

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká Fakulta
Katedra genetiky a mikrobiologie



Alexandr Sember

**Analýza karyotypu u vybraných bičovců řádů
Amblypygi a Uropygi**

Diplomová práce

Praha, 2010

Vedoucí práce: RNDr. Jiří Král, Dr.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením RNDr. Jiřího Krále, Dr.

Poděkování:

Chtěl bych poděkovat zejména svému školiteli RNDr. Jiřímu Královi, Dr., za odborné vedení mé práce a ostatním členům laboratoře (Mgr. Tereza Kořínková, Ing. Jana Musilová, Mgr. Martin Forman, Klára Jílková) za pomoc v průběhu experimentální fáze. Dále patří moje velké díky Prof. RNDr. Františku Marecovi, CSc., Ph.D. Magdě Vítkové, RNDr. Petru Nguyenovi a Mgr. Martině Dalíkové (ENTÚ AVČR, České Budějovice) za odborné vedení při aplikaci metod FISH. Rovněž si mé velké poděkování zaslouží celá řada kolegů za poskytnutí materiálu a jeho určení, jmenovitě Prof. Dr. Peter Weygoldt (Univerzita ve Freiburgu, Německo), Michael Seiter (Univerzita ve Vídni, Rakousko), Peter Grabowitz (Kolín nad Rýnem), Siegfried Huber (Oberuhlingen, Německo), Vladislav Šejna (Praha), Prof. José G. Palacios Vargas, Arturo García Gómez, Fernando Villagomez, Gabriela Castaño Meneses (Univerzita v Mexico City, Mexiko), Gilberto Varo de la Rosa (Cuautla, Mexiko) a Prof. Luis F. de Armas (Havana, Kuba).

Diplomová práce vznikla v letech 2008-2010 v rámci grantového projektu GAČR 42-201 55.

Summary

Karyotype analysis of selected species from arachnid orders Amblypygi and Uropygi

Whip spiders (Amblypygi) and whip scorpions (Uropygi) represent relict arachnid orders which has been found already at Upper Carboniferous strata. Although cytogenetic data from amblypygids and uropygids might be important to reconstruct karyotype evolution of arachnids, cytogenetics of these orders is almost unknown. Presented study is aimed in analysis of karyotype and meiosis in 16 species of Amblypygi and 4 species of Uropygi. Both groups are characterized by considerable range of diploid chromosome numbers ($2n = 24 - 86$ in Amblypygi and $36 - 66$ in Uropygi). Analysed species does not exhibit morfologically differentiated sex chromosomes. Differentiation of sex chromosomes on molecular level was revealed in amblypygid *Paraphrynus mexicanus* by comparative genome hybridization. Obtained data indicate XY/XX sex chromosome system in this species. Comparison of karyotype data indicates reduction of chromosome numbers during evolution of both orders. In Amblypygi, this reduction was accompanied by increase of number of biarmed chromosomes. This trend is not apparent in Uropygi. Karyotypes of most analysed amblypygids and uropygids are also characterized by low amount of heterochromatin. Most studied species exhibit two pairs (Amblypygi) or three pairs (Uropygi) of nucleolar organizer regions. Meiosis is chiasmatic with one, two or exceptionally three chiasmata per bivalent. Prophase I of all analysed species is characterized by presence of a diffuse stage.

Key words: Amblypygi, Arachnida, diffuse stage, fluorescence *in situ* hybridization, heterochromatin, chiasma, chromosome, karyotype, meiosis, nucleolar organizer region, sex chromosomes, Uropygi

Klíčová slova: Amblypygi, Arachnida difúzní stádium, fluorescenční hybridizace *in situ*, heterochromatin, chiazma, chromozom, karyotyp, meióza, nukleolární organizátor, pohlavní chromozomy, Uropygi

Slovník pojmů a seznam zkratk

A - akrocentrický chromozom, Levanova klasifikace

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

C pruh – vizualizovaný usek konstitutivního heterochromatinu

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

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

Denhardtovo činidlo - blokátor nespecifického nasednutí sondy nebo cytoplazmatických proteinů

DFC - denzní fibrilární komponenta jadérka

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

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

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

FC - fibrilární centra jadérka

FISH – Fluorescenční *in situ* hybridizace

GC - granulární komponenta jadérka

GISH – genomová *in situ* hybridizace, metoda používaná pro odhalení rozdílů mezi dvěma genomy, sondou je jedna celogenomová DNA

Heteropyknóza – odlišná barvitelnost chromozomů nebo jejich úseků. Může se jednat o pozitivní (materiál se barví více než ostatní chromozomy) nebo negativní heteropyknózu (jedná se o materiál který se barví méně než ostatní chromozomy)

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

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

M - metacentrický chromozom, Levanova klasifikace

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

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

PCR - polymerázová řetězová reakce, metoda amplifikace DNA

rDNA – úseky DNA, které kódují geny pro ribozomální RNA

SM - submetacentrický chromozom, Levanova klasifikace

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

ST - subtelocentrický chromozom, Levanova klasifikace

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

Obsah

1. Úvod	8
1.1 Cíle práce.....	9
2. Literární přehled	10
2.1 Taxonomie a biologie bičovců řádů Amblypygi a Uropygi.....	10
2.2 Cytogenetika pavoukoců.....	16
2.2.1 Základní charakteristiky karyotypů pavoukoců	16
2.2.2 Distribuce NOR a konstitutivního heterochromatinu.....	20
2.2.3 Průběh meiózy	30
2.2.4 Pohlavní chromozomy.....	31
2.3 Cytogenetika amblypygidních a uropygidních bičovců.....	33
3. Materiál a metody	34
3.1 Materiál	34
3.2 Metody	37
3.2.1 Příprava chromozomových preparátů	37
3.2.2 Vizualizace konstitutivního heterochromatinu pomocí C-pruhování.....	40
3.2.3 Analýza obsahu párů bází pomocí fluorescenčního pruhování pruhování.....	41
3.2.4 Vizualizace NOR pomocí dusičnanu stříbrného	42
3.2.5 Vizualizace NOR pomocí rDNA FISH	42
3.2.6 Detekce pohlavních chromozomů pomocí CGH	47
4. Výsledky	52
4.1 Karyotypy amblypygidních bičovců.....	52
4.2 Karyotypy uropygidních bičovců.....	85
4.2 Počet a distribuce rekombinací v genomu	94
5. Diskuze	95
5.1 Karyotypy	95
5.2 Distribuce heterochromatinu a nukleolárních organizátorů	103
5.3 Průběh meiózy a distribuce rekombinací v genomu	106
5.4 Detekce pohlavních chromozomů.....	108
6. Souhrn	112
7. Seznam literatury	114

