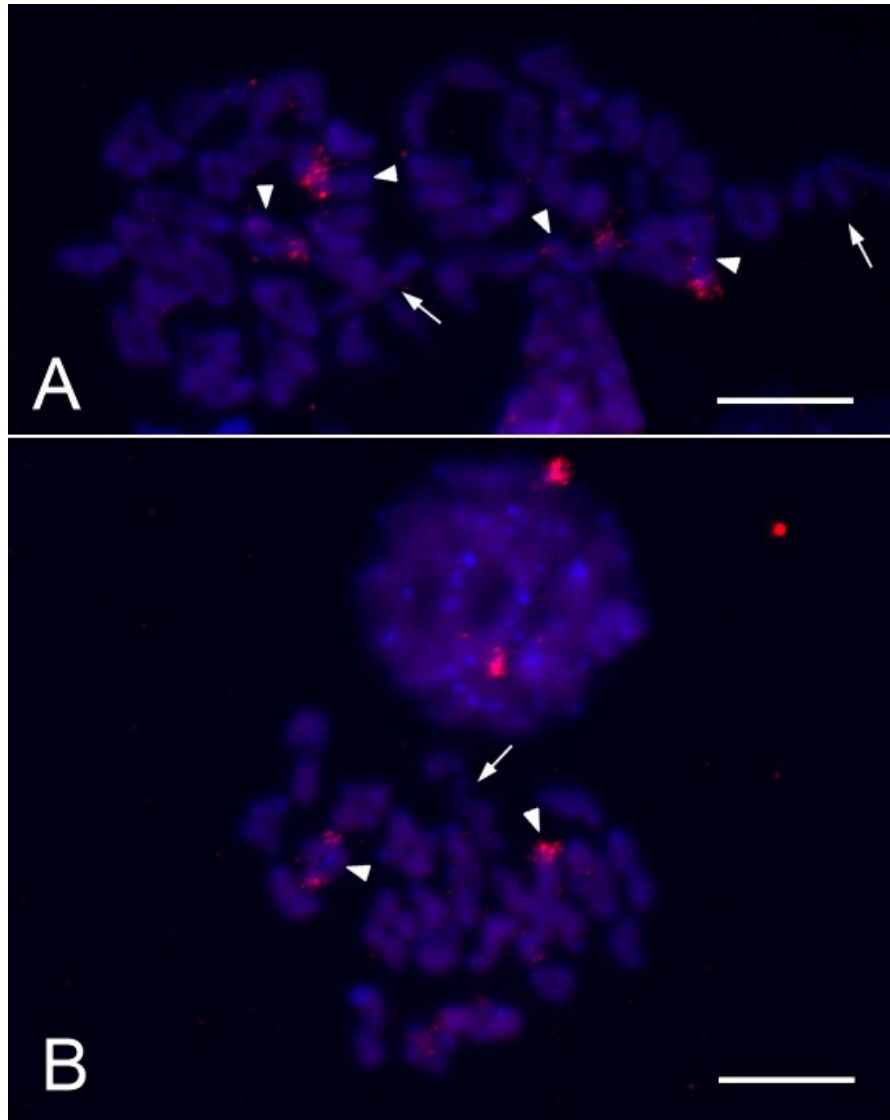


Obrázek 33 – *Araneus marmoreus* samec – 18S rDNA FISH (A) metafáze I – dlouhá šipka ukazuje na pár pohlavních chromozomů, zbylé šipky ukazují na páry chromozomů nesoucí signál (B) metafáze I – dlouhá šipka ukazuje na pár pohlavních chromozomů, zbylé šipky ukazují na páry chromozomů nesoucí signál. Krátké šipky bez výplně u obou figur označují chromozomy nesoucí heteromorfní signál. Měřítko u všech figur je 10  $\mu\text{m}$ .

### *Araneus uyemurai*

Signály jsou na 2 autozomálních párech. Pohlavní chromozomy signál nenesly.

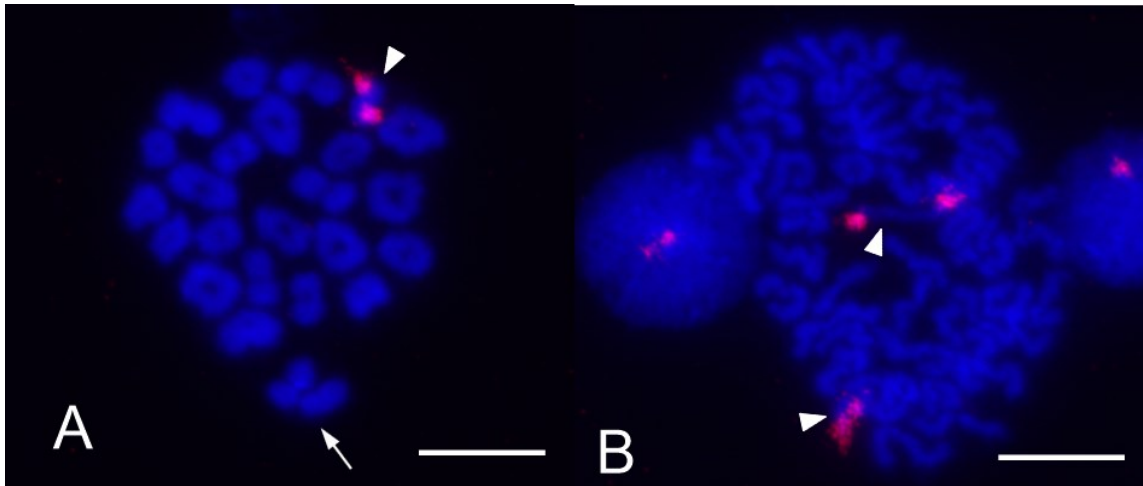
(viz. Obrázek 34, fig. A), počet signálů podporuje i pozorování pachytenních figur, kde je patrné, že minimálně jeden lokus je na distálním konci q raménka (viz. Obrázek 34, fig. B) druhý lokus je v terminální oblasti chromozomu.



Obrázek 34 – *Araneus uyemurai* samec – 18S rDNA FISH (A) dvě diakineze, dlouhé šipky ukazují domnělou polohu trojice pohlavních chromozomů, zbylé šipky ukazují na páry chromozomů nesoucí signál v koncových oblastech chromozomů (B) v horní části časná pachytene – 2 signály uvnitř jádra, horní signál umístěn na distální části q raménka, pod ním je nekompletní diakineze – dlouhá šipka ukazuje na pohlavní chromozomy, zbylé šipky ukazují na páry chromozomů nesoucí signál. Měřítko u všech figur je 10  $\mu$ m.

### *Araneus ventricosus*

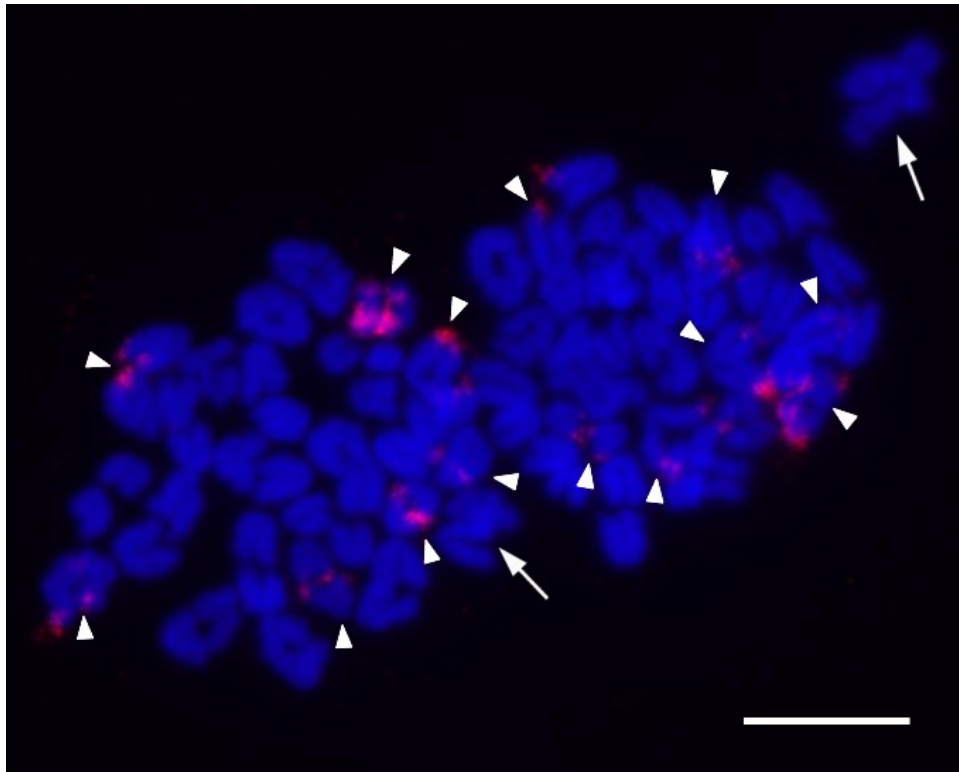
V případě tohoto druhu byl pozorován NOR pouze na jednom z autozomálních párů (viz. Obrázek 35, fig. A). Signály vycházely z distálních konců dlouhých ramének (viz. Obrázek 35, fig. B). Pohlavní chromozomy signál nenesou.



Obrázek 35 – *Araneus ventricosus* samec – 18S rDNA FISH (A) metafáze I – dlouhá šipka označuje skupinu pohlavních chromozomů, malá šipka ukazuje na pár chromozomů nesoucí signál. (B) metafáze II – šipky označují chromozomy nesoucí signál. Měřítko všech figur je 10  $\mu\text{m}$ .

### *Araneus angulatus*

V případě tohoto druhu se figury často prolínaly, či nebyly kompletní. Pozorováno bylo s největší pravděpodobností 7 autozomálních loci (viz. Obrázek 36). Některé ze signálů jsou pozorovatelné na distálních koncích dlouhých ramének, u dvou loci se nepodařila poloha spolehlivě určit. Pohlavní chromozomy signál nenesou.

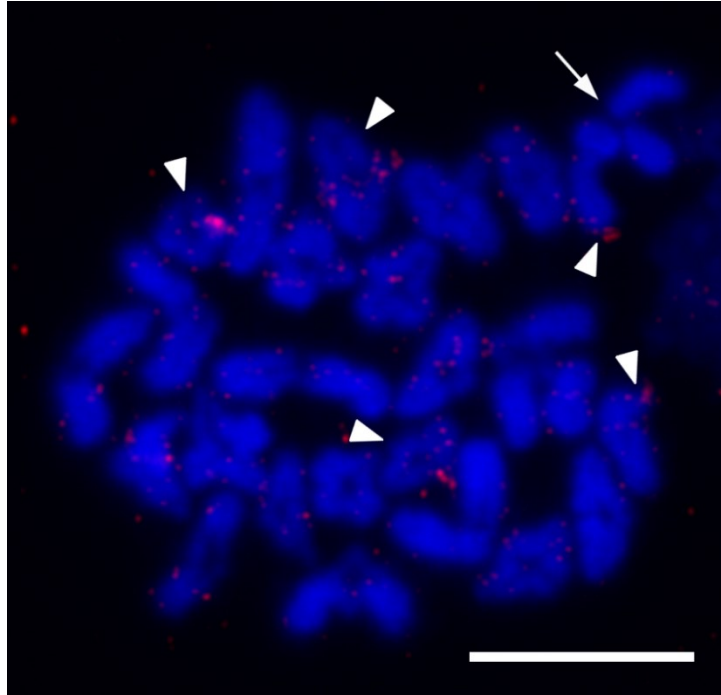


Obrázek 36 – *Araneus angulatus* samec – 18S rDNA FISH, dvě metafáze I – dlouhé šipky označují skupinu pohlavních chromozomů, zbylé šipky ukazují na páry chromozomů nesoucí signál. Měřítko je 10  $\mu\text{m}$ .

## 5S rRNA

### *Araneus angulatus*

Preparát měl silnější fluorescenční pozadí, tato sonda je stále v procesu optimalizace. Bylo detekováno pravděpodobně 6 signálů, 5 na autozomálních párech a jeden signál na chromozomu  $X_1$  (viz. Obrázek 37).



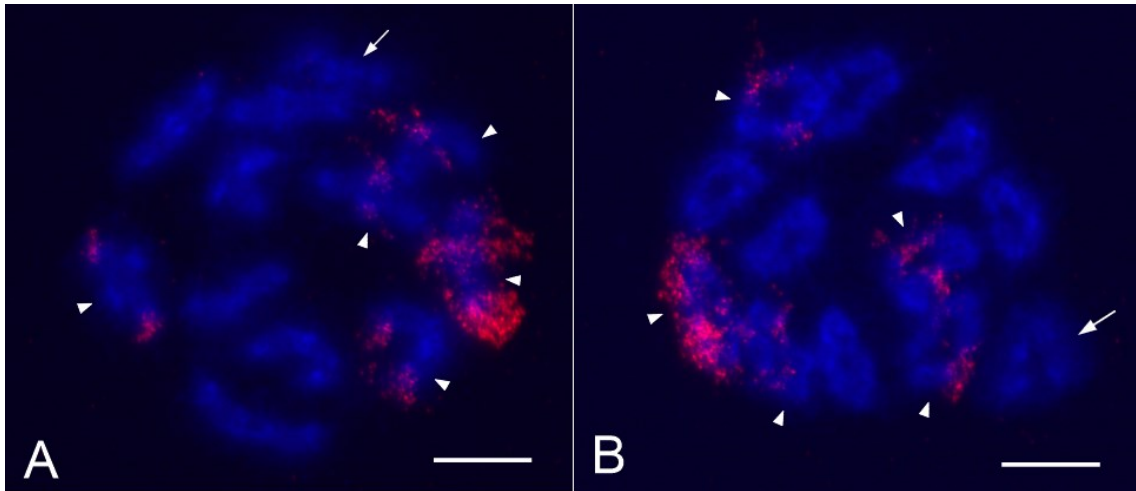
Obrázek 37 – *Araneus angulatus* samec – 5S rDNA FISH, diakineze/metafáze I – dlouhá šipka ukazuje na skupinu pohlavních chromozomů, zbylé šipky ukazují na páry chromozomů nesoucí signál. Měřítko je 10  $\mu$ m.