1. Úvod

Cytogenetickému výzkumu bezobratlých živočichů se v poslední době věnuje zvýšená pozornost, ovšem v rámci kmene členovců (Arthropoda) se většina badatelů orientuje na hmyz. Ostatní skupiny členovců jsou z cytogenetického hlediska prozkoumány mnohem méně, což platí i pro třídu pavoukoců (Arachnida). Přestože je tomu již více než sto let kdy byl popsán první karyotyp pavoukoců (Carnoy 1885), cytogenetická data jsou dosud známa přibližně jen u 1100 druhů (J. Král, osobní sdělení). Je to tedy jen malý zlomek z celkového počtu 97 000 druhů pavoukoců (Harvey 2002). Karyotypy jednotlivých řádů pavoukoců nejsou navíc prozkoumány rovnoměrně. Nejintenzivněji byli dosud studováni pavouci, kde se uvádí 600 karyotypovaných druhů (J. Král, osobní sdělení), což jsou ale pouhé 2% z celkové druhové diverzity pavouků. Dalšími řády s relativně vysokými počty studovaných druhů jsou akariformní a parazitiformní roztoči, sekáči, štíři a štírci. U ostatních skupin pavoukoců informace o karyotypech buď zcela chybí, nebo jsou značně nekompletní (dosud máme údaje u 7 z 13 řádů pavoukoců). Dosud získané údaje naznačují vysoký rozsah diploidních počtů chromozomů u pavoukoců (4 - 175) (Oliver & Nelson 1967, Shanahan 1989b). Z hlediska morfologie jsou karyotypy většiny pavoukoců tvořeny standardními monocentrickými chromozomy s lokalizovanou centromerou a převažují chromozomy dvouramenné. U pavouků nadčeledi Dysderoidea (Král *et al.* 2006), akariformních roztočů (Oliver 1977) a štírů čeledi Buthidae (Shanahan 1989a) jsou však karyotypy tvořeny holocentrickými chromozomy, u kterých se nachází materiál vážící mikrotubuly dělicího vřeténka na většině povrchu chromozomu. Podobně jako u hmyzu je i u pavoukoců velká rozmanitost ve způsobu určení pohlaví. U některých skupin nebyly nalezeny pohlavní chromozomy (štíři, štírenky) (Shanahan 1989b, Král *et al.* 2008), u jiných se naopak vyskytují složité systémy pohlavních chromozomů

(např. pavouci)(Král 1994). U akariformních a parazitiformních roztočů jsou velmi časté různé formy partenogeneze (Oliver 1967, 1971, 1977). V předložené práci jsem se soustředil na bičovce řádů Amblypygi a Uropygi, jejichž cytogenetika je takřka neprozkoumaná.

1.1 Cíle práce

Má práce je zaměřena na evoluci základních chromozomových charakteristik u dvou řádů pavoukoců, Amblypygi a Uropygi. Cytogenetika těchto skupin je prakticky neznámá. Byl sledován počet a morfologie chromozomů, pohlavní chromozomy, konstitutivní heterochromatin, počet a poloha nukleolárních organizátorů jádérka (NOR), průběh meiotického dělení a frekvence a distribuce rekombinací v genomu. Získané údaje umožní rekonstruovat základní rysy karyotypové evoluce těchto řádů. Studium karyotypu těchto skupin je významné i z toho důvodu, že se jeví ve většině fylogenetických schémat (a to i na základě molekulárně fylogenetických analýz) jako nejpříbuznější pavoukům (Weygoldt & Paulus 1979, Shultz 1990). Karyotypy pavouků jsou velmi rozmanité, často zahrnují složité systémy pohlavních chromozomů (Král 1994). Není tedy lehké stanovit jejich primitivní (ancestrální) karyotyp. Jednou z možností, jak danou problematiku řešit, je prozkoumat a porovnat karyotypy příbuzných skupin, kterými jsou v tomto případě různé řády bičovců včetně amblypygidů a uropygidů. V diplomové práci jsem navázal na svou bakalářskou práci, ve které jsem popsal samčí karyotypy amblypygidních bičovců *Charinus neocaledonicus* (Charinidae) a *Damon medius* (Phrynichidae).

2. Literární přehled

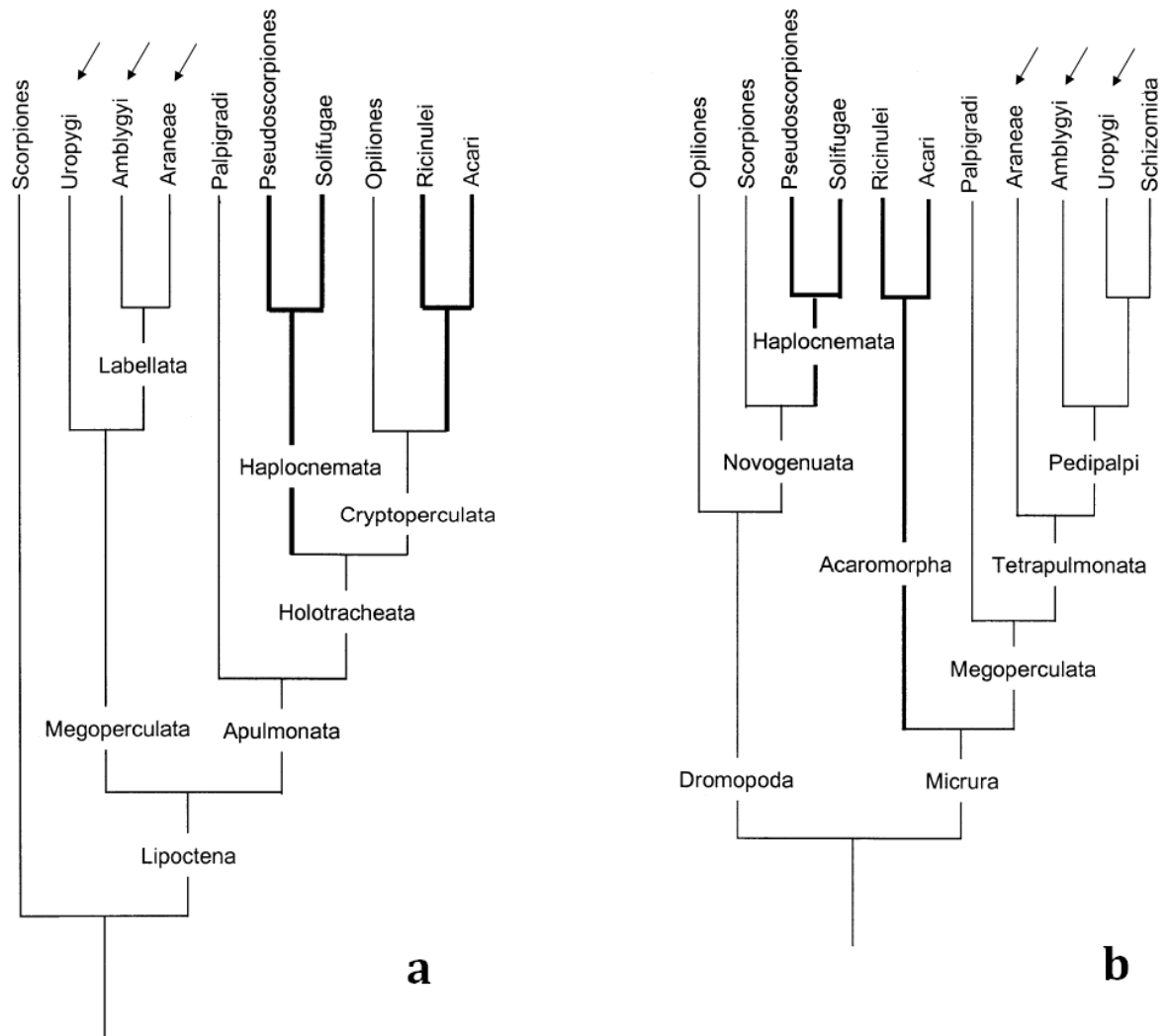
2.1 Taxonomie a biologie bičovců řádů Amblypygi a Uropygi

Amblypygidní a uropygidní bičovci patří do třídy pavoukoců (Arachnida), která se v současnosti většinou člení do 13 řádů zahrnujících dohromady 97 000 druhů (Harvey, 2002). Druhově nejpočetnějšími řády pavoukoců jsou pavouci (Araneae) (41 700 druhů) (Platnick 2010) a akariformní (Acariformes) a parazitiformní roztoči (Parasitiformes) (dohromady 48000 druhů) (Harvey 2002). Amblypygidní a uropygidní bičovci patří naopak mezi málo diverzifikované reliktní řády. Tyto skupiny jsou známy již od svrchního karbonu (Scudder 1884, Weygoldt 2000).

Amblypygi a Uropygi tvoří společně s dalším řádem bičovců (Schizomida) a pavouky (Araneae) tzv. tetrapulmonátní větev pavoukoců. Těmto skupinám jsou společné dva páry plicních vaků (alespoň primárně), dvoučlánkové (subchelátní) chelicery a zvláštní stavba mikrotubulů v bičíku spermií (struktura 9+3 narozdíl od stavby 9+2, jež je mezi živočichy nejobvyklejší) (Scharff & Enghoff 2005). Mezi Tetrapulmonata se někdy řadí také roztočovci (Ricinulei) a vyhynulý řád Trigonotarbida (Selden *et al.* 1991).

Názory na postavení jednotlivých řádů v rámci tetrapulmonátní větve pavoukoců nejsou jednotné. Podle jedné z hypotéz (Obr. 1a) jsou amblypygidi příbuznější pavoukům než ostatním bičovcům (Weygoldt & Paulus 1979) a tvoří s nimi skupinu označovanou také jako Labellata (Petrunkevitch 1955). Důvodem tohoto členění jsou společné znaky pavouků a amblypygidů, konkrétně úzká stopka mezi hlavohrudí a zadečkem, dobře vyvinutý savý žaludek a určité morfologické podobnosti v oblasti ústního ústrojí. Druhá hypotéza (Obr. 1b) považuje amblypygidy za sesterskou skupinu řádů Uropygi a Schizomida (Shultz 1990). Spolu s těmito řády pak tvoří skupinu bičovci (Pedipalpi), kterou spojuje podobná morfologie pedipalp uzpůsobených k lovu (loupeživé

pedipalpy), modifikovaný první pár kráčivých končetin (tykadlovité končetiny se smyslovou funkcí) a uchovávání vajíček ve vaječném váčku. V současnosti není možno rozhodnout mezi oběma hypotézami, a to ani na základě molekulárně fylogenetických analýz (Wheeler & Hayashi 1998, Giribet *et al.* 2002).



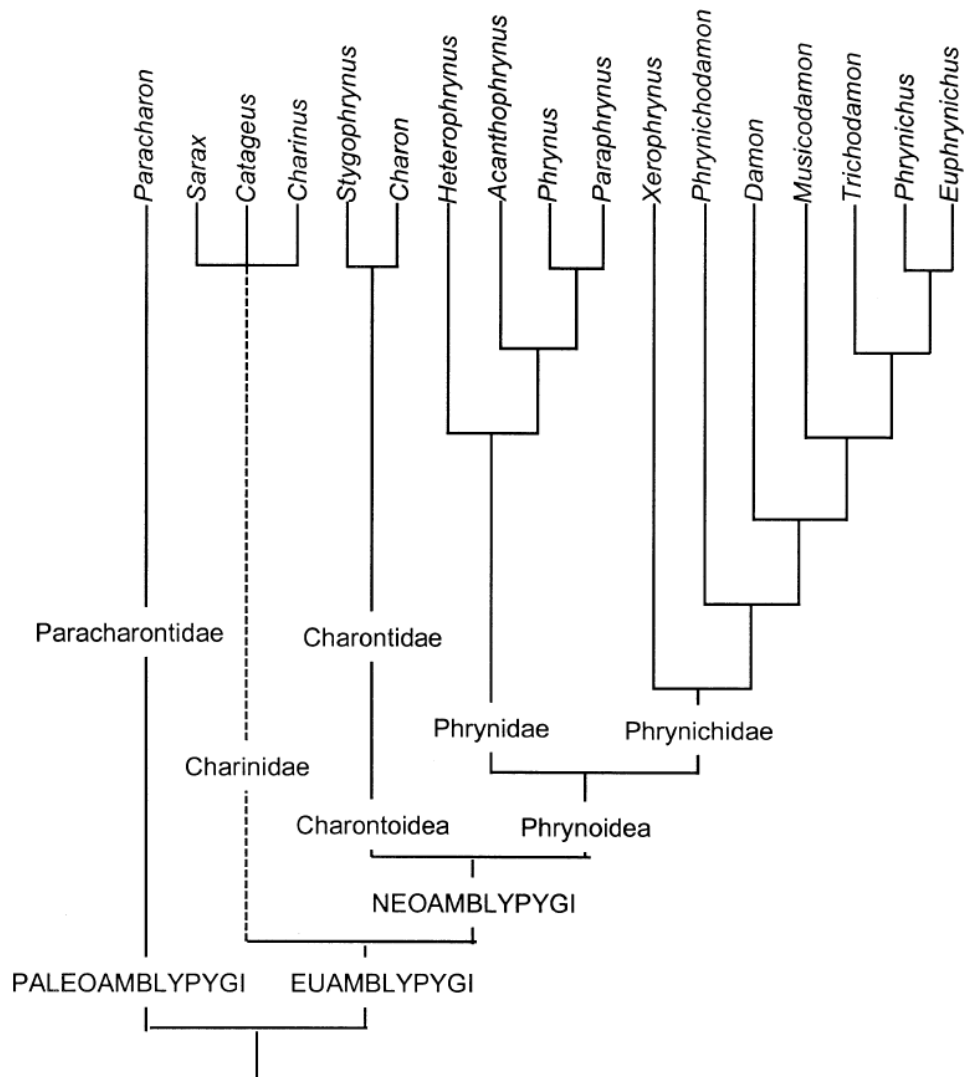
Obr.1: Systematické členění řádu pavoukovců, jak jej prezentují **a** Weygoldt a Paulus (1979) a **b** Schultz (1990). Zvýrazněné linie naznačují shodu mezi oběma verzemi kladogramů. Šipky ukazují postavení diskutovaných řádů v rámci tetrapulmonátní větve pavoukovců. Kladogramy nezobrazují členění roztočů (Acari) na akariformní, parazitiformní a opilioakariformní roztoče. Převzato z Harvey 2002.