## **Mimetidae**

### ***Ero aphana***

#### **18S rRNA**

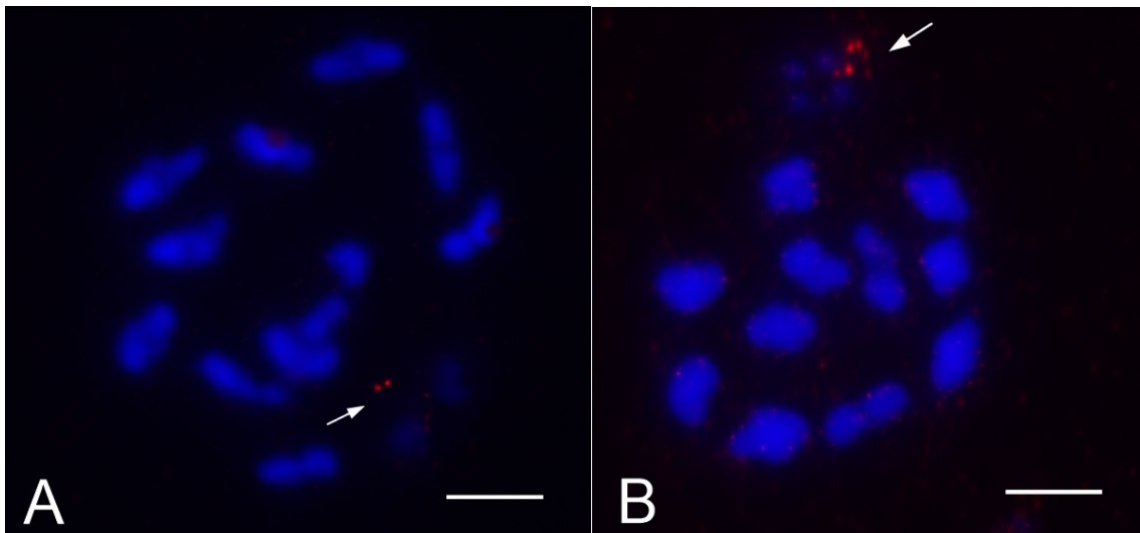
Byly detekovány signály na 5 párech autozomů, na dvou párech vychází signály z distálních konců dlouhých ramének, v případě dvou loci se přesnou polohu signálu nepodařilo určit a u jednoho páru s nejintenzivnějšími signály se nachází signál pravděpodobně na obou koncích chromozomu (viz. Obrázek 38). Pohlavní chromozomy signál nenesly.



Obrázek 38 – *Ero aphana* samec – 18S rDNA FISH (A) metafáze I – dlouhá šipka ukazuje na  $X_1X_2$  bez signálu, zbylé šipky ukazují na páry chromozomů nesoucí signál. (B) diakineze - dlouhá šipka ukazuje na pár pohlavních chromozomů, zbylé šipky ukazují na páry chromozomů nesoucí signál. Měřítko je 10  $\mu\text{m}$ .

### 5S rRNA

Byl detekován 1 signál, lokalizovaný na pohlavním chromozomu (viz. Obrázek 39), patrně jde o signál lokalizovaný poblíž centromerické oblasti chromozomu.

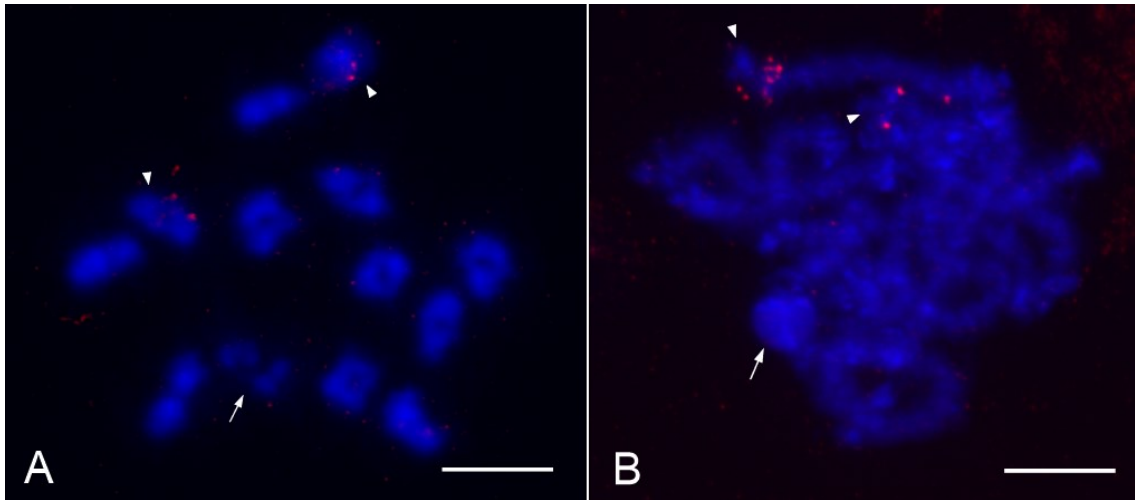


Obrázek 39 – *Ero aphana* samec – 5S rDNA FISH (A) metafáze I – šipka ukazuje na pohlavní chromozomy, z nichž jeden nese signál. (B) diakineze/metafáze I - šipka ukazuje na pohlavní chromozomy, jeden z nich nesoucí signál. Měřítko je u všech figur 10  $\mu\text{m}$ .

### U2 snRNA

Byly detekovány 2 signály na autozomálních párech (viz. Obrázek 40, fig. A), jeden ze

signálů vychází z subterminální části chromozomu, poloha druhého lokusu nebyla spolehlivě stanovena (viz. Obrázek 40, fig. B).

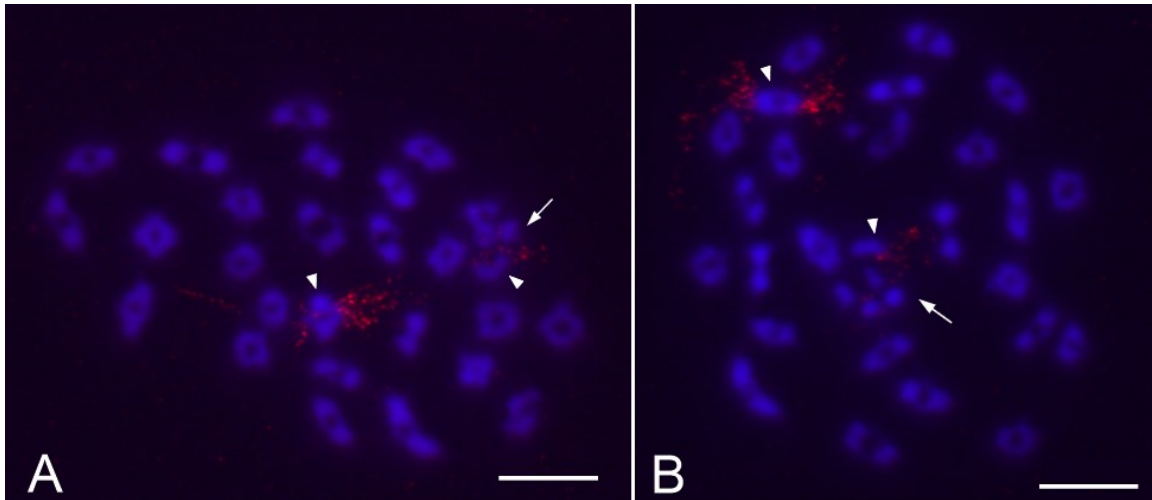


Obrázek 40 – *Ero aphana* samec – U2 snRNA FISH (A) metafáze I – dlouhá šipka ukazuje na pár pohlavních chromozomů, kratší šipky označují autozomální bivalenty nesoucí signál. (B) pachytene – dlouhá šipka ukazuje na pozitivně heteropyknotický sex vesicle tvořený X chromozomy, kratší šipky označují signály vycházející z autozomálních párů. Měřítka je u všech figur 10  $\mu\text{m}$ .

### ***Mimetus* sp. (Namibie)**

#### **18S rRNA**

Byly detekovány 2 loci, jeden vycházející z opticky největšího z chromozomů X, druhý detekovaný lokus vycházel z autozomálních párů (viz. Obrázek 41).

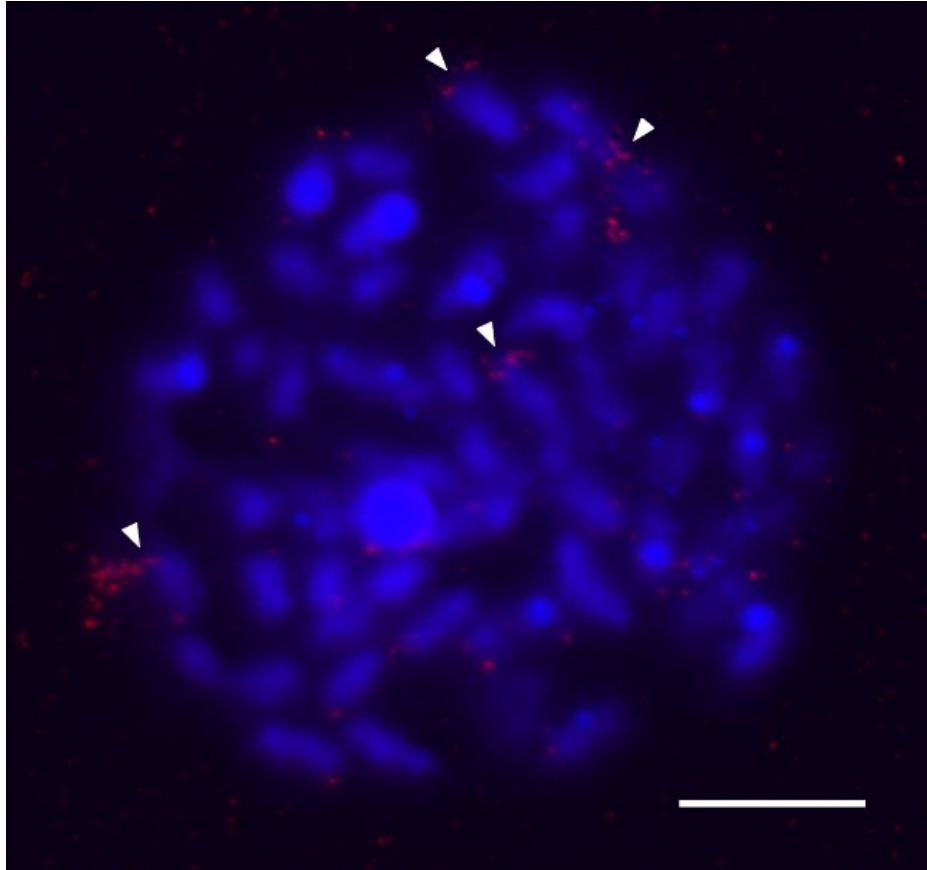


Obrázek 41 – *Mimetus* sp. Namibie samec – 18S rDNA FISH (A) nekompletní metafáze I (chybí jeden autozomální pár) – dlouhá šipka ukazuje na skupinu pohlavních chromozomů, jeden z pohlavních chromozomů nese signál označený kratší šipkou, zbylá krátká šipka ukazuje na jeden autozomální pár nesoucí signál. (B) metafáze I – dlouhá šipka ukazuje na skupinu pohlavních chromozomů, jeden z pohlavních chromozomů nese signál označený kratší šipkou, zbylá krátká šipka ukazuje na jeden autozomální pár nesoucí signál. Měřítko je 10  $\mu$ m.

### 5S rRNA

Pozorované figury byly nízké kvality a měly vysoké fluorescenční pozadí, byly pozorovány 4 pravděpodobně autozomální signály (viz. Obrázek 42).



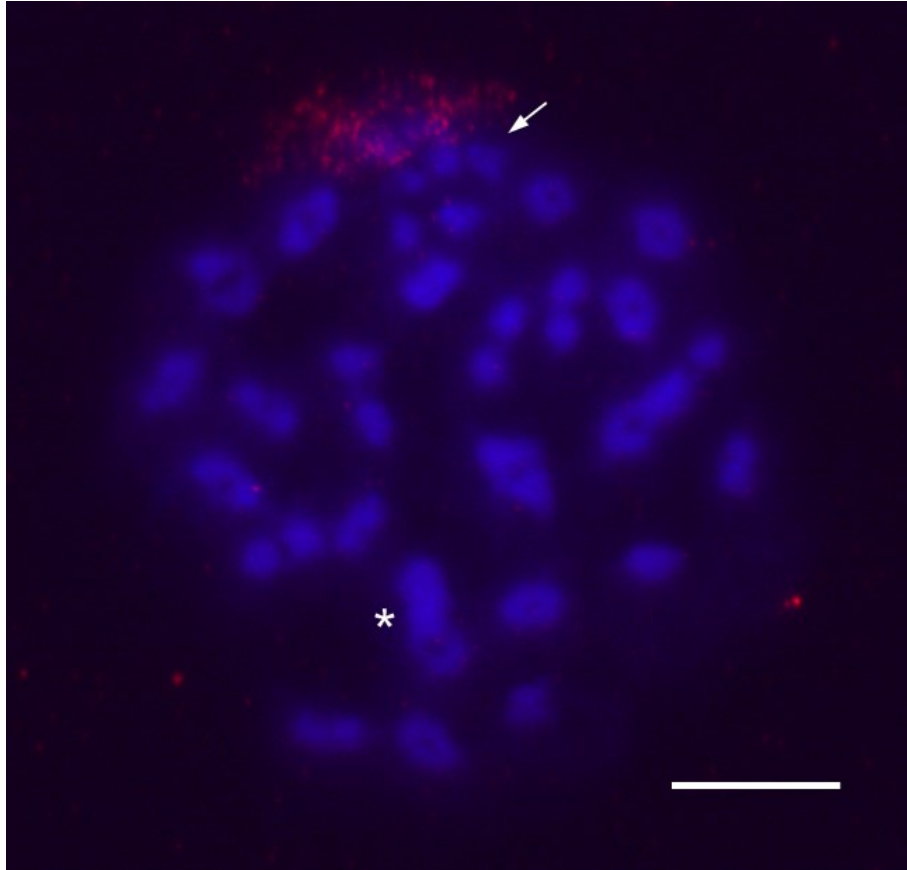


Obrázek 42 - *Mimetus* sp. Namibie samec – 5S rDNA FISH, metafáze II – šipky ukazují na páry chromozomů nesoucí signál, šipka označená hvězdičkou ukazuje na možný signál, může se však jednat o artefakt kvůli rozšíření signálu ze sousedního chromozomu. Měřítko je 10  $\mu\text{m}$ .

### ***Mimetus* sp. (JAR)**

#### **18S rRNA**

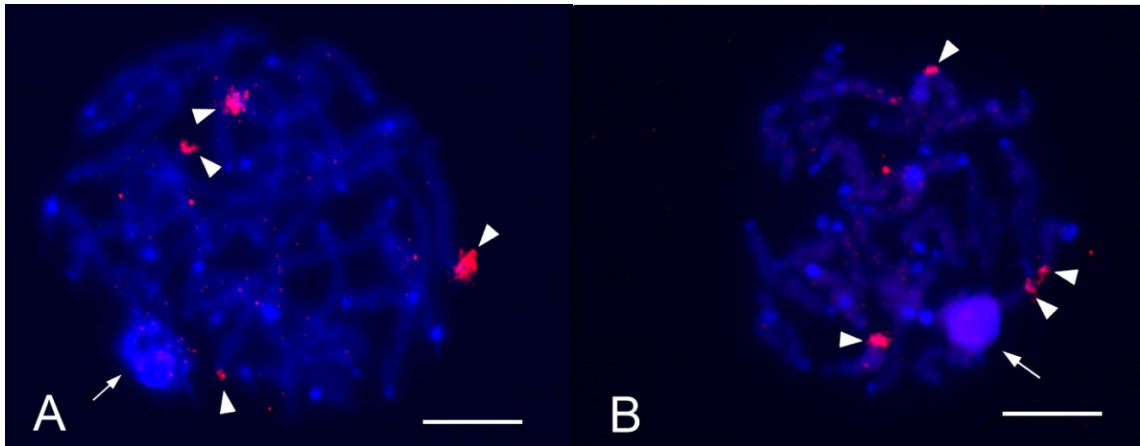
Signály vycházejí pouze ze skupiny pohlavních chromozomů (viz. Obrázek 43), přesný počet chromozomů X nesoucích NOR nelze z pozorovaných figur určit s jistotou. Pravděpodobně se jedná o 2 nebo 3 gonozomy.



Obrázek 43 – *Mimetus* sp. JAR samec – 18S rDNA FISH, časná metafáze I - figura je kompletní, dva bivalenty ve spodní části figury se překrývají (označené hvězdičkou), šipka ukazuje na skupinu pohlavních chromozomů, ze kterých vychází signál. Měřítko je 10  $\mu$ m.

### 5S rRNA

Byly detekovány 4 loci na autozomálních párech (viz. Obrázek 44, fig. A). Z polohy centromer lze usuzovat distální polohu většiny z nich (viz. Obrázek 44, fig. B).

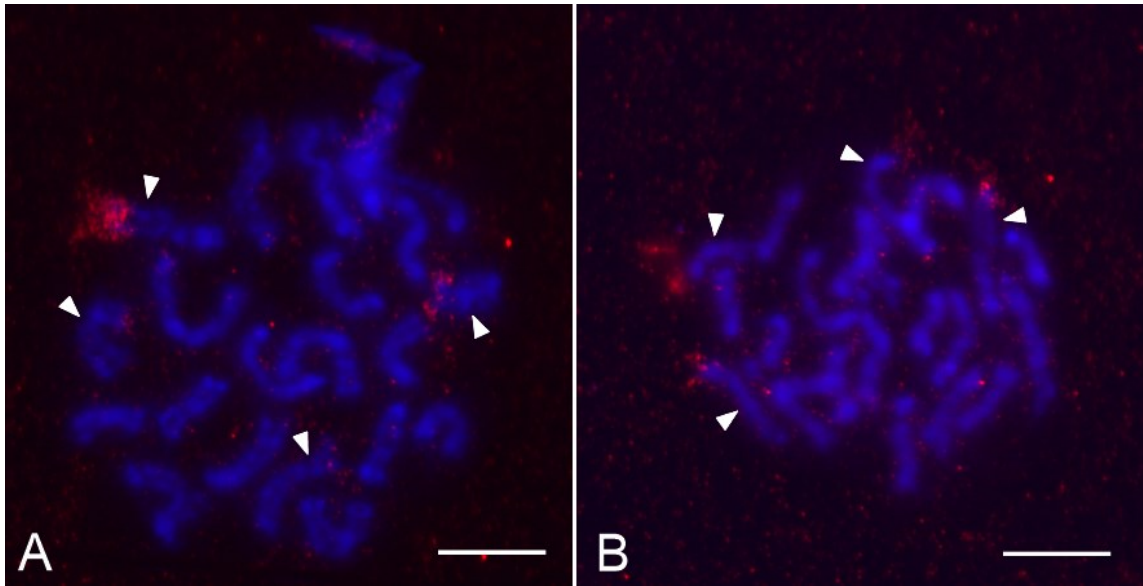


Obrázek 44 – *Mimetus* sp. JAR samec – 5S rDNA FISH (A) pachytene– dlouhá šipka ukazuje na pozitivně heteropyknotickou skupinu pohlavních chromozomů, kratší šipky označují signály na autozomech, centromery jsou intenzivněji podbarveny DAPI (B) pozdní pachytene– dlouhá šipka ukazuje na pozitivně heteropyknotickou skupinu pohlavních chromozomů, kratší šipky označují signály na autozomech. U obou figur je patrná pozitivní heteropyknoza centromer. Měřítka je u všech figur 10  $\mu$ m.

### ***Mimetus* sp. (USA)**

#### **18S rRNA**

V případě tohoto druhu byla dostupná pouze skla z jedince samičího pohlaví, vyhodnocovány tedy byly mitotické figury, ze kterých nejdou rozlišit pohlavní chromozomy ani poloha centromery. Signál byl detekovaný na 2 párech. Obě loci se necházely v terminálních oblastech chromozomu (viz. Obrázek 45).



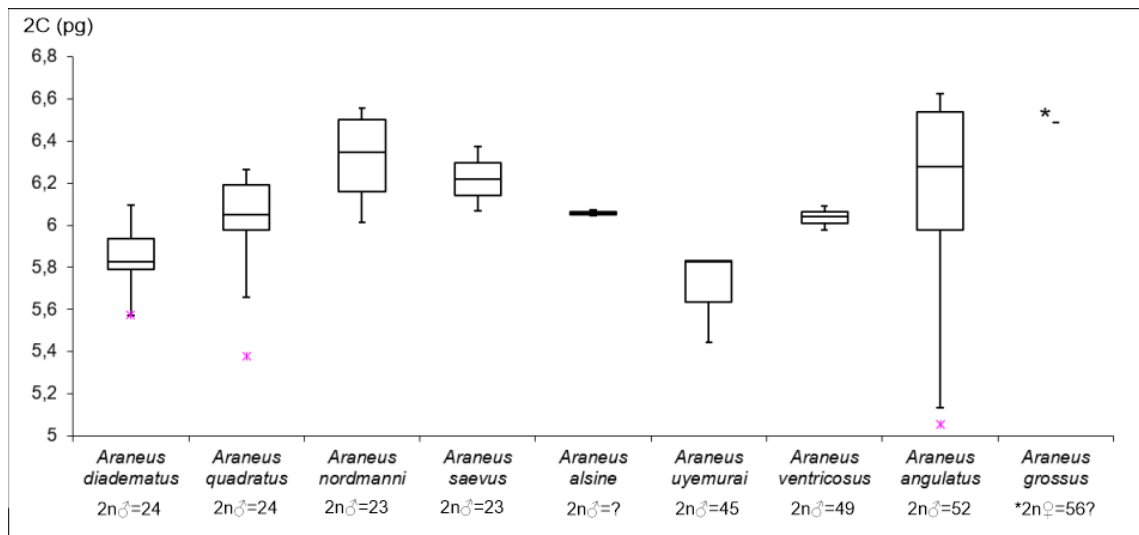
Obrázek 45 – *Mimetus* sp. USA samice – 18S rDNA FISH (A) mitotická metafáze – šipkami jsou označeny 4 signály (B) mitotická metafáze – šipkami označeny 4 signály. Měřítka je u všech figur 10  $\mu$ m.

## 5.2.2 Průtoková cytometrie

Metoda průtokové cytometrie byla použita u k měření velikosti genomu a stanovení poměru bází v genomu. Pro každé měření byl vzorek připraven s dvěma různými fluorescenčními barvivou PI a DAPI. PI byl použit pro samotné měření velikosti genomu, jelikož látka funguje jako interkalační činidlo a její vazba na DNA není ovlivněna složením bází. DAPI se preferenčně váže na AT (adenin-thymin) bohaté úseky a bylo proto použito pro stanovení poměru GC a AT bází studovaného druhu.

### Araneidae

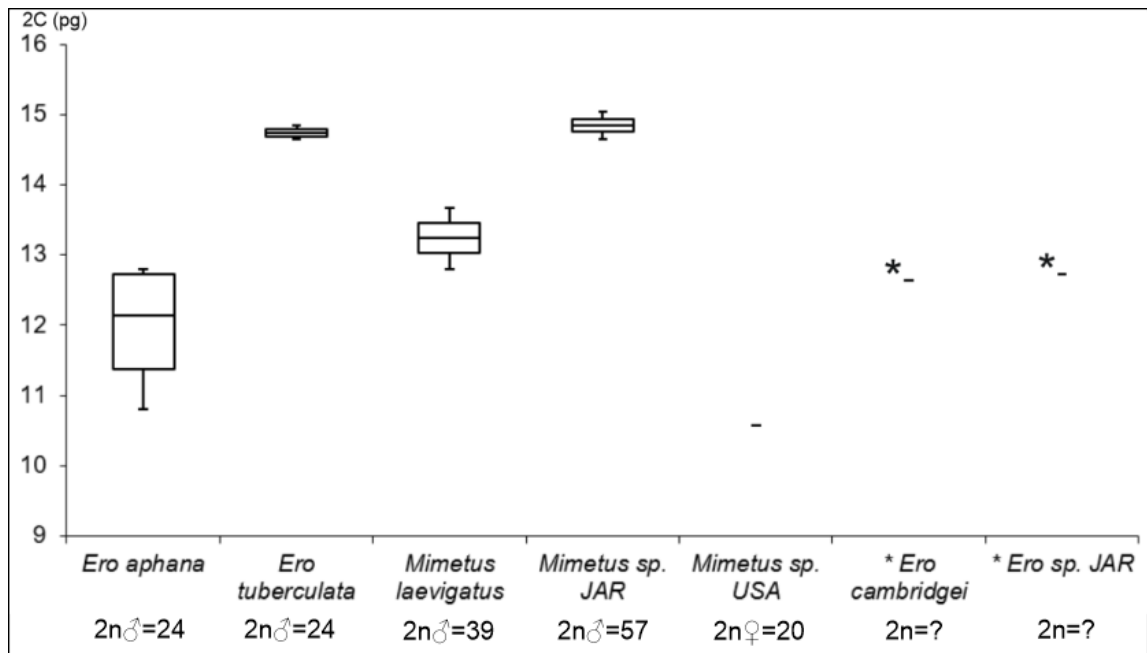
Souhrnná data pro jednotlivé druhy lze najít viz. Tabulka 5. Průměrná velikost genomu měřených zástupců samčího pohlaví byla  $2C = 6,038$  pg. Poměr bází byl vychýlen ve prospěch AT párů (rozsah 60,663-62,423%). Průměrný poměr bází byl 61,476 % AT. Jediný měřený jedinec samičího pohlaví – *A. grossus* je pouze pro rámcové porovnání s ostatními daty (kvůli rozdílnému počtu pohlavních chromozomů u sameců a samic). Grafické znázornění měřených dat lze vidět na Obrázku 46.



Obrázek 46 – box plot měřených velikostí genomu rodu *Araneus*, všichni měření jedinci byli samčího pohlaví až na *A. grossus* – bod označený hvězdičkou, kde byl jediný měřený jedinec samičího pohlaví. Růžovou barvou znázorněné křížky jsou odlehlé hodnoty (outliers) – tedy hodnoty nižší než  $Q_1 - 1,5 \times IQR$ , pod popisky druhů jsou vyplněné známé hodnoty počtu chromozomů, počty chromozomů u *A.nordmanni* a *A.saevus* převzaty od Filip Pajpach (2018).

## Mimetidae

Souhrnná data pro jednotlivé druhy lze najít viz. Tabulka 5. Průměrná velikost genomu měřených zástupců samičího pohlaví byla  $2C = 13,072$  pg. Průměrná velikost genomu měřených zástupců samčího pohlaví byla  $2C = 12,684$  pg. Průměrný poměr bazí byl 60,296 %: 39,704 % (AT:GC). Většina měřených jedinců byla samičího pohlaví, v případě *Ero cambridgei* a *Ero* sp. JAR šlo o jedince samčího pohlaví a kvůli rozdílné konstituci pohlavních chromozomů oproti samicím jsou data pouze pro hrubé porovnání. Grafické znázornění dat viz. Obrázek 47. V případě zástupců této čeledi byl v mnoha případech použit jeden jedinec na jednu sérii PI/DAPI měření, kvůli malé velikosti hlavohruďi těchto pavouků a jejich horší dostupnosti.



Obrázek 47 – box plot měřených velikostí genomu čeledi Mimetidae, měření jedinci byli samičího pohlaví až na dva druhy označené hvězdičkou *Ero cambridgei* a *Ero sp. JAR*. U druhů, u nichž není viditelný box plot bylo provedeno pouze jedno měření. Pod jmenovkami daných druhů jsou doplněny známé informace o počtu chromozomů.

Taxon Araneidae	Počet měřených jedinců	Počet replikantů PI/DAPI	2C (pg)	SD (±)	GC%	AT%	Standard
<i>Araneus diadematus</i>	3♂	6/6	5,846	0,177	38,363	61,637	BP
<i>Araneus quadratus</i>	3♂	6/6	5,989	0,322	38,409	61,591	BP
<i>Araneus nordmanni</i>	2♂	4/4	6,315	0,251	39,337	60,663	BP
<i>Araneus alsine</i>	1♂	2/2	6,059	0,018	38,896	61,104	BP
<i>Araneus uyemurai</i>	1♂	3/3	5,7	0,22	38,972	61,028	BP
<i>Araneus angulatus</i>	3♂	7/7	6,14	0,597	37,577	62,423	BP
<i>Araneus ventricosus</i>	2♂	3/3	6,037	0,056	38,467	61,533	BP
<i>Araneus saevus</i>	1♂	2/2	6,22	0,215	38,629	61,371	BP
<i>Araneus grossus</i>	1♀	1/1	6,49	-	38,068	61,932	BP
<b>Mimetidae</b>							
<i>Ero aphana</i>	4♀	4/4	11,968	0,955	39,36	60,64	PS
<i>Ero tuberculata</i>	1♀	2/2	14,738	0,137	41,443	58,557	PS
<i>Mimetus laevigatus</i>	1♀	2/2	13,242	0,618	41,043	58,957	PS
<i>Mimetus</i> sp. JAR	1♀	2/2	14,844	0,266	40,29	59,71	PS
<i>Mimetus</i> sp. USA	1♀	1/1	10,571	-	38,057	61,943	PS
<i>Ero cambridgei</i>	1♂	1/1	12,635	-	39,341	60,659	PS
<i>Ero</i> sp. JAR	1♂	1/1	12,732	-	38,391	61,609	PS

Tabulka 5 – tabulka velikostí genomu měřených druhů, 2C – průměrná hodnota velikosti genomu daného druhu v pikogramech SD – směrodatná odchylka, BP – *Bellis perennis* (sedmikráska chudobka), PS – *Pisum sativum* (hrách setý)

## 6. Diskuse

### 6.1. Shrnutí provedených pozorování

V rámci této práce byl studován karyotyp 18 druhů pavouků patřících do nadčeledi Araneoidea. Z 12 studovaných druhů čeledi Araneidae byl karyotyp u 4 druhů stanoven vůbec poprvé. Pro čeleď Mimetidae bylo všech 6 druhů zkoumáno vůbec poprvé. U celkem 12 druhů byl determinován počet NOR pomocí 18S rDNA FISH. 5S rDNA FISH byla detekována u 4 druhů a u jednoho druhu byla tato technika použita i pro detekci U2 snRNA genu. V rámci práce bylo dále provedeno měření velikosti genomu 16 druhů pavouků, v případě 15 druhů poprvé.