Důležité ovšem je, že obě schémata naznačují blízkou příbuznost řádů bičovců s pavouky, a proto může být poznání karyotypové evoluce těchto skupin důležité pro pochopení vzniku a vývoje některých chromozomových charakteristik u pavouků.

Amblypygidní bičovci se člení do dvou podřádů: Paleoamblypygi a Euamblypygi (Weygoldt 1996a, 1996b). Podřád Paleoamblypygi zahrnuje pouze čeleď Paracharontidae s jediným zástupcem *Paracharon caecus*. Podřád Euamblypygi obsahuje zbylé 4 čeledi: Charinidae, Charontidae, Phrynidae a Phrynichidae. Za fylogeneticky nejpůvodnější skupinu amblypygidů je považována čeleď Paracharontidae a v rámci podřádu Euamblypygi čeleď Charinidae (Weygoldt 1996a) (Obr. 2). Podle jiných autorů se amblypygidi člení na pulvilátní (Charinidae a Charontidae) a apulvilátní (Phrynidae a Phrynichidae) (Quintero 1986 in Weygoldt 2000) na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti záchytných chloupků na kráčivých končetinách. Dosud bylo popsáno 17 rodů a 165 recentních druhů amblypygidních bičovců (Harvey 2002, M. Seiter, osobní sdělení).

Uropygidní bičovci představují uniformnější řád s jedinou čeledí Thelyphonidae (Lucas 1835), která zahrnuje 16 rodů se 107 druhy (Haupt & Song 1996, Harvey 2002).

Amblypygidní a uropygidní bičovci mají řadu společných charakteristik, které se týkají především morfologie některých končetin a způsobu života. Jedná se o tropické nebo subtropické pavoukovce žijící v oblastech s vysokou vlhkostí vzduchu, zejména v tropických deštných pralesech. Některé odolnější druhy však obývají i takové biotopy jako jsou pouště nebo savany. Amblypygidi byli nejdále na severu nalezeni na řeckém ostrově Rhodos a na jihu v Jihoafrické republice (Weygoldt 2000). Uropygidi byli nejdále na severu nalezeni v Texasu a na jihu na ostrově Fidži v Oceánii (Harvey 2002). Charakteristickými znaky všech bičovců jsou mohutné loupeživé pedipalpy opatřené



Obr.2: Systematické členění řádu Amblypygi (Weygoldt 1996a, 1996b). Převzato z Harvey 2002.

četnými trny, jimiž tyto pavoukovci uchvacují svou kořist. U amblypygidů jsou pedipalpy někdy až extrémně prodloužené a v některých případech se díky jejich délce dá určit pohlaví daného jedince. Druhým typickým znakem bičovců je tykadlovitý první pár kráčivých končetin, který v průběhu evoluce získal hmatovou funkci. Podle zvláštní stavby prvního páru dostaly tyto skupiny své jméno - bičovci. U amblypygidů se koncové články těchto končetin druhotně rozčlenily do mnoha (u některých druhů i více než 100) článků

(Weygoldt 2000). Na rozdíl od amblypygidů jsou tyto končetiny u uropygidů a schizomidů znatelně kratší. Od amblypygidů se řády Uropygi a Schizomida liší také tím, že mají podlouhlé tělo, které není tolik dorzoventrálně zploštělé. Jejich zadeček je navíc zakončen dlouhým článkovaným bičíkem. Do jeho báze ústí ze zadečku žlázy produkující směs tvořenou alifatickými nasycenými monokarboxylovými kyselinami jako např. kyselinami octovou a kaprylovou (Eisner *et al.* 1961). Někdy je sekret obohacen ještě o ketony, alkoholy a estery (Haupt *et al.* 1988, 1993). Tuto páchnoucí směs jsou schopni uropygidi vystříknout na potenciálního predátora a tím ho odradit od možného útoku. Amblypygidní bičovci mají naopak tělo spíše široké než dlouhé a daleko výrazněji dorzoventrálně zploštělé. Díky tomu mohou zalézat do různých škvír, a proto se obvykle vyskytují pod kameny a kůrou stromů nebo v jeskyních. Uropygidní bičovci se rádi zahrabávají do země, kde si tvoří nory a různé chodbičky.

U obou řádů se jedná o noční dravce. Strategie jejich lovu je taková, že nejprve nehnutě vyčkávají a poté kořist uchvátí rychlým výpadem robustních pedipalp. Bičovci nemají jedové žlázy jako např. většina pavouků, proto je pro uchvácení kořisti nejdůležitější síla pedipalp. Kořistí se obvykle stává hmyz (například noční motýli), mohutnější druhy dokáží ulovit i drobné obratlovce. Ochotně přijímají i usmrcenou potravu. Po nasycení dokáží přežít bez přísunu potravy až několik týdnů (Weygoldt 2000).

Bičovci obvykle žijí soliterně, každý jedinec si brání své teritorium (strom, část jeskyně apod.) před ostatními příslušníky svého druhu. Setkání dvou jedinců může vést k agresivnímu chování, které u samců někdy vyústí v druhově specifický ritualizovaný souboj. Jeho účelem je primárně pouze vyjasnění dominantní a submisivní role obou soupeřů. U některých bičovců byl však pozorován i kanibalismus (Weygoldt 2000). Určitého stupně sociality dosáhli jen amblypygidní bičovci *Damon diadema*

(Phrynichidae) a *Phrynus marginemaculatus* (Phrynidae), jejichž jedinci se občas sdružují do skupin (Rayor & Taylor 2006).

Noc je pro bičovce významná i z hlediska páření. Bičovci jsou gonochoristi s nepříliš výrazným (někdy až těžko postřehnutelným) pohlavním dimorfismem. U většiny druhů je poměr pohlaví 1:1. Výjimkami jsou amblypygidi druhů *Charinus acosta* (Quintero 1983) z Kuby a řecké populace druhu *Charinus ioanniticus* (Kritscher 1959), které se vyznačují thelytokní partenogenezí (de Armas 2000). Oplození je u všech řádů bičovců nepřímé, a to pomocí spermatoforů (Alexander 1962a,b; Klingel 1963, Weygoldt 1969 in Weygoldt 1999b). Páření je charakterizováno dlouhými druhově specifickými zasnubními tanci (Weygoldt 1999b). Samička klade vajíčka několik týdnů až měsíců po oplození a poté je nosí ve vaječném váčku na ventrální straně zadečku. Po třech měsících se vylíhnou tzv. praenymfy, které se přemístí z břišní na hřbetní stranu zadečku matky a tam setrvají do dalšího svlékání. Nakonec matku opustí a začínají žít samostatně (Weygoldt 2000).

Amblypygidní bičovci se na rozdíl od ostatních pavoukovců (s výjimkou samiček mygalomorfních pavouků) svlékají i po dosažení dospělosti. Pro uropygidní bičovce tato charakteristika neplatí. Pro oba řády je ovšem společné, že se jedná o dlouhověké pavoukovce. Délka života není u většiny druhů známa, amblypygidní bičovci se mohou v laboratorních podmínkách dožít až deseti let (Weygoldt 2000).

2.2 Cytogenetika pavoukoců

2.2.1 Základní charakteristiky karyotypů pavoukoců

V rámci třídy pavoukoců bylo cytogeneticky prozkoumáno přibližně jen 1100 druhů z celkového počtu 97000 druhů. Jednotlivé řády pavoukoců jsou navíc prozkoumány velmi nerovnoměrně. Nejvíce druhů (přibližně 600) bylo dosud studováno u pavouků (J. Král, osobní sdělení), tento počet je však stále velmi nízký. Údaje o dalších řádech, u nichž se cytogenetické studie prováděly, shrnuje následující tabulka (Tab. 1).

Karyotypy pavoukoců: základní údaje			
Řád	Diploidní počet chromozomů samců	Počet karyotypovaných druhů	Celkový počet druhů
Pavouci (Araneae)	7 - 128	cca 600	41 719
Roztoči (Parasitiformes)	6 - 32	cca 167	48 181
Roztoči (Acariformes)	4 - 26	cca 173	
Štírci (Pseudoscorpiones)	10 - 74	cca 60	3 239
Sekáči (Opiliones)	10 - 109	cca 90	6 000
Štíři (Scorpiones)	5 - 175	77	1 750
Štírenky (Palpigradi)	14 - 18	2	78

Tab. 1. Počty karyotypovaných druhů a rozsahy diploidních počtů u různých skupin pavoukoců.

Z tabulky 1 je patrné, že se pavoukovci většinou vyznačují velkým rozsahem diploidních počtů chromozomů. Výjimku tvoří řády akariformních a parazitiformních roztočů a štírenky, kde je rozsah diploidních počtů malý. Současně se jedná o skupiny s nízkým počtem chromozomů. Nejnižší diploidní počet byl nalezen u akariformního roztoče *Harpyrhynchus brevis* ($2n = 4$) (Oliver & Nelson 1967), nejvyšší u štíra *Urodacus novaehollandiae* ($2n = 175$) (Shanahan 1989b).

Z hlediska morfologie chromozomů jsou karyotypy většiny pavoukovců tvořeny standardními monocentrickými chromozomy s lokalizovanou centromerou, převažují chromozomy dvouramenné. Pouze u pavouků nadčeledi Dysderoidea (Král *et al.* 2006), akariformních roztočů (Oliver 1977) a štírů čeledi Buthidae (Shanahan 1989a) jsou karyotypy tvořeny chromozomy holocentrickými.

U pavouků se diploidní počty chromozomů pohybují v rozpětí od 7 (*Ariadna lateralis*, Segestriidae) (Suzuki 1954) do 128 (*Cyclocosmia siamensis*, Ctenizidae) (Dulíková & Král 2007) (Tab. 1). Drtivou většinu prozkoumaných druhů představují zástupci tzv. entelegynní větve araneomorfních pavouků, která je druhově nejpočetnější skupinou řádu (Řezáč *et al.* 2006). Ostatní skupiny - bazální větve araneomorfních pavouků (haplogynní a paleokribelátní pavouci), sklípkaní (Mygalomorphae) a sklípkoši (Mesothelae) jsou z cytogenetického hlediska prozkoumány velmi málo (Řezáč *et al.* 2006, Král *et al.* 2007, Araújo *et al.* 2008). Obecně platí, že pavouci skupin Mesothelae a Mygalomorphae, kteří se vyznačují řadou plesiomorfních znaků, mají vyšší diploidní počty chromozomů (Suzuki 1954). Karyotypy entelegynních pavouků jsou tvořeny až na výjimky jen akrocentrickými chromozomy (Sharma *et al.* 1959). U ostatních skupin naopak převažují chromozomy metacentrické nebo submetacentrické (Král *et al.* 2006). Výjimkami u entelegynních pavouků jsou např. maloočka *Heteropoda sexpunctata*

(Sparassidae) (Bole – Gowda 1952) nebo křižák *Aranea dumetorum* (Araneidae) (Hackman 1948) v jejichž karyotypech je patrná převaha dvouramenných chromozomů. Vzhledem k tomu že diploidní počet chromozomů je u těchto pavouků poloviční oproti příbuzným druhům s akrocentrickými chromozomy, je velmi pravděpodobné, že jejich karyotyp byl odvozen sérií translokací Robertsonova typu (Král 1994).

U roztočů bylo karyotypováno zatím 167 druhů řádu Parasitiformes a 173 druhů řádu Acariformes (Oliver 1977, Norton *et al.* 1993) (Tab. 1). Parazitiformní roztoči mají chromozomy monocentrické a většinou jednoramenné, akariformní roztoči mají chromozomy holocentrické. Diploidní počty jsou u obou řádů nízké (Tab. 1). Někteří zástupci pancířníků (Oribatida) vznikli pravděpodobně polyploidizací, jejich karyotypy jsou totiž tvořeny 36 chromozomy (u dalších pancířníků byly nalezeny pouze karyotypy tvořené 16 nebo 18 chromozomy) (Oliver 1967).