### 6.2. Trendy evoluce karyotypu nadčeledi Araneoidea

Ačkoliv mohou cytogenetická data přinést zásadní poznatky pro evoluci pavouků jako takových, je množství získaných dat vzhledem k celkové diverzitě skupiny stále velmi nízké. Studie Araujo et al. (2017) ukazuje, že v době vydání tohoto článku stále chyběla jakákoliv cytogenetická data u 44 pavoučích čeledí. V době psaní této práce chybí při srovnání dat ze Spider Cytogenetic Database (2020) s daty z World Spider Catalog (2020) data dokonce u 49 čeledí. Práce jako Král et al. (2006; 2013) však ukazují, že i s omezeným datasetem lze s pomocí cytogenetických dat získat podporu pro určité fylogenetické scénáře, což platí zejména pro bazální skupiny pavouků, kde je větší diverzita počtu i morfologie chromozomů. Šťáhlavský et al. (2020) však ukazují, že s pomocí cytogenetických dat je možné získat podporu pro určité fylogenetické scénáře i u tak konzervativní skupiny jako jsou Entelegynae.

Entelegynní pavouci jsou karyotypově poměrně konzervativní skupinou s průměrným počtem chromozomů  $2n^{\text{♂}} = 27$  a nejčastěji jednoramennými, akrocentrickými chromozomy (Kořínková a Král, 2013). Předpokládaným ancestrálním stavem je pro Entelegynae  $2n^{\text{♂}} = 42, X_1X_20$  (Král et al., 2011). Jedním z hlavních trendů jejich karyotypové evoluce je snižování diploidního počtu chromozomů při zachování akrocentrické morfologie (Hackman, 1948; Suzuki, 1954; Šťáhlavský et al., 2020). Tato hypotéza vychází z vyššího výskytu větších počtů chromozomů u bazálních skupin



Enetelegynae a také z faktu, že akrocentrické chromozomy se nemohou jednoduše rozpadnout. Při prostém rozpadu by vznikl acentrický fragment, který by se kvůli absenci centromery nenapojil na mikrotubuly během buněčného dělení a došlo by k jeho delecii (Schubert a Lysak, 2011; Šťáhlavský et al., 2020).

Práce Araujo et al. (2015) ukazuje, že karyotyp  $2n^{\sigma} = 24, X_1X_20$  je nejčastějším pozorovaným u pěti čeledí nadčeledi Araneoidea – Araneidae, Linyphiidae, Nephilidae, Nesticidae, Tetragnathidae. V případě Theridiidae je nejčastějším karyotypem  $2n^{\sigma} = 22, X_1X_20$ , ačkoliv karyotyp  $2n^{\sigma} = 24, X_1X_20$  je také u některých zástupců přítomen. Araujo et al. (2015) proto navrhuje, že by  $2n^{\sigma} = 24, X_1X_20$  mohl být ancestrálním karyotypem celé nadčeledi Araneoidea. Autoři však poznamenávají, že je toto tvrzení potřeba podložit pozorováním i u zbylých čeledí této skupiny. Pozorovaná data v této práci u čeledi Araneidae i Mimetidae se zdají být v souladu s touto hypotézou. Fylogeneze podle Kulkarni et al. (2020) však staví skupinu Theridiidae jako nejbazálnější čeleď skupiny Araneoidea, určení ancestrálního počtu nadčeledi by tedy mělo předcházet definitivní určení ancestrálního počtu právě u čeledi Theridiidae. Redukce počtu chromozomů při zachování akrocentrické morfologie se vyskytuje nezávisle u většiny entelegynních čeledí. Mechanismus není zcela znám, pravděpodobně se mohlo jednat o tandemové fúze (Kořínková a Král, 2013).

Co se samotné čeledi Araneidae týče, studie Araujo et al. (2011) ukazuje, že ze 62 studovaných druhů této čeledi jich 50 vykazuje následující karyotyp  $2n^{\sigma} = 24, X_1X_20$ , všechny chromozomy akrocentrické morfologie. Tento karyotyp byl nejčastějším u studovaných zástupců této čeledi i v této práci. Z 12 druhů této čeledi studovaných v této práci byl tento karyotyp pozorován u 8 druhů (Jmenovitě šlo o *C. conica*, *G. bituberculata*, *Singa* sp., *Eriophora* sp., *N. umbratica*, *Araniella cucurbitina*, a dva zástupce rodu *Araneus* - *A. diadematus*, *A. marmoreus*. Toto pozorování v rámci 7 různých rodů této čeledi potvrzuje konzervativní povahu karyotypu u celé skupiny. Zvýšené počty chromozomů u 4 zástupců rodu *Araneus* (*A. uyemurai*, *A. ventricosus*, *A. angulatus*, *A. grossus*) lze tedy chápat jednoznačně jako odvozený stav. Totéž platí i pro zvýšení počtu chromozomů oproti základnímu karyotypu u rodu *Mimetus*. Možné mechanismy odpovědné za zvýšení počtu chromozomů budou diskutovány později (viz. podkapitola 6.3.)

U čeledi Mimetidae je díky rozřešené fylogenezi jednotlivých rodů v práci Benavides et al., (2017) možno pozorované karyotypy konfrontovat se skutečnou evolucí čeledi. Nejbazálnějším rodem ze všech studovaných je rod *Ero*. Klasická cytogenetická

analýza *Ero aphana* odhalila nejčastější pozorovaný karyotyp v rámci araneoidních pavouků -  $2n^{\text{♂}} = 24, X_1X_20$ , stejný karyotyp je předpokládán i u *Ero tuberculata*, v případě tohoto druhu se však podařilo chytit pouze jeden exemplář samičího pohlaví. Na provedených preparátech byla pozorována mitoza se zřetelnými 26 chromozomy. Toto číslo by odpovídalo karyotypu  $2n^{\text{♂}} = 24, X_1X_20$  samčího pohlaví. Podle fylogenetické topologie získané v Benavides et al. (2017) se dá předpokládat, že by se stejný karyotyp mohl vyskytovat i u zástupců rodu *Gelanor*. Je tedy jistě žádoucí budoucí karyotypová analýza tohoto a dalších prozatím nekaryotypovaných rodů čeledi Mimetidae. Největší překážkou v tomto ohledu je poměrně nesnadná dostupnost mnoha zástupců této čeledi. Ačkoliv kvalita některých preparátů nebyla vždy dostatečná pro naprosto spolehlivé stanovení všech morfologických charakteristik, zdá se, že všechny studované druhy vykazovaly ryze akrocentrické karyotypy. Plně akrocentrický karyotyp  $2n^{\text{♂}} = 24, X_1X_20$ , lze tedy považovat za typický a konzervovaný pro zástupce obou studovaných čeledí.

### 6.3. Specifika karyotypové diverzifikace čeledí Araneidae a Mimetidae

U některých rodů Araneidae je pozorovatelný trend vedoucí ke změně domnělého ancestrálního počtu. Araujo et al., (2011) ukazují, že prostřednictvím centrické fúze může dojít k fúzi dvou párů chromozomů a tím ke vzniku karyotypu  $2n^{\text{♂}} = 22, X_1X_20$ . Tento fenomén je podle autorů pozorovatelný i v rámci vnitrodruhové variability a ukazuje, že centrické fúze jsou v rámci skupiny poměrně častou chromozomální přestavbou. Ve větší míře pak k centrickým fúzím dochází i u dalších rodů křížáků jako jsou *Zygiella*, *Larinioides* a *Cyclosa* – jak ukazuje magisterská práce Filipa Pajpacha (2018), dochází u těchto živočichů k tzv. fenoménu „all or nothing“ (Rowell, 1990), kdy sfúzují všechny chromozomové páry v daném karyotypu, často včetně pohlavních chromozomů a tvoří pak při úplné saturaci fúzemi karyotyp  $2n^{\text{♂}} = 13, X0$  jako například u *Cyclosa fuliginata*. U mnou studovaných druhů jsem na podobný fenomén nenarazil, což svědčí o jeho relativní vzácnosti.

Dalším pozorovatelným evolučním trendem u křížákovitých pavouků je zvyšování počtu chromozomů a to konkrétně v případě některých zástupců rodu *Araneus*. U dvou zástupců rodu – *A. diadematus*, *A. marmoreus* byl pozorován karyotyp  $2n^{\text{♂}} = 24, X_1X_20$ . Pozorování u *A. diadematus* se shoduje s Hackman (1948), kde byl karyotyp tohoto druhu poprvé popsán. U zbývajících zástupců rodu *Araneus* byl pozorován narůst počtu chromozomů – v případě *A. uyemurai* byl počet  $2n^{\text{♂}} = 45, X_1X_2X_30$ , v případě *A.*

*ventricosus* byl počet  $2n^{\sigma} = 49, X_1X_2X_30$  a shoduje se s počtem v Youju et al. (1993). V případě *A. angulatus* pak byl pozorován karyotyp  $2n^{\sigma} = 52, X_1X_2X_3X_40$  a neshoduje se s Hackman (1948), který navrhoval pro druh  $2n^{\sigma} = 24, X_1X_20$ . K tomuto pozorování je však třeba přistupovat s určitou obezřetností vzhledem ke stáří studie a možnosti záměny za jiný druh. U *A. grossus* byly získány preparáty pouze z jednoho jedince samičího pohlaví, pozorováním meiotických figur nebylo možné stanovit přesný počet chromozomů, pozorovaný počet se však pohyboval kolem 28 bivalentů a počet chromozomů tohoto druhu by se tak mohl pohybovat kolem  $2n^{\sigma} = 52$  pozorovaných u dalších dvou zástupců tohoto rodu. Diploidní počet *A. angulatus*  $2n^{\sigma} = 52$  je stejný jako u druhu *A. circe* pozorovaného Filipem Pajpachem v jeho diplomové práci (2018) a je nejvyšším diploidním počtem pozorovaným u araneidních pavouků. Tento fakt také nejspíše ukazuje na blízkou příbuznost obou druhů, které jsou i po morfologické stránce obtížněji rozlišitelné (Šestáková et al. 2009). Všichni zástupci rodu *Araneus* se zvýšeným počtem chromozomů jsou na poměry čeledi poměrně robustní zvířata a u všech se v určité formě vyskytuje pár hrbolků na abdomenu, u některých druhů jako například *A. grossus* velmi prominentní.

Vzájemné fylogenetické postavení *A. uyemurai* a *A. ventricosus* vůči dalším zástupcům rodu se zvýšeným počtem chromozomů *A. angulatus* a *A. circe* by pak mohlo pomoci zodpovědět otázku, zda jsou nižší počty u *A. uyemurai* a *A. ventricosus* důsledkem redukce po polyploidizaci, nebo přechodovým stavem mezi ancestrálním karyotypem  $2n^{\sigma} = 24, X_1X_20$  a situací u *A. angulatus* a *A. circe*. Zde však situaci značně komplikuje právě nerozřešená fylogeneze celého rodu *Araneus*, jelikož rod jako takový je očividně polyfyletický (Scharff et al., 2020).

V případě rodu *Mimetus* byly studovány 3 druhy z různých geografických oblastí – z Namibie, Jihoafrické republiky a USA. Na preparátech exemplářů z Namibie je patrný karyotyp  $2n^{\sigma} = 57, X_1X_2X_3X_4X_50$ , v případě populace z Jihoafrické republiky je karyotyp následující -  $2n^{\sigma} = 57, X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_70$ . Počet chromozomů  $2n^{\sigma} = 57$  je nejvyšším dosud pozorovaným počtem u entelegynních pavouků. Zástupce z USA by podle fylogenetického stromu v Benavides et al. (2017) měl být pravděpodobně nejodvozenějším studovaným zástupcem tohoto rodu a pozoruhodně vykazuje pouze 20 chromozomů v případě samičí mitozy, má tedy nižší počet chromozomů než studování zástupci rodu *Ero*, jejichž karyotyp  $2n^{\sigma} = 24, X_1X_20$  je patrně stejně jako u celé nadčeledi *Araneoidea* ancestrálním stavem. V případě čeledi *Mimetidae* tedy pravděpodobně došlo v průběhu evoluce ke zvýšení počtu chromozomů a následně k jeho opětovnému snížení.

Celá situace je o to pozoruhodnější, že u všech zástupců čeledi jsou všechny chromozomy akrocentrické morfologie.