Velké rozpětí diploidních počtů chromozomů nacházíme u štírků (Pseudoscorpiones), u nichž bylo dosud karyotypováno zhruba 60 druhů z deseti čeledí (Šťáhlavský 2006) (Tab. 1). Diploidní počty chromozomů se pohybují od 10 u *Allochthonius buanensis* (Chthoniidae) (Lee & Seo 1995) do 74 u *Lasiochernes cretonatus* (Chernetidae) (Šťáhlavský *et al.* 2005). Karyotypy většiny druhů jsou tvořeny dvouramennými chromozomy. Zastoupení jednotlivých morfologických typů chromozomů v karyotypech se však značně mění i v rámci jednoho rodu. Příkladem může být rod *Roncus* (Neobisiidae), v jehož karyotypové evoluci sehrály zřejmě důležitou roli Robertsonovy translokace a rozpad metacentrických chromozomů na akrocentriky (Troiano 1990, 1997). U čeledi Chthoniidae (Šťáhlavský & Král 2004) se na změnách karyotypu podílely pravděpodobně centrické a tandemové fúze a pericentrické inverze. U obou čeledí je evoluce karyotypu doprovázena redukcí diploidního počtu chromozomů.

U sekáčů se diploidní počty pohybují mezi 10 (*Sabacon makinoi*, Sabaconidae; *Paraumbogrella pumilio* a *Systemocentrus japonicus*, Sclerosomatidae) (Tsurusaki 1982a, 1989, 1993) a 109 (*Goniosoma spelaeum*, Gonyleptidae) (Oliveira *et al.* 2000) (Tab. 1). V případě *Goniosoma spelaeum* byly nalezeny různé počty chromozomů, a to v rozmezí od 92 do 109 chromozomů. Počty chromozomů kolísaly i v rámci jedinců. Dosavadní data naznačují převahu druhů s nižšími diploidními počty, které byly pravděpodobně u sekáčů ancestrální (Schneider *et al.* 2009). Karyotypováno bylo přibližně 90 druhů, pokud zahrneme i nepublikovaná data (Tsurusaki 2007). V karyotypech sekáčů převažují opět dvouramenné chromozomy. Výjimku tvoří dva druhy, *Siro rubens* (Sironidae) (Juberthie 1956) a *Caddo agilis* (Caddidae) (Tsurusaki 1986b), kde převažují chromozomy akrocentrické. Je zajímavé, že u sekáčů kolísá často počet a morfologie chromozomů i v rámci jednoho druhu. Příčinou tohoto jevu může být malá pohyblivost sekáčů, kteří často tvoří izolované populace. Ty se pak vyvíjejí samostatně a liší se svými karyotypy (Tsurusaki & Cokendolpher 1990). U sekáčů byly navíc popsány i nadpočetné (B) chromozomy (Tsurusaki 2007). Byly objeveny například u druhu *Psathyropus tenuipes* (Tsurusaki 1993; Gorlov & Tsurusaki 2000a,b; Tsurusaki & Shimada 2004).

U štírů (Scorpiones) bylo zatím karyotypováno 77 druhů (Schneider *et al.* 2009a) (Tab. 1). Získaná data naznačují velké rozdíly v chromozomových charakteristikách mezi dvěma hlavními evolučními větvemi této skupiny pavoukoců. Z první větve bylo karyologicky prozkoumáno 8 čeledí: Bothriuridae, Iuridae, Chactidae, Euscorpiidae, Liochelidae, Scorpionidae, Urodacidae a Vaejoidea a z druhé větve její jediná čeleď Buthidae. Diploidní počty se pohybují od 5 (*Tityus bahiensis*, Buthidae; Schneider *et al.* 2009b) do 175 chromozomů (*Urodacus novaehollandiae*, Urodacidae; Shanahan 1989b). Zatímco karyotypy štírů čeledi Buthidae sestávají z nižšího počtu ($2n =$

5 - 28) holocentrických chromozomů (White 1973, Shanahan 1989a), pro druhou vývojovou větev je charakteristický vyšší počet monocentrických chromozomů (29 – 175) a značná variabilita karyotypu, dokonce i mezi populacemi jednoho druhu (Shanahan 1989a, Shanahan & Hayman 1990).

Pionýrská studie karyotypů řádu štírenek (Palpigradi) byla provedena na dvou zástupcích rodu *Eukoenaenia*, *E. spelaea* a *E. mirabilis* (Král *et al.* 2008). Oba druhy se vyznačují nízkým počtem monocentrických chromozomů. Karyotyp druhu *E. spelaea* se skládá z 18 a karyotyp *E. mirabilis* ze 14 chromozomů. Chromozomy těchto druhů jsou drobné a pravděpodobně akrocentrické.

Karyotypy zbylých pěti řádů pavoukoců nebyly dosud studovány nebo jen velmi fragmentárně. Informace o cytogenetice pavoukoců jsou tedy značně omezené, zatím není možné vypracovat schéma jejich karyotypové evoluce.

Následující charakteristiky karyotypu nebudou probrány rovnoměrně. V souladu s výsledky mé práce bude některým z nich věnována větší pozornost.

2.2.2 Distribuce NOR a konstitutivního heterochromatinu

Chromozomy jsou tvořeny materiálem, který se skládá z DNA, proteinů a dalších složek (RNA). Tento materiál je označován jako chromatin a na základě určitých rozdílných charakteristik se dále člení na euchromatin a heterochromatin (Sumner 2003). Euchromatin se slabě barví jadernými barvivy, obsahuje většinu transkribovaných genů a jen málo repetitivních sekvencí (Balíček *et al.* 1977). Heterochromatin je naopak geneticky inaktivní, více spiralizován (barví se tudíž intenzivněji jadernými barvivy),

převažují v něm různé typy středně a vysoce repetitivních DNA, replikuje se později v S-fázi než euchromatin (John 1988) a může umlčovat přilehlé geny v euchromatinu (tzv. poziční efekt) (Karpen 1994, Weiler & Wakimoto 1995). Heterochromatin byl poprvé definován Heitzem (1928). Brown (1966) rozdělil heterochromatin na dva strukturně i funkčně velmi rozdílné typy - fakultativní a konstitutivní heterochromatin.

V případě fakultativního heterochromatinu jsou chromozomy nebo jejich úseky heterochromatinické jen v určité tkáni nebo ontogenetické fázi nebo jen u jednoho pohlaví, jinak se chovají jako euchromatin. Přeměna euchromatinu na fakultativní heterochromatin (heterochromatinizace) je navozována epigeneticky a může se v dané podobě dědit po mnoho buněčných dělení. Může se jednat například o heterochromatinizaci jednoho chromozomu určitého páru. Fakultativní heterochromatin souvisí často s determinací pohlaví, bývá vázán na pohlavními chromozomy. Klasickým případem je Barrovo tělísko, které vzniká inaktivací jednoho chromozomu X (Lyon 1961) nebo heterochromatinizace pohlavních chromozomů v profázi I reprimující jejich možnou rekombinaci (Jablonka & Lamb 1990).