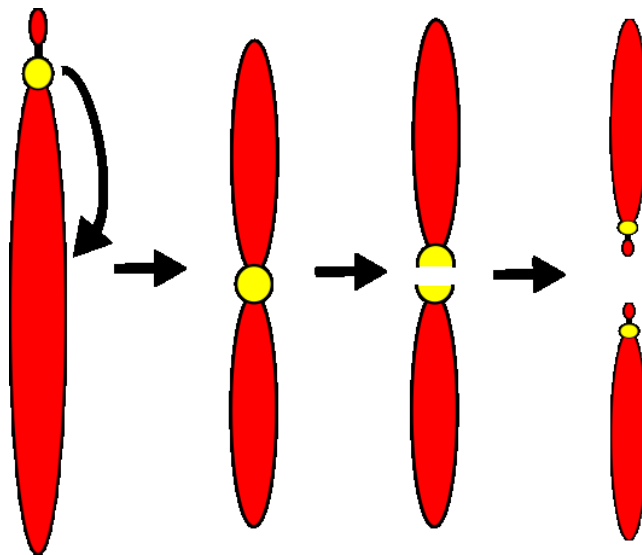
Vzhledem k akrocentrické morfologii chromozomů u všech studovaných druhů obou čeledí zahrnutých v této studii a to včetně druhů se zvýšeným počtem chromozomů oproti nejčastěji pozorovanému karyotypu  $2n♂ = 24, X_1X_20$  jsou pro mechanismus zvyšování počtu chromozomů možné dva scénáře. Jedním z nich by mohla být pericentrická inverze, díky které by vznikl meta- či submetacentrický chromozom. Po následném rozpadu v centromerické oblasti by tedy vznikly dva nové akrocentrické chromozomy (viz. Obrázek 48). K tomuto jevu by však muselo dojít u všech chromozomových párů daného druhu naráz. Takový scénář je z cytogenetického hlediska velmi nepravděpodobný. Studie Stavale et al., (2018) na pavoucích čeledi Theridiidae (snovačkovití) však dokládá, že by nemusel být nemožný. Podle autorů je u těchto pavouků pravděpodobný ancestrální karyotyp skupiny  $2n♂ = 24, X_1X_20$ , přičemž chromozomy jsou akro- či telocentrické morfologie. U druhu *Argyrodes elevatus* je však karyotyp  $2n♂ = 21, X0$ , přičemž všechny chromozomy jsou meta- či submetacentrické morfologie. Autoři navrhují jako možný scénář vzniku centrickou fúzi původních dvou chromozomů X a v případě autozomů právě přestavby pomocí pericentrické inverze. Vzhledem k absenci přechodových karyotypů (obsahujících zároveň jedno- i dvouramenné chromozomy) u dalších doposud studovaných zástupců rodu *Argyrodes* je možné, že tato změna nastala velmi rychle. Pajpach ve své diplomové práci (2018) předpokládá vliv samičího meiotického tahu, který by mohl ve urychlovat fixaci jiných centrických fúzí a vysvětlovat pravidlo „all or nothing“ (Rowell, 1990). Je spíše spekulativní otázkou, zda by meiotický tah mohl ovlivnit i fixaci invertovaných chromozomů a následně i fixaci produktů centrického rozpadu.

Po pericentrické inverzi následované centrickým rozpadem je druhou možnou variantou polyploidizace. Nondisjunkcí či interspecifickou hybridizací v případě allopolyploidie by došlo ke zdvojnásobení počtu chromozomů při zachování jejich morfologie. Vzhledem k pozorování složitých systémů určení pohlaví s větším počtem chromozomů X, než u ancestrálního systému  $X_1X_20$  v rámci různých pavoučích skupin je poměrně dobře představitelné, že polyploidizace by nenarušovala proces determinace pohlaví a nemuselo by tedy docházet k deleci duplikovaných pohlavních chromozomů. V případě některých zástupců čeledi Araneidae i zástupců čeledi Mimetidae neodpovídají počty chromozomů přesně dvojnásobku původního karyotypu. Taková situace však vzhledem ke staří skupin není nikterak překvapivá, vyšší počet chromozomů je

vysvětlitelný buďto více koly polyploidizace s následnou redukcí počtu chromozomů, a nebo nondisjunkcí jednotlivých chromozomů po proběhlé polyploidizaci. Vzhledem k tomu, že se počet chromozomů pohybuje spíše kolem dvojnásobku ancestrálního počtu, je podle mého soudu v případě polyploidního scénáře pravděpodobnější druhá zmíněná varianta a to jak u čeledi Araneidae, tak u čeledi Mimetidae.

Názory na stáří čeledi Araneidae se mezi autory liší, podle Fernández et al. (2018) došlo k oddělení čeledi od společného předka zhruba mezi 125-115 miliony let. Scharff et al. (2020) datovali stáří skupiny na přibližně 145 milionů let. Stáří rodu *Araneus* se kvůli prozatím nerozřešené polyfýlii rodu nepodařilo zjistit.

Všechny rody čeledi Mimetidae studované v Benavides et al. (2017) byly podle autorů přítomny v pozdní křídě a k jejich diversifikaci docházelo hlavně v období paleogénu, v případě rodu *Ero* dokonce přímo v pozdní křídě. Z uvedených informací vyplývá, že pokud došlo v rámci čeledi k polyploidní události na počátku divergence rodu *Mimetus*, byla by tato událost nejméně 66 milionů let stará.



Obrázek 48 – schéma možného vzniku dvou chromozomů akrocentrické morfologie z původního akrocentrického chromozomu, v prvním kroku by muselo dojít k pericentrické inverzi, která by přesunula centromerickou oblast blíže středu chromozomu, rozpadem v centromerické oblasti by pak mohly vzniknout dva telo-/akrocentrické chromozomy

#### 6.4. Evoluce pohlavních chromozomů

System pohlavních chromozomů  $X_1X_20$  je považován za ancestrální pro všechny pavouky (Suzuki, 1954) i pro Entelegynae (Král et al., 2011). Ancestrální je pravděpodobně i pro Araneoida (Araujo et al., 2015; tato práce). Poměr pohlavních chromozomů byl v této práci změřen u 5 druhů čeledi Araneidae vykazujících karyotyp  $2n♂ = 24, X_1X_20$ . Průměrný poměr byl v případě těchto druhů 1:0,91, oba gonozomy jsou si tedy celkovou délkou velmi podobné. U druhu *A. angulatus* byl pozorován pro Entelegynae neobvyklý systém pohlavních chromozomů  $X_1X_2X_3X_40$  (tato práce). Jedná se o situaci, která je u Entelegynae nalézána zcela výjimečně (Araujo et al., 2012). V případě druhu *A. angulatus* byl naměřený poměr gonozomů 1:0,759:0,655:0,534. Výrazně větší  $X_1$  byl nalezen u druhů s odvozeným systémem  $X_1X_2X_30$  - *A. ventricosus* (1:0,59:0,503) a *A. uyemurai* (1:0,533:0,451).  $X_1$  by v tomto případě teoreticky mohl odpovídat velikostně dvěma chromozomům X druhu *A. angulatus* a mohl vzniknout jejich fúzí při redukci polyploidního karyotypu nebo by za scénáře, že karyotyp u *A. angulatus* je odvozenější mohl naopak být prekurzorem pro jejich rozpad. Výsledky z C - pruhování neodhalily u *A. ventricosus* ani u *A. uyemurai* uprostřed  $X_1$  interkalární blok konstitutivního heterochromatinu, který by mohl být zbytkem po případné fúzi, což však vzhledem k celkově drobným blokům heterochromatinu u křížáků a možnosti delece centromerické oblasti před samotnou fúzí, není silným argumentem. Ani pro jednu z výše nastíněných variant se v této práci nepodařilo najít přesvědčivé důkazy a vyřešení této otázky si bude v budoucnu žádat složitější metodický přístup založený pravděpodobně například na mapování genů na jednotlivých chromozomech X.

$X_1X_2$  byl pravděpodobně výchozím stavem i pro čeleď Mimetidae, neboť byl pozorován u rodu *Ero*, který byl ze studovaných rodů fylogeneticky bazálnější. I zde je zvyšování  $2n$  doprovázeno nárůstem počtu pohlavních chromozomů – u *Mimetus laevigatus* byl pozorovaný systém  $X_1X_2X_30$ , u *Mimetus* sp. Namibie pak  $X_1X_2X_3X_4X_50$  a v případě *Mimetus* sp. JAR dokonce  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_70$ . Doposud nejvyšším počtem diferencovaných pohlavních chromozomů u Entelegynae byl stav  $X_1X_2X_3X_40$  (Araujo et al., 2012), větší počty pohlavních chromozomů lze nalézt u Entelegynae jen v případě neopohlavních systémů, například u australské maloočky *Delena cancerides* (Sharp a Rowell, 2007), kde se v rámci druhu vyskytuje značná karyotypová diverzita a u některých populací byl pozorován až systém  $X_1X_2X_3X_4X_5Y_1Y_2Y_3Y_4$  a velmi složité způsoby meiotického párování chromozomů. Nepočítaje tyto atypické případy, je stav  $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_70$  nejvyšším pozorovaným počtem pohlavních chromozomů u Entelegynae. Diverzitu počtu pohlavních chromozomů v rámci rodu *Mimetus* nelze

vysvětlit pouze duplikací při polyploidizaci, ale předpokládáme, že se uplatňovaly v evoluci pohlavních chromozomů i další přestavby. O komplexnosti těchto systémů svědčí i dynamika rDNA clusterů v rámci čeledi (viz. podkapitola 6.5.). Co se povahy přestaveb týče, mohlo se jednat jak o rozpady pohlavních chromozomů, tak o dílčí nondisjunkce jednotlivých X. Nondisjunkce pohlavních chromozomů jsou u pavouků předpokládány, i když spolehlivé důkazy o jejich průběhu zatím chybí (Araujo et al., 2012; Kořínková a Král, 2013).

## 6.5. Organizace rRNA genů

U čeledi Araneidae byla provedena 18S rRNA FISH k detekci NOR u 8 druhů. Prováděna byla také na *A. grossus* a *C. conica*, ale bohužel nebyly získány publikovatelné výsledky. Nejčastěji se hodnoty pohybovaly mezi 4-6 loci na autozomálních párech, v případě *Araniella cucurbitina* byl signál pozorován i na jednom z pohlavních chromozomů. Filip Pajpach (2018) pro tuto sondu detekoval 5 loci na autozomálních párech pro *A. diadematus* a *A. quadratus*, v případě *A. saevus* a *A. nordmanni* pak bylo detekováno po 4 loci.

Data o počtech NOR jsou v rámci Entelegynae omezena zejména na zástupce RTA-clade a jediným publikovaným zástupcem skupiny Araneoidea je snovačka rodu *Argyrodes* (cf. *convivans*), u které byly detekovány 4 loci (Šťáhlavský et al., 2020). I když zástupci RTA-clade mohou mít i výrazně zvětšené počty NOR (Forman et al 2013), obvyklejší jsou pro ně nižší počty kolem 1-4 loci (Rincão et al. 2017; Šťáhlavský, 2020). Zdá se tedy, že relativně vysoký počet NOR kolem 5 loci u zástupců čeledi Araneidae zjištěný v této práci, by mohl představovat obvyklou situaci u Araneoidea s 24 chromozomy. To potvrzují i mnou získaná data pro ostníka *Ero aphana*. I přes relativně velký počet signálů je jejich poloha na chromozomu vzhledem k centromere velmi konzervativní. Jak naznačují data získaná u ostatních Entelegynae (Šťáhlavský et al. 2020) je typickou oblastí pro NOR u této skupiny distální konec dlouhého (q) raménka akrocentrických chromozomů a data získaná v této práci jsou s tím ve zjevném souladu. Mírné zvýšení počtu loci na 7 v případě *A. angulatus* by svým počtem teoreticky mohlo odpovídat stavu po proběhlé polyploidizaci. V případě *A. uyemurai* pak byly pozorovány 2 loci a v případě *A. ventricosus* pouhý 1 lokus a tato pozorování by naznačovala, že by s případnou redukcí počtu 2n docházelo i k redukcí počtu NOR.

U čeledi Mimetidae byla 18S rRNA FISH k detekci NOR provedena u 4 druhů.

Několikrát byla prováděna i u *Mimetus laevigatus*, avšak v případě tohoto druhu se nepodařilo pozorovat žádné signály. V případě *Ero aphana* byly pozorovány signály vycházející z 5 autozomálních párů, u dvou zástupců rodu *Mimetus* pak byla pozorována spíše tendence k akumulaci klastrů pro tento gen na pohlavních chromozomech. V případě zástupce *Mimetus* sp. USA pak byly pozorovány signály vycházející ze 4 chromozomů. Vzhledem k tomu, že u tohoto druhu nebyla stanovena konstituce pohlavních chromozomů, není možné spolehlivě odhadnout souvislost vývoje počtu klastrů pro tento gen s ostatními zástupci rodu. Se zvyšujícím se počtem chromozomů lze však v případě této čeledi pozorovat spíše redukci počtu kopií NOR.

Signál pro 18s rRNA vycházející z pohlavních chromozomů byl v této práci detekován u některých zástupců obou studovaných čeledí. U Araneidae byl pozorován signál vycházející z jednoho z chromozomů X u *Araniella cucurbitina*. V případě dvou afrických zástupců rodu *Mimetus* se signál pro 18s rDNA vyskytoval pouze na jednom autozomálním páru u jedince z Namibie a v případě jedince z JAR pak veškeré pozorované signály vycházely ze skupiny pohlavních chromozomů. Přesný počet chromozomů nesoucí klastr genů pro 18s rRNA však nešel spolehlivě určit. Přítomnost NOR na pohlavních chromozomech byla zaznamenána například ve studii Král et al., (2006), tato pozorování se však týkala především haplogynních pavouků. U entelegynních pavouků byly NOR na pohlavních chromozomech v dostupných pracích pozorovány výjimečně a to konkrétně u skupiny Tetragnathidae (Král et al., 2011) a v rámci čeledi Araneidae pak u jedné její podčeledi - Nephilinae (Araujo et al., 2015). Obě práce používaly vizualizace NOR pomocí stříbření. Akumulace NOR na pohlavních chromozomech byla prokázána například u ryb rodu *Hoplias* ve studii Cioffi et al. (2010).

Jedno z 18S rDNA loci u *Araniella cucurbitina* se zdálo být heteromorfní (nacházející se pouze na jednom z dlouhých ramének daného chromozomu), tento jev už u pavouků byl zaznamenán ve studii Rincão et al. (2017), autoři to v tomto případě vysvětlují možným nerovnoměrným crossing overem, který by vedl k akumulaci repetice pouze na jednom homologu. Toto vysvětlení podle mého názoru nedává smysl, jelikož by se v takovém případě signál vyskytoval pouze na jednom chromozomu daného bivalentu a ne na jedné ze sesterských chromatid. Pravděpodobnějším mechanismem se zde zdá být SCE (sister chromatid exchange), tedy aberace, při které dochází k výměně genetického materiálu mezi sesterskými chromatidami. Pons a Gillespie (2003) uvádějí nerovnoměrnou SCE jako jeden z možných mechanismů expanze satelitní DNA u některých zástupců čeledi Tetragnathidae (čelistnatkovití). Může se také jednat pouze o



artefakt způsobený nedostatečnou silou signálu na jedné ze sesterských chromatid. Heteromorfií signálu pozoroval v případě některých měření i Filip Pajpach v diplomové práci (2018).