Konstitutivní heterochromatin je na rozdíl od fakultativního spiralizován trvale na obou homologických chromozomech a liší se sekvenčně i skladbou navázaných proteinů od euchromatinu. Konstitutivní heterochromatin obecně nevykazuje žádnou nebo jen velmi malou transkripční aktivitu. Přestože v heterochromatinu obvykle nedochází ke transkripci, byl tento jev popsán u některých rostlin (Nagl & Schmitt 1985) a obratlovců (Varley *et al.* 1980, Sperling *et al.* 1987). U řady transkriptů však není jasná jejich funkce. V heterochromatinu *Drosophilla melanogaster* byly dokonce identifikovány protein-kódující sekvence specifické pro konstitutivní heterochromatin. U těchto sekvencí nedochází k jejich expresi po přenosu z heterochromatinu do euchromatinu (Lohe &

Hilliker 1995, Weiler & Wakimoto 1995). V konstitutivním heterochromatinu nedochází dále k rekombinacím (John 1988, Sumner 1990). Tento chromatin je možné vizualizovat určitými metodami, například C-pruhováním (Pardue & Gal 1970, Sumner 1972). Heterochromatin může ve specifických případech zastupovat synaptonemální komplex a chiazmata při párování a segregaci chromozomů v meióze. Příkladem mohou být samečci *Drosophilla melanogaster*, kteří se vyznačují achiazmatickou meiózou. Jejich pohlavní chromozomy X a Y párují pouze v heterochromatinových úsecích zvaných collochory, které se nacházejí v nukleolárních organizátorech (NOR; nucleolar organizer region) a umožňují homologní párování jinak nehomologních chromozomů X a Y prostřednictvím mnohonásobných kopií 240 bp dlouhých sekvencí v IGS (intergenic spacer) (Hawley & Theurkauf 1993, Irick 1994, Lohe & Hilliker 1995). Existují také důkazy, že se heterochromatin asociovaný s centromerou se podílí na kohezi mitotických chromozomů až do anafáze (Lica *et al.* 1986; Sumner 1991). Tyto úseky obsahují vysokou koncentraci enzymu topoizomerázy II, který se může podílet na separaci těchto heterochromatinových úseků v anafázi (Sumner 1996).

Bloky konstitutivního heterochromatinu se na chromozomech nenacházejí zcela náhodně, ale jsou většinou lokalizovány v centromerách a telomerách. Konstitutivní heterochromatin je rovněž často asociován s nukleolárními organizátory, které pravděpodobně pomáhá chránit před nežádoucími rekombinacemi (tzv. bodyguard hypotéza) (Hsu 1975). Nukleolární organizátory a tedy i asociované bloky heterochromatinu se často nacházejí na krátkých raménkách subtelocentrických nebo akrocentrických chromozomů. Heterochromatin může být lokalizován také intersticiálně, tedy uvnitř ramene chromozomu. Intersticiální bloky heterochromatinu se často nacházejí u hmyzu a rostlin s velkými chromozomy (Sumner 2003). Bloky heterochromatinu jsou

značně variabilní součástí genomu, jež se mohou lišit svou délkou v rámci druhu či populace nebo dokonce i u téhož jedince v rámci páru homologických chromozomů. Podobnou variabilitu nacházíme u konstitutivního heterochromatinu i na úrovni sekvencí (Sumner 1990).

Bloky konstitutivního heterochromatinu je možné vizualizovat pomocí C-pruhování (Pardue & Gal 1970, Sumner 1972). Tato metoda byla vyvinuta jako vedlejší produkt technik hybridizace *in situ*. Pruhy jsou často lokalizovány v centromerických oblastech - odtud pramení název metody. V některých případech ovšem C-pruhováním není možné bloky konstitutivního heterochromatinu zachytit, přestože dané oblasti vykazují známky heterochromatinu - například u kvasinek z důvodu malé velikosti chromozomů (Grunstein 1998) nebo u telomerických bloků *Drosophila* (Cryderman *et al.* 1999). V rámci jednoho druhu nejsou obvykle pozorovány velké odchylky v celkovém množství heterochromatinu v karyotypu. U různých druhů (které mohou být i velmi příbuzné) se však již může jednat o značné odchylky (White 1973, Sumner 1990). Ke ztrátě heterochromatinu může dojít například při centrické fúzi, kdy se ztratí krátká raménka akrocentrických chromozomů tvořená heterochromatinem (Perry *et al.* 2004).

Většina segmentů konstitutivního heterochromatinu obsahuje na rozdíl od euchromatinu a fakultativního heterochromatinu velké množství vysoce repetitivní (satelitní) DNA. Jedná se o DNA, která při centrifugaci v hustotním gradientu CsCl tvoří oddělený (satelitní) pík (Beridze 1986). Tyto sekvence se mohou lišit ve svém složení (AT- nebo GC-bohaté), v délce a počtu opakování repetice (Beridze 1986, Sumner 1990). Různý obsah bází se dá využít pro bližší charakterizaci heterochromatinu pomocí kombinace AT (DAPI, chinakrin) a GC-specifických fluorochromů (chromomycin A₃, mithramycin). Tato metoda se nazývá fluorescenční pruhování (Sumner 1990, Sola 1992).

Konstitutivní heterochromatin může být v některých případech tvořen pouze středně repetitivními sekvencemi a mohou se v něm akumulovat transponovatelné elementy (Ananiev *et al.* 1998b, Dimitri & Junakovič 1999, CSHL/WUGSC/PEB *Arabidopsis* Sequencing Consortium 2000). Vlastnosti konstitutivního heterochromatinu nezávisí na přítomnosti určité specifické sekvence. Pro konstitutivní heterochromatin je specifická modifikace jednoho z nukleotidů (metylace cytosinu na pozici 5) která se uplatňuje při jeho kondenzaci. Vysoký stupeň této metylace byl nalezen v satelitní DNA mnoha druhů rostlin a savců (Beridze 1986, CSHL/WUGSC/PEB *Arabidopsis* Sequencing Consortium 2000). Pro konstitutivní heterochromatin je dále typická přítomnost specifických proteinů nebo modifikací určitých proteinů. Charakteristickým znakem heterochromatinu je hypoacetylace histonu H4 u rostlin (Belyev *et al.* 1997), *Drosophila* (Turner *et al.* 1992) a savců (Jeppesen *et al.* 1992), která je spojena s inaktivací transkripce. Pro heterochromatin je typická přítomnost proteinu HP1 (heterochromatinový protein 1) a jemu podobných proteinů, což bylo potvrzeno u celé řady organismů (Eissenberg & Elgin 2000). HP1 a podobné proteiny obsahují na svém N-konci tzv. chromodoménu (chromosome organization modifier domain) (Eissenberg & Elgin 2000), pomocí které se vážou na histon H3, pokud je metylovaný na lysinu v pozici 9 (Bannister *et al.* 2001, Lachner *et al.* 2001), což je histonová modifikace, která je spojená s inaktivací transkripce. Koncentrace HP1 v heterochromatinu je pravděpodobně spjata s jeho fosforylací (Eissenberg *et al.* 1994).