5S rRNA sonda byla u Araneidae aplikována pouze u *A. angulatus*. Prováděna byla také u *A. marmoreus*, nicméně nebyly získány spolehlivé výsledky. V případě *A. angulatus* bylo pozorováno pro tuto sondu pravděpodobných 5 signálů – 4 na autozomálních párech a 1 na jednom z chromozomů X. V diplomové práci F. Pajpacha (2018) byl pozorován 1 lokus u *A. quadratus* ( $2n♂ = 24, X_1X_20$ ) a vyšší počet u druhů se zvýšeným  $2n$ . Všechny signály podle autora vycházely pravděpodobně z autozomálních bivalentů. Autor se však zmiňuje, že sonda nebyla prozatím ideálně optimalizována a figury měly značné fluorescenční pozadí. Podobně tomu bylo i u sondy vytvořené v této práci. Sondu bude proto v budoucnu nutné optimalizovat a získat data obzvláště pro druhy s ancestrálním karyotypem  $2n♂ = 24, X_1X_20$ . Předběžně se dá říci, že u zástupců se zvýšeným počtem chromozomů jsou pozorovány vyšší počty signálů, než u předpokládaných diploidních příbuzných, což by mohlo podporovat polyploidizační hypotézu.

U čeledi Mimetidae byla 5S sonda detekována u 3 druhů. Zatímco v případě 18S rRNA genů bylo pozorováno u *Ero aphana* větší množství autozomálních signálů a u zástupců rodu *Mimetus* spíše akumulace těchto clusterů na pohlavních chromozomech, byla v případě 5S rRNA genů zaznamenána opačná tendence. V případě *Ero aphana* byl pozorován pouze 1 signál vycházející z jednoho z chromozomů X. V případě zástupců rodu *Mimetus* bylo pozorováno 2 loci u *Mimetus* sp. Namibie a 4 loci u *Mimetus* sp. JAR. Signály velmi pravděpodobně vycházely pouze z autozomů. Oproti *Ero* tedy došlo u rodu *Mimetus* spíše k translokaci sekvencí mezi autozomy a chromozomy X. Pro potřeby testování polyploidie se tedy nejedná o vhodný marker pro tento rod. Tendence k lokaci genů pro oba typy rRNA genů na pohlavních chromozomech u čeledi Mimetidae je nicméně pozoruhodná.

Vzhledem k tomu, že se u obou čeledí nepodařilo ani v jednom případě osekvenovat 5S rDNA sondu z reverse směru, je zřejmé, že bude v budoucnu potřeba navrhnout jiný set primerů.

Poslední mnou aplikovaný molekulárně cytogenetický marker genu pro U2 snRNA nebyl na pavoucích dosud publikován. Vzhledem ke své subterminální pozici na chromozomu by mohl být v budoucnu vhodným markerem pro testování polyploidie v čeledi Mimetidae.

## 6.6. Velikost genomu

Stejně jako u cytogenetických dat, vzhledem k velikosti skupiny, nebyla velikost pavouků doposud uspokojivě studována. První souhrnnější prací tohoto druhu je studie Gregory a Shorthouse (2003) studující velikost genomu 115 druhů pavouků v rámci 19 čeledí pomocí Feulgenovy denzitometrie. V rámci studie byli měřeni také 3 zástupci rodu *Araneus* – *A. diadematus*, *A. marmoreus* a *Araneus* sp. (pravděpodobně *A. corticarius*). Naměřená 2C hodnota *A. diadematus* byla  $2C = 5,14$  pg. V této práci byla průměrná naměřená hodnota pro *A. diadematus*  $2C = 5,846$  pg. Vzhledem k rozdílné použité metodě měření i rozdílným standardům si dovoluji tvrdit, že hodnoty jsou v přibližném souladu. Průměrná velikost genomu ve studii Gregory a Shorthouse (2003) byla zhruba  $2C = 5,8$  pg. Průměrné velikosti genomů naměřené v této práci jsou  $2C = 6,045$  pg pro čeleď Araneidae a  $2C = 13,035$  pg pro čeleď Mimetidae. Největší naměřené pavoučí genomy jsou u polyploidní čeledi Caponiidae ve studii Král et al., 2019, kde nejvyšší pozorovaná hodnota byla cca  $2C = 48,5$  pg. Ačkoliv se této hodnotě v této práci studované druhy zdaleka neblíží, mají zástupci čeledi Mimetidae obzvláště v porovnání s dalšími čeleděmi skupiny Entelegynae poměrně velké genomy. Při srovnání se všemi publikovanými daty (Gregory a Shorthouse, 2003; Rasch a Connelly, 2005) jsou měření u Mimetidae v této práci dokonce největšími genomy z celé skupiny Entelegynae.

U měřených druhů se zvýšeným počtem chromozomů nebyly naměřeny signifikantní nárůsty velikosti genomu oproti druhům s karyotypem  $2n♂ = 24, X_1X_20$ . To platí jak pro zástupce Araneidae, tak pro zástupce Mimetidae. V případě druhu *Mimetus* sp. USA, který by měl podle dostupných fylogenetických dat být nejodvozenější byl však pozorován nízký počet chromozomů  $2n♀ = 20$ . S přihlédnutím k systému určení pohlaví u pavouků jako takových lze tedy přirozeně předpokládat, že počet pro samčí pohlaví bude ještě nižší. Velikost genomu tohoto druhu byla nejnižší ze všech měřených mimetidů a její hodnota  $2C = 10,571$  pg je o 2,464 pg pod průměrem celé skupiny (tato práce). V evoluci rodu *Mimetus* tedy u odvozenějších skupin pravděpodobně došlo k určité redukci genetického materiálu oproti ostatním zástupcům rodu. Velikost genomu *Mimetus* sp. USA odpovídá zhruba 75% průměru velikosti genomu ostatních studovaných zástupců rodu *Mimetus*.

Tato studie jako jedna z mála přináší informace o poměru bazí AT a GC v genomu pavouků. Studované druhy mají poměr bazí vychýlen ve prospěch AT párů (60,96%), což

je v souladu s daty publikovanými o genomech haplogynních pavouků (Král et al., 2019) i s daty z celogenomových projektů (Sanggaard et al., 2014). AT bohatší genomy jsou zároveň typické pro většinu zvířat (Vinogradov, 1998).

## 7. Závěr

V rámci této práce bylo studováno za použití různých technik 24 druhů pavouků čeledí Araneidae a Mimetidae. Obě čeledi patří do skupiny Araneoidea, která je typická spíše nízkým počtem akrocentrických chromozomů, nejčastěji  $2n\sigma = 24, X_1X_20$ . Tento stav je velmi pravděpodobně ancestrální i pro obě studované čeledi a v této práci pozorovaná data tuto skutečnost podporují. U některých zástupců obou čeledí bylo pozorováno zvýšení počtu chromozomů a to včetně chromozomů pohlavních. Počty se u většiny zástupců se zvýšeným  $2n$  pohybovaly kolem přibližně dvojnásobné hodnoty. Nejen z tohoto důvodu uvažuji jako možný mechanismus zvýšení počtu chromozomů polyploidii. Pozorované počty neodpovídají přesnému dvojnásobku ancestrálního počtu, předpokládám tedy, že po případné polyploidizaci docházelo k dalším, individuálním chromozomovým přestavbám možná i nondisjunkcím jednotlivých chromozomů.

Nastíněná polyploidizační hypotéza byla testována detekcí třech různých molekulárně cytogenetických markerů pomocí FISH. Ačkoliv dvě ze tří použitých sond stále nejsou plně optimalizované pro použití na studovaných druhích, ukazují výsledky z FISH výrazné změny dynamiky studovaných markerů mezi druhy s ancestrálním a odvozeným karyotypem. V případě Mimetidae byla pozorována poměrně výrazná akumulace studovaných genů na pohlavních chromozomech, což u Entelegynae z prozatím dostupných dat není běžný jev. V případě rodu *Araneus* pravděpodobně došlo ke zvýšení počtu 18S rDNA i 5S rDNA klastrů se zvýšením počtu chromozomů a v případě 18S rDNA genů pak k následné redukci. K potvrzení tohoto scénáře by však byla žádoucí dostatečně zpracovaná fylogeneze rodu.

Měření velikosti genomu neodhalilo výrazné zvětšení u druhů s vyšším počtem chromozomů ani u jedné čeledi. Pozorována však byla redukce velikosti genomu u odvozeného zástupce rodu *Mimetus*. Tato redukce byla navíc doprovázena výraznou redukcí počtu chromozomů oproti ostatním zástupcům čeledi ( $2n\text{♀} = 20$ ). Měřené genomy byly mírně AT bohatší a měřený poměr AT/GC bazí byl podobný jako u dosud studovaných pavouků.

Ačkoliv o polyploidii u pavouků až donedávna chyběly přesvědčivé důkazy, je

zřejmé, že sehrála roli v evoluci této skupiny. Vzhledem k enormní diverzitě skupiny je možné, že s přibývajícimi molekulárními a cytogenetickými daty bude odhalena proběhlá polyploidní události i u dalších linií. Rozmanitost pavoučích systému určení pohlaví také ukazuje, že jsou pavouci poměrně snášenliví ke změnám počtu pohlavních chromozomů a tudíž pokud bychom se drželi hypotézy, že pohlavní chromozomy jsou alespoň částečně zodpovědné za nižší výskyt polyploidie u živočichů, nemusela by právě u pavouků představovat polyploidizace v teoretické rovině takový problém.

## 8. Seznam použité literatury

- “Spider Cytogenetic Database.” n.d. Accessed July 22, 2020.  
<http://www.arthropodacytogenetics.bio.br/spiderdatabase/families.html>.
- World Spider Catalog. 2020. “World Spider Catalog Version 21.0.” *Natural History Museum Bern*, 36: online at <http://wsc.nmbe.ch/>. <https://doi.org/10.24436/2>.
- Araujo, D., E. Paula-Neto, A. D. Brescovit, D. M. Cella, and M. C. Schneider. 2015. “Chromosomal Similarities between Nephilidae and Tetragnathidae Indicate Unique Evolutionary Traits among Araneoidea.” *Italian Journal of Zoology* 82 (4): 513–20. <https://doi.org/10.1080/11250003.2015.1078418>.
- Araujo, Douglas, Viviane F. Mattos, Andr Marsola Giroti, Marcia G. Kraeski, Leonardo S. Carvalho, and Antonio D. Brescovit. 2011. “Cytogenetical Characterization of Six Orb-Weaver Species and Review of Cytogenetical Data for Araneidae.” *Journal of Arachnology* 39 (2): 337–44. <https://doi.org/10.1636/CB10-88.1>.
- Araujo, Douglas, Marielle Cristina Schneider, Adilson Ariza Zacaro, Edson Gabriel De Oliveira, Rosana Martins, Antonio Domingos Brescovit, Irene Knysak, and Doralice Maria Cella. 2020. “Venomous Loxosceles Species (Araneae, Haplogynae, Sicariidae) from Brazil:  $2n^{\text{TM}} = 23$  and X1X2Y Sex Chromosome System as Shared Characteristics.” *Zoological Science* 37 (2): 128–39. <https://doi.org/10.2108/zs190128>.
- Barow, Martin, and Armin Meister. 2002. “Lack of Correlation between AT Frequency and Genome Size in Higher Plants and the Effect of Nonrandomness of Base Sequences on Dye Binding.” *Cytometry* 47 (1): 1–7. <https://doi.org/10.1002/cyto.10030>.
- Bechsgaard, Jesper, Mads Fristrup Schou, Bram Vanthournout, Frederik Hendrickx, Bjarne Knudsen, Virginia Settepani, Mikkel Heide Schierup, and Trine Bilde. 2019. “Evidence for Faster X Chromosome Evolution in Spiders.” *Molecular Biology and Evolution*. 2019. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz074>.
- Benavides, Ligia R., Gonzalo Giribet, and Gustavo Hormiga. 2017. “Molecular Phylogenetic Analysis of ‘Pirate Spiders’ (Araneae, Mimetidae) with the Description of a New African Genus and the First Report of Maternal Care in the Family.” *Cladistics* 33 (4): 375–405. <https://doi.org/10.1111/cla.12174>.
- Bueno, Danilo, Octavio Manuel Palacios-Gimenez, and Diogo Cavalcanti Cabral-de-Mello. 2013. “Chromosomal Mapping of Repetitive DNAs in the Grasshopper *Abracris Flavolineata* Reveal Possible Ancestry of the B Chromosome and H3 Histone Spreading.” Edited by Anton Wutz. *PLoS ONE* 8 (6): e66532. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066532>.

- Cabral-de-Mello, Diogo C., S arah G. Oliveira, Rita C. de Moura, and Cesar Martins. 2011. "Chromosomal Organization of the 18S and 5S rRNAs and Histone H3 Genes in Scarabaeinae Coleopterans: Insights into the Evolutionary Dynamics of Multigene Families and Heterochromatin." *BMC Genetics* 12 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-12-88>.
- Cioffi, M. B., C. Martins, M. R. Vicari, L. Rebordinos, and L. A.C. Bertollo. 2010. "Differentiation of the XY Sex Chromosomes in the Fish *Hoplias Malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae): Unusual Accumulation of Repetitive Sequences on the X Chromosome." *Sexual Development* 4 (3): 176–85. <https://doi.org/10.1159/000309726>.
- Coddington, Jonathan A. 2005. "Phylogeny and Classification of Spiders."
- Comai, Luca. 2005. "The Advantages and Disadvantages of Being Polyploid." *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg1711>.
- Cordellier, Mathilde, Jutta M. Schneider, Gabriele Uhl, and Nico Posnien. 2020. "Sex Differences in Spiders: From Phenotype to Genomics." *Development Genes and Evolution* 230 (2): 155–72. <https://doi.org/10.1007/s00427-020-00657-6>.
- D'Hont, A. 2005. "Unraveling the Genome Structure of Polyploids Using FISH and GISH; Examples of Sugarcane and Banana." *Cytogenetic and Genome Research* 109 (1–3): 27–33. <https://doi.org/10.1159/000082378>.
- DeVries, Hugo. 1915. "The Coefficient of Mutation in *Oenothera Biennis* L." *Botanical Gazette* 59 (3): 169–96. <https://doi.org/10.1086/331526>.
- Diaz, Manuel O., R. Maynard, and N. Brum-Zorrilla. 2010. "Diffuse Centromere and Chromosome Polymorphism in Haplogyne Spiders of the Families Dysderidae and Segestriidae." *Cytogenetic and Genome Research* 128 (1–3): 131–38. <https://doi.org/10.1159/000296273>.
- Dimitrov, Dimitar, Ligia R. Benavides, Miquel A. Arnedo, Gonzalo Giribet, Charles E. Griswold, Nikolaj Scharff, and Gustavo Hormiga. 2017. "Rounding up the Usual Suspects: A Standard Target-Gene Approach for Resolving the Interfamilial Phylogenetic Relationships of Ecribellate Orb-Weaving Spiders with a New Family-Rank Classification (Araneae, Araneoidea)." *Cladistics* 33 (3): 221–50. <https://doi.org/10.1111/cla.12165>.
- Doležel, Jaroslav, Sergio Sgorbati, and Sergio Lucretti. 1992. "Comparison of Three DNA Fluorochromes for Flow Cytometric Estimation of Nuclear DNA Content in Plants." *Physiologia Plantarum* 85 (4): 625–31. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb04764.x>.
- Douglas Araujo, Marielle Cristina Schneider, and Emygdio Paula-Neto and Doralice Maria Cella. 2012. "Meiosis - Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity." *Meiosis - Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity*. 2012. <https://doi.org/10.5772/1232>.

- Edger, Patrick P., and J. Chris Pires. 2009. "Gene and Genome Duplications: The Impact of Dosage-Sensitivity on the Fate of Nuclear Genes." *Chromosome Research*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s10577-009-9055-9>.
- Fernández, Rosa, Robert J. Kallal, Dimitar Dimitrov, Jesús A. Ballesteros, Miquel A. Arnedo, Gonzalo Giribet, and Gustavo Hormiga. 2018. "Phylogenomics, Diversification Dynamics, and Comparative Transcriptomics across the Spider Tree of Life." *Current Biology* 28 (9): 1489-1497.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.03.064>.
- Flot, Jean François, Boris Hespeels, Xiang Li, Benjamin Noel, Irina Arkhipova, Etienne G.J. Danchin, Andreas Hejnol, et al. 2013. "Genomic Evidence for Ameiotic Evolution in the Bdelloid Rotifer *Adineta Vaga*." *Nature* 500 (7463): 453–57. <https://doi.org/10.1038/nature12326>.
- Fontana, F. 1994. "Chromosomal Nucleolar Organizer Regions in Four Sturgeon Species as Markers of Karyotype Evolution in Acipenseriformes (Pisces)." *Genome* 37 (5): 888–92. <https://doi.org/10.1139/g94-126>.
- Forman, M., P. Nguyen, V. Hula, and J. Král. 2013. "Sex Chromosome Pairing and Extensive NOR Polymorphism in *Wadicosa Fidelis* (Araneae: Lycosidae)." *Cytogenetic and Genome Research* 141 (1): 43–49. <https://doi.org/10.1159/000351041>.
- Gallardo, M. H., C. A. González, and I. Cebrián. 2006. "Molecular Cytogenetics and Allotetraploidy in the Red Vizcacha Rat, *Tympanoctomys Barrerae* (Rodentia, Octodontidae)." *Genomics* 88 (2): 214–21. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.02.010>.
- Goodpasture, Carll, and Stephen E. Bloom. 1975. "Visualization of Nucleolar Organizer Regions in Mammalian Chromosomes Using Silver Staining." *Chromosoma* 53 (1): 37–50. <https://doi.org/10.1007/BF00329389>.
- Gorlova, O Y, I P Gorlov, E Nevo, and Dmitri V Logunov. 1997. "Cytogenetic Studies on Seventeen Spider Species from Israel." *Bulletin of the British Arachnological Society*. Vol. 10. <https://www.researchgate.net/publication/286744357>.
- Gregorič, Matjaž, Ingi Agnarsson, Todd A. Blackledge, and Matjaž Kuntner. 2015. "Phylogenetic Position and Composition of Zygellinae and Caerostris, with New Insight into Orb-Web Evolution and Gigantism." *Zoological Journal of the Linnean Society* 175 (2): 225–43. <https://doi.org/10.1111/zoj.12281>.
- Gregory T., Ryan T., and Barbara K. Mable. 2005. "Polyploidy in Animals." *The Evolution of the Genome*, January, 427–517. <https://doi.org/10.1016/B978-012301463-4/50010-3>.
- Gregory T.R., Shorthouse D.P. 2003. "Genome Sizes of Spiders | Journal of Heredity | Oxford Academic." 2003. <https://academic.oup.com/jhered/article/94/4/285/2187426>.

- Hackman, Walter. 1948. "Chromosomenstudien an Araneen Mit Besonderer Berücksichtigung Der Geschlechtschromosomen." University of Helsinki (UH-Viikki). 1948. <https://helda.helsinki.fi/handle/10138/36948>.
- Harms, Danilo, and Mark S. Harvey. 2009. "Australian Pirates: Systematics and Phylogeny of the Australasian Pirate Spiders (Araneae:Mimetidae), with a Description of the Western Australian Fauna." *Invertebrate Systematics* 23 (3): 231–80. <https://doi.org/10.1071/IS08015>.
- He, Xionglei, and Jianzhi Zhang. 2005. "Rapid Subfunctionalization Accompanied by Prolonged and Substantial Neofunctionalization in Duplicate Gene Evolution." *Genetics* 169 (2): 1157–64. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.037051>.
- Hladová, Irena. 2015. "Nové Cytogenetické Markery a Evoluční Dynamika Karyotypů Motýlů."
- Hormiga, Gustavo, Nikolaj Scharff, and Jonathan A. Coddington. 2000. "The Phylogenetic Basis of Sexual Size Dimorphism in Orb-Weaving Spiders (Araneae, Orbiculariae)." *Systematic Biology*. Vol. 49. <https://doi.org/10.1080/10635159950127330>.
- Howell, W. M., and D. A. Black. 1980. "Controlled Silver-Staining of Nucleolus Organizer Regions with a Protective Colloidal Developer: A 1-Step Method." *Experientia* 36 (8): 1014–15. <https://doi.org/10.1007/BF01953855>.
- Chen, Jeffrey, Luca Comai, and Craig S. Pikaard. 1998. "Gene Dosage and Stochastic Effects Determine the Severity and Direction of Uniparental Ribosomal RNA Gene Silencing (Nucleolar Dominance) in Arabidopsis Allopolyploids." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 95. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14891>.
- Chen, Xuejie, Shiqi Xu, Zhijun Yu, Lida Guo, Shujie Yang, Limeng Liu, Xiaolong Yang, and Jingze Liu. 2014. "Multiple Lines of Evidence on the Genetic Relatedness of the Parthenogenetic and Bisexual Haemaphysalis Longicornis (Acari: Ixodidae)." *Infection, Genetics and Evolution* 21 (January): 308–14. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.12.002>.
- J., A., and Susumu Ohno. 1971. "Evolution by Gene Duplication." *Population* (French Edition). 1971. <https://doi.org/10.2307/1530208>.
- Jackson, R. R., and Mary E.A. Whitehouse. 1986. "The Biology of New Zealand and Queensland Pirate Spiders (Araneae, Mimetidae): Aggressive Mimicry, Araneophagy and Prey Specialization." *Journal of Zoology* 210 (2): 279–303. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1986.tb03635.x>.
- Kenny, N. J., K. W. Chan, W. Nong, Z. Qu, I. Maeso, H. Y. Yip, T. F. Chan, et al. 2016. "Ancestral Whole-Genome Duplication in the Marine Chelicerate Horseshoe Crabs." *Heredity* 116 (2): 190–99. <https://doi.org/10.1038/hdy.2015.89>.



- Kloock, C. T., and W. K. Kellog. 2001. "Diet and Insectivory in the 'Araneophagic' Spider, *Mimetus Notius* (Araneae: Mimetidae)." *American Midland Naturalist* 146 (2): 424–28. [https://doi.org/10.1674/0003-0031\(2001\)146\[0424:DAIITA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1674/0003-0031(2001)146[0424:DAIITA]2.0.CO;2).
- Kořínková, Tereza, and Jiří Král. 2013. "Karyotypes, Sex Chromosomes, and Meiotic Division in Spiders." In *Spider Ecophysiology*, 159–71. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-33989-9\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-642-33989-9_12).
- Kotz, Matěj. 2017. "Univerzita Karlova Přírodovědecká Fakulta Polyploidie Se Zvláštním Zřetelem k Paleopolyploidii a Způsobům Její Detekce Polyploidy with Specific View to Paleopolyploidy and Its Detection." Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta.
- Král, J., T. Kořínková, M. Forman, and L. Krkavcová. 2011. "Insights into the Meiotic Behavior and Evolution of Multiple Sex Chromosome Systems in Spiders." *Cytogenetic and Genome Research* 133 (1): 43–66. <https://doi.org/10.1159/000323497>.
- Král, Jiří. 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 (7): 863–79. <https://doi.org/10.1007/s10577-007-1169-3>.
- Král, Jiří, Martin Forman, Tereza Kořínková, Azucena C.Reyes Lerma, Charles R. Haddad, Jana Musilová, Milan Řezáč, et al. 2019. "Insights into the Karyotype and Genome Evolution of Haplogyne Spiders Indicate a Polyploid Origin of Lineage with Holokinetic Chromosomes." *Scientific Reports* 9 (1): 3001. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39034-3>.
- Král, Jiří, Tereza Kořínková, Lenka Krkavcová, Jana Musilová, Martin Forman, Ivalú M.Ávila Herrera, Charles R. Haddad, et al. 2013. "Evolution of Karyotype, Sex Chromosomes, and Meiosis in Mygalomorph Spiders (Araneae: Mygalomorphae)." *Biological Journal of the Linnean Society* 109 (2): 377–408. <https://doi.org/10.1111/bij.12056>.
- Král, Jiří, Jana Musilová, František Št'áhlavský, Milan Řezáč, Zübeyde Akan, Robert L. Edwards, Frederick A. Coyle, and Carles Ribera Almerje. 2006. "Evolution of the Karyotype and Sex Chromosome Systems in Basal Clades of Araneomorph Spiders (Araneae: Araneomorphae)." *Chromosome Research* 14 (8): 859–80. <https://doi.org/10.1007/s10577-006-1095-9>.
- Kulkarni, Siddharth, Hannah Wood, Michael Lloyd, and Gustavo Hormiga. 2020. "Spider-Specific Probe Set for Ultraconserved Elements Offers New Perspectives on the Evolutionary History of Spiders (Arachnida, Araneae)." *Molecular Ecology Resources* 20 (1): 185–203. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13099>.
- Kůrka, A, M Řezáč, R Macek, and J Dolanský. 2015. "Pavouci České Republiky."

- Leitch, I. J., and M. D. Bennett. 2004. "Genome Downsizing in Polyploid Plants." *Biological Journal of the Linnean Society* 82 (4): 651–63. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2004.00349.x>.
- Liu, Shenglin, Anne Aagaard, Jesper Bechsgaard, and Trine Bilde. 2019. "DNA Methylation Patterns in the Social Spider, *Stegodyphus dumicola*." *Genes* 10 (2). <https://doi.org/10.3390/genes10020137>.
- Lockwood, A. P.M. 1961. "'Ringer', Solutions and Some Notes on the Physiological Basis of Their Ionic Composition." *Comparative Biochemistry And Physiology* 2 (4): 241–89. [https://doi.org/10.1016/0010-406X\(61\)90113-X](https://doi.org/10.1016/0010-406X(61)90113-X).
- Lui, R. L., D. R. Blanco, O. Moreira-Filho, and V. P. Margarido. 2012. "Propidium Iodide for Making Heterochromatin More Evident in the C-Banding Technique." *Biotechnic and Histochemistry* 87 (7): 433–38. <https://doi.org/10.3109/10520295.2012.696700>.
- Mable, B. K. 2004. "'Why Polyploidy Is Rarer in Animals than in Plants': Myths and Mechanisms." In *Biological Journal of the Linnean Society*, 82:453–66. Oxford Academic. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2004.00332.x>.
- Maddison, Wayne P., and Geneviève Leduc-Robert. 2013. "Multiple Origins Of Sex Chromosome Fusions Correlated With Chiasma Localization In *Habronattus* Jumping Spiders (Araneae: Salticidae)." *Evolution* 67 (8): 2258–72. <https://doi.org/10.1111/evo.12109>.
- Maddison, Wayne Paul. 1982. "XXXY Sex Chromosomes in Males of the Jumping Spider Genus *Pellenes* (Araneae: Salticidae)." *Chromosoma* 85 (1): 23–37. <https://doi.org/10.1007/BF00344592>.
- Magalhaes, Ivan L.F., Pedro H. Martins, André A. Nogueira, and Adalberto J. Santos. 2017. "Finding Hot Singles: Matching Males to Females in Dimorphic Spiders (Araneidae : M Phylogenetic Placement and DNA Barcoding." *Invertebrate Systematics* 31 (1): 8–36. <https://doi.org/10.1071/IS15062>.
- Matsumoto, Seiji. 1977. "An Observation of Somatic Chromosomes from Spider Embryo-Cells." *Acta Arachnologica*. Vol. 27. [https://doi.org/10.2476/asjaa.27.Specialnumber\\_167](https://doi.org/10.2476/asjaa.27.Specialnumber_167).
- Mckee, Bruce D, and Gary H Karpent. 1990. "Dvwophila Rbosomal RNA Gwws Fun & on an X-Y Pairing Site During." *Cell*. Vol. 61.
- McStay, Brian. 2016. "Nucleolar Organizer Regions: Genomic 'Dark Matter' Requiring Illumination." *Genes and Development* 30 (14): 1598–1610. <https://doi.org/10.1101/gad.283838.116>.
- Michalik, Peter, and Martín J. Ramírez. 2014. "Evolutionary Morphology of the Male Reproductive System, Spermatozoa and Seminal Fluid of Spiders (Araneae, Arachnida) - Current Knowledge and Future Directions." *Arthropod Structure and Development*. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2014.05.005>.

- Milani, L., V. Scali, and M. Passamonti. 2009. "The Clonopsis Gallica Puzzle: Mendelian Species, Polyploid Parthenogens with Karyotype Re-Diploidization and Clonal Androgens in Moroccan Stick Insects (Phasmida)." *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 47 (2): 132–40. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2008.00489.x>.
- Muller, H. J. 1925. "Why Polyploidy Is Rarer in Animals Than in Plants." *The American Naturalist* 59 (663): 346–53. <https://doi.org/10.1086/280047>.
- Nong, Wenyan, Zhe Qu, Yiqian Li, Tom Barton-Owen, Annette Wong, Ho Yin Yip, Hoi Ting Lee, et al. 2020. "Horseshoe Crab Genomes Reveal the Evolutionary Fates of Genes and MicroRNAs after Three Rounds (3R) of Whole Genome Duplication." *BioRxiv*, April, 2020.04.16.045815. <https://doi.org/10.1101/2020.04.16.045815>.
- Ohno, Susumu. 1970. "The Enormous Diversity in Genome Sizes of Fish as a Reflection of Nature's Extensive Experiments with Gene Duplication." *Transactions of the American Fisheries Society* 99 (1): 120–30. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1970\)99<120:tedigs>2.0.co;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1970)99<120:tedigs>2.0.co;2).
- Orr, H. Allen. 1990. "'Why Polyploidy Is Rarer in Animals Than in Plants' Revisited." *The American Naturalist* 136 (6): 759–70. <https://doi.org/10.1086/285130>.
- Otto, Friedrich. 1990. "DAPI Staining of Fixed Cells for High-Resolution Flow Cytometry of Nuclear DNA." *Methods in Cell Biology* 33 (C): 105–10. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60516-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60516-6).
- Otto, S. P., and J. Whitton. 2000. "Polyploid Incidence and Evolution." *Annual Review of Genetics* 34 (1): 401–37. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.34.1.401>.
- Pajpach, Filip. 2018. "Karyotype Evolution of the Family Araneidae," June. <https://dspace.cuni.cz/handle/20.500.11956/98250>.
- Pardue, Mary Lou, and Joseph G. Gall. 1970. "Chromosomal Localization of Mouse Satellite DNA." *Science* 168 (3937): 1356–58. <https://doi.org/10.1126/science.168.3937.1356>.
- Paula-Neto, Emygdio, Doralice Maria Cella, Douglas Araujo, Antonio Domingos Brescovit, and Marielle Cristina Schneider. 2017. "Comparative Cytogenetic Analysis among Filistatid Spiders (Araneomorphae: Haplogynae)." *Journal of Arachnology* 45 (1): 123–28. <https://doi.org/10.1636/M14-69.1>.
- Platnick, N. I. 2015. "NMBE - World Spider Catalog." Natural History Museum Bern. 2015. <https://wsc.nmbe.ch/>.
- Platnick, Norman I., Jonathan A. Coddington, Raymond R. Forster, and Charles E. Griswold. 1991. "Spinneret Morphology and the Phylogeny of Haplogyne Spiders (Araneae, Araneomorphae)." *American Museum Novitates* 3016: 73 pp. <http://repository.si.edu/xmlui/handle/10088/8121>.

- Platnick, Norman I, and Willis J Gertsch. 1976. "AMERICAN MUSEUM Novitates PUBLISHED BY THE AMERICAN MUSEUM OF NATURAL HISTORY The Suborders of Spiders: A Cladistic Analysis (Arachnida, Araneae)."
- Pons, Joan, and Rosemary G. Gillespie. 2003. "Common Origin of the Satellite DNAs of the Hawaiian Spiders of the Genus *Tetragnatha*: Evolutionary Constraints on the Length and Nucleotide Composition of the Repeats." *Gene* 313 (1–2): 169–77. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00676-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00676-0).
- Qin, Qinbo, Weiguo He, Shaojun Liu, Jing Wang, Jun Xiao, and Yun Liu. 2010. "Analysis of 5s rDNA Organization and Variation in Polyploid Hybrids from Crosses of Different Fish Subfamilies." *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* 314 B (5): 403–11. <https://doi.org/10.1002/jez.b.21346>.
- Rasch, Ellen M., and Barbara A. Connelly. 2005. "Genome Size and Endonuclear DNA Replication in Spiders." *Journal of Morphology* 265 (2): 209–14. <https://doi.org/10.1002/jmor.10352>.
- Reeder, Ronald H., and Judith G. Roan. 1984. "The Mechanism of Nucleolar Dominance in *Xenopus* Hybrids." *Cell* 38 (1): 39–44. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90524-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90524-5).
- Roulin, Anne, Paul L. Auer, Marc Libault, Jessica Schlueter, Andrew Farmer, Greg May, Gary Stacey, Rebecca W. Doerge, and Scott A. Jackson. 2013. "The Fate of Duplicated Genes in a Polyploid Plant Genome." *Plant Journal* 73 (1): 143–53. <https://doi.org/10.1111/tpj.12026>.
- Rowell, D. M. 1990. "Fixed Fusion Heterozygosity in *Delena Cancerides* Walck. (Araneae: Sparassidae): An Alternative to Speciation by Monobrachial Fusion." *Genetica* 80 (2): 139–57. <https://doi.org/10.1007/BF00127134>.
- Sanggaard, Kristian W., Jesper S. Bechsgaard, Xiaodong Fang, Jinjie Duan, Thomas F. Dyrland, Vikas Gupta, Xuanting Jiang, et al. 2014. "Spider Genomes Provide Insight into Composition and Evolution of Venom and Silk." *Nature Communications* 5 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/ncomms4765>.
- Sember, Alexandr, Michaela Pappová, Martin Forman, Petr Nguyen, František Marec, Martina Dalíková, Klára Divišová, et al. 2020. "Patterns of Sex Chromosome Differentiation in Spiders: Insights from Comparative Genomic Hybridisation." *Genes* 11 (8): 1–28. <https://doi.org/10.3390/genes11080849>.
- Sharp, H. E., and D. M. Rowell. 2007. "Unprecedented Chromosomal Diversity and Behaviour Modify Linkage Patterns and Speciation Potential: Structural Heterozygosity in an Australian Spider." *Journal of Evolutionary Biology* 20 (6): 2427–39. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2007.01395.x>.
- Scharff, Nikolaj, Jonathan A. Coddington, Todd A. Blackledge, Ingi Agnarsson, Volker W. Framenau, Tamás Szűts, Cheryl Y. Hayashi, and Dimitar Dimitrov. 2020.

- “Phylogeny of the Orb-Weaving Spider Family Araneidae (Araneae: Araneoidea).” *Cladistics* 36 (1): 1–21. <https://doi.org/10.1111/cla.12382>.
- Schneider, M. C., A. A. Zacaro, R. M. Oliveira, P. Gnaspini, and D. M. Cella. 2009. “Conventional and Ultrastructural Analyses of the Chromosomes of *Discocyrtus Pectinifemur* (Opiliones, Laniatores, Gonyleptidae).” *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 47 (2): 203–7. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2008.00490.x>.
- Schubert, Ingo, and Martin A. Lysak. 2011. “Interpretation of Karyotype Evolution Should Consider Chromosome Structural Constraints.” *Trends in Genetics*. Elsevier Current Trends. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.03.004>.
- Schwager, Evelyn E., Prashant P. Sharma, Thomas Clarke, Daniel J. Leite, Torsten Wierschin, Matthias Pechmann, Yasuko Akiyama-Oda, et al. 2017. “The House Spider Genome Reveals an Ancient Whole-Genome Duplication during Arachnid Evolution.” *BMC Biology* 15 (1): 1–27. <https://doi.org/10.1186/s12915-017-0399-x>.
- Sochorová, Jana, Sònia Garcia, Francisco Gálvez, Radka Symonová, and Aleš Kovařík. 2018. “Evolutionary Trends in Animal Ribosomal DNA Loci: Introduction to a New Online Database.” *Chromosoma* 127 (1): 141–50. <https://doi.org/10.1007/s00412-017-0651-8>.
- Souza, Lucas Henrique Bonfim, Antonio Domingos Brescovit, and Douglas Araujo. 2017. “A New Species of *Synotaxus* and the First Chromosomal Study on Synotaxidae, Presenting a Rare XY Sex Chromosome System in Spiders (Araneae, Araneoidea).” *Zootaxa* 4303 (1): 140–50. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4303.1.9>.
- Stávale, L. M., M. C. Schneider, A. D. Brescovit, and D. M. Cella. 2011. “Chromosomal Characteristics and Karyotype Evolution of Oxyopidae Spiders (Araneae, Entelegynae).” *Genetics and Molecular Research* 10 (2): 752–63. <https://doi.org/10.4238/vol10-2gmr1084>.
- Stavale, Leila Miguel, Marielle Cristina Schneider, Douglas Araujo, Antonio Domingos Brescovit, and Doralice Maria Cella. 2010. “Chromosomes of Theridiidae Spiders (Entelegynae): Interspecific Karyotype Diversity in *Argyrodes* and Diploid Number Intraspecific Variability in *Nesticodes Rufipes*.” *Genetics and Molecular Biology* 33 (4): 663–68. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572010005000076>.
- Stitou, S., M. Burgos, F. Zurita, R. Jiménez, A. Sánchez, and R. Díaz de la Guardia. 1997. “Recent Evolution of NOR-Bearing and Sex Chromosomes of the North African Rodent *Lemniscomys Barbarus*.” *Chromosome Research*. Vol. 5. <https://doi.org/10.1023/A:1018473131446>.
- Suárez-Villota, E. Y., R. A. Vargas, C. L. Marchant, J. E. Torres, N. Köhler, J. J. Núñez, R. De La Fuente, J. Page, and M. H. Gallardo. 2012. “Distribution of Repetitive DNAs and the Hybrid Origin of the Red Vizcacha Rat (Octodontidae).” Edited by G. Jenkins. *Genome* 55 (2): 105–17. <https://doi.org/10.1139/g11-084>.

- Šestáková, A, M Krumpál, Z Krumpálová - Rod Araneus. NOI, Undefined Bratislava, and Undefined 2009. 2009. "Araneidae (Araneae) Strednej Európy: I."
- Šmarda, Petr, Petr Bureš, Lucie Horová, Bruno Foggi, and Graziano Rossi. 2008. "Genome Size and GC Content Evolution of *Festuca*: Ancestral Expansion and Subsequent Reduction." *Annals of Botany* 101 (3): 421–33. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm307>.
- Šmarda, Petr, Ondřej Knápek, Alexandra Březinová, Lucie Horová, Vít Grulich, Jiří Danihelka, Pavel Veselý, Jakub Šmerda, Olga Rotreklová, and Petr Bureš. 2019. "Genome Sizes and Genomic Guanine+cytosine (GC) Contents of the Czech Vascular Flora with New Estimates for 1700 Species." *Preslia* 91 (2): 117–42. <https://doi.org/10.23855/preslia.2019.117>.
- Šťáhlavský, František, Martin Forman, Pavel Just, Filip Denič, Charles R. Haddad, and Vera Opatova. 2020. "Cytogenetics of Entelegyne Spiders (Arachnida, Araneae) from Southern Africa." *Comparative Cytogenetics* 14 (1): 107–38. <https://doi.org/10.3897/compcytogen.v14i1.48667>.
- Suzuki, S. 1954. "Cytological Studies in Spiders. III. Studies on the Chromosomes of Fifty-Seven Species of Spiders Belonging to Seventeen Families, with General Considerations on Chromosomal Evolution." *J Sci Hiroshima Univ B* 15: 23–136.
- Tsutsui, Neil D., Andrew V. Suarez, Joseph C. Spagna, and J. Spencer Johnston. 2008. "The Evolution of Genome Size in Ants." *BMC Evolutionary Biology* 8 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-64>.
- Utsunomia, Ricardo, Priscilla C. Scacchetti, José C. Pansonato-Alves, Claudio Oliveira, and Fausto Foresti. 2014. "Comparative Chromosome Mapping of U2 SnRNA and 5S RRNA Genes in *Gymnotus* Species (Gymnotiformes, Gymnotidae): Evolutionary Dynamics and Sex Chromosome Linkage in *G. pantanal*." *Cytogenetic and Genome Research* 142 (4): 286–92. <https://doi.org/10.1159/000362258>.
- Peer, Yves Van De, Eshchar Mizrahi, and Kathleen Marchal. 2017. "The Evolutionary Significance of Polyploidy." *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.26>.
- Vasil'ev, Victor P. 2008. "Mechanisms of Polyploid Evolution in Fish: Polyploidy in Sturgeons." In *Biology, Conservation and Sustainable Development of Sturgeons*, 97–117. Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8437-9\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8437-9_6).
- Vinogradov, Alexander E. 1998. "Genome Size and GC-Percent in Vertebrates as Determined by Flow Cytometry: The Triangular Relationship." *Cytometry* 31 (2): 100–109. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19980201\)31:2<100::AID-CYTO5>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19980201)31:2<100::AID-CYTO5>3.0.CO;2-Q).
- Wang, Youju, D Song, X Wang, and Z Yang. 1993. "Preliminary Studies on the Chromosome of Four Species of Spiders." *Acta Arachnologica Sinica*. 1993. [http://en.cnki.com.cn/Article\\_en/CJFDTotol-ZXXB199302016.htm](http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotol-ZXXB199302016.htm).

- Wheeler, Ward C., Jonathan A. Coddington, Louise M. Crowley, Dimitar Dimitrov, Pablo A. Goloboff, Charles E. Griswold, Gustavo Hormiga, et al. 2017. "The Spider Tree of Life: Phylogeny of Araneae Based on Target-Gene Analyses from an Extensive Taxon Sampling." *Cladistics* 33 (6): 574–616. <https://doi.org/10.1111/cla.12182>.
- Whiting, Michael F., James C. Carpenter, Quentin D. Wheeler, and Ward C. Wheeler. 1997. "The Strepsiptera Problem: Phylogeny of the Holometabolous Insect Orders Inferred from 18S and 28S Ribosomal DNA Sequences and Morphology." *Systematic Biology*. 1997. <https://doi.org/10.1093/sysbio/46.1.1>.
- Wolfe, Kenneth H. 2001. "Yesterday's Polyploids and the Mystery of Diploidization." *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/35072009>.
- Xin, Xu, Fengxiang Liu, Jian Chen, Hirotosugu Ono, Daiqin Li, and Matjaž Kuntner. 2015. "A Genus-Level Taxonomic Review of Primitively Segmented Spiders (Mesothelae, Liphistiidae)." *ZooKeys* 488 (488): 121–51. <https://doi.org/10.3897/zookeys.488.8726>.
- Yacobi, Yosef Z. 2006. "Los Efectos de La Disponibilidad de Luz En Aguas Poco Profundas y Turbias: Un Estudio de Meso Cosmos." *Journal of Plankton Research* 28 (8): 725–36. <https://doi.org/10.1093/plankt>.
- Garrison, Nicole L., Juanita Rodriguez, Ingi Agnarsson, Jonathan A. Coddington, Charles E. Griswold, Christopher A. Hamilton, Marshal Hedin, Kevin M. Kocot, Joel M. Ledford, and Jason E. Bond. 2016. "Spider Phylogenomics: Untangling the Spider Tree of Life." *PeerJ* 2016 (2): e1719. <https://doi.org/10.7717/peerj.1719>.
- Rincão, Matheus Pires, João Lucas Chavari, Antonio Domingos Brescovit, and Ana Lúcia Dias. 2017. "Cytogenetic Analysis of Five Ctenidae Species (Araneae): Detection of Heterochromatin and 18S rDNA Sites." *Comparative Cytogenetics* 11 (4): 627–39. <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v11i4.10620>.
- Lynch, M., and J. S. Conery. 2000. "The Evolutionary Fate and Consequences of Duplicate Genes." *Science* 290 (5494): 1151–55. <https://doi.org/10.1126/science.290.5494.1151>.