Některé organismy jako např. škrkavky (Nematoda) (Müller *et al.* 1996), klanonožci (Copepoda) (Beerman 1977) nebo sliznatky (Nakai *et al.* 1995) eliminují heterochromatin ze svých buněk během časného stádia ontogeneze, heterochromatin u nich zřejmě nemá žádnou funkci v somatických buňkách. Nejlépe je tento jev prostudován

u parazitických hlístic, kde dochází v časném vývojovém stádiu u somatických buněk k fragmentaci chromozomů, přičemž je většina heterochromatinu ztracena (např. 80 - 90% u *Parascaris univalens*) (Müller *et al.* 1996). U dvoukřídlého hmyzu (Diptera) bývá během polytenizace heterochromatin podreplikován (John 1988, Reuter & Spierer 1992, Karpen 1994, Weiler & Wakimoto 1995).

Jak již bylo zmíněno, konstitutivní heterochromatin je často asociován s místy na chromozomech, která se nazývají nukleolární organizátory protože obsahují tandemové repetice rDNA, okolo nichž se v telofázi organizuje jadérko (nukleolus) (Scheer *et al.* 1993, Swarzacher & Wachtler 1993). Na chromozomech jsou tato místa viditelná jako sekundární konstriktce (Sumner 2003). V interfázních jádrech vytváří heterochromatin často kolem jadérka kondenzované bloky, tzv. chromocentra. První soubornou práci o struktuře jadérka publikoval již Leydig (1852). V šedesátých letech minulého století bylo objeveno, že jadérko je místem syntézy ribozomální RNA (Perry *et al.* 1961, Perry 1962, Edström 1961). Dochází v něm však nejen k transkripci rDNA, ale i k úpravám prekurzorové ribozomové RNA (pre-rRNA), na níž se podílí malé jadérkové RNA („small nucleolar RNA, snoRNA“) a odehrává se zde také počáteční fáze sestavení ribozomů (Wachtler & Stahl 1993, Pederson 1998, Gerbi *et al.* 2003).

Jadérko má poměrně složitou strukturu, je tvořeno třemi hlavními částmi charakterizovanými na základě pozorování v elektronovém mikroskopu. Jedná se o tzv. fibrilární centra („fibrillar centres“, FCs), hustou fibrilární část („dense fibrillar component“, DFC) a granulární část („granular component“, GC) (Swarzacher & Wachtler 1993, Wachtler & Stahl 1993). Centrální část jadérka tvoří většinou fibrilární centra o nízké elektronové hustotě. Tato centra jsou tvořena rDNA a proteiny, mezi něž patří i RNA polymeráza I. Fibrilární centra jsou obklopena hustou fibrilární částí, jež je

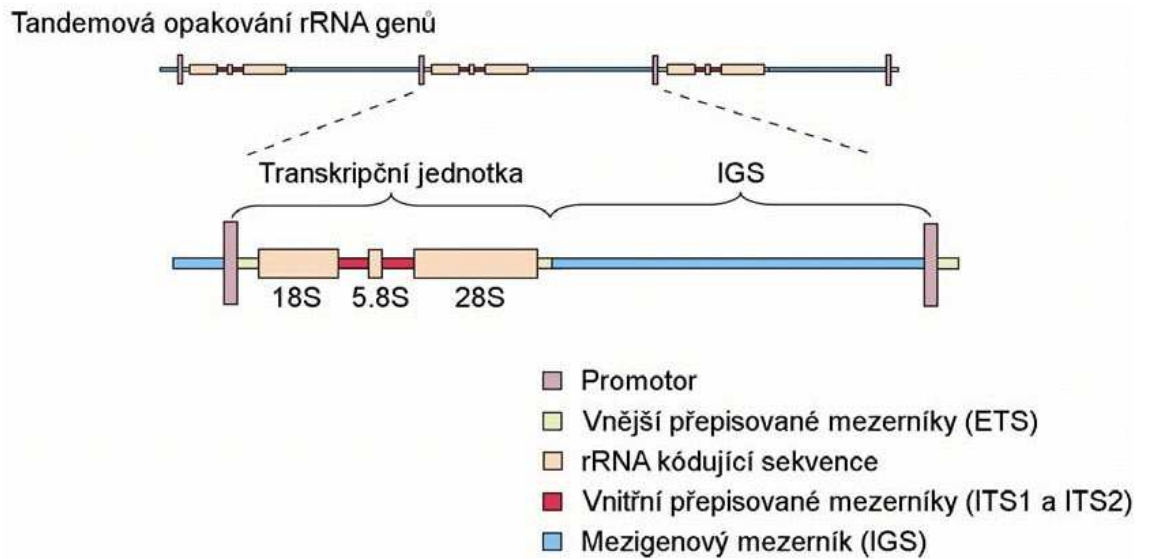
v aktivních buňkách tvořena rozsáhlou sítí. Tuto síť představují řetězce rRNA asociované ještě s templátem a dále specifické proteiny a snoRNA. Na okraji jadérka se nachází granulární část, která obsahuje pre-ribozomové částice přesunuté z místa syntézy a nacházející se v různém stádiu maturace. Bylo prokázáno, že zatímco v DFC se odehrávají primární posttranskripční úpravy, GC slouží k následné biogenezi ribozomů (Scheer *et al.* 1993, Wachtler & Stahl 1993). Stále je ovšem nejasná lokalizace transkripce rRNA v rámci jadérka. Jako možná místa jsou označována FC, DFC nebo jejich hraniční oblast (Huang 2002, Raška 2003, Derenziny *et al.* 2006). FC i DFC je možné vizualizovat pomocí AgNO₃, granulární část se touto metodou však nezvýrazní (Swarzacher & Wachtler 1993, Wachtler & Stahl 1993). Jadérko je většinou obklopeno tzv. perinukleolárním chromatinem, jehož množství se může lišit i u velmi příbuzných druhů (Hozak *et al.* 1993, Wachtler & Stahl 1993).

V poslední době se ukazuje, že jadérko má kromě biogeneze ribozomů i jiné funkce. Dochází zde například k modifikacím prekurzorů malých jaderných RNA (small nuclear RNA, snRNA) (Gerbi *et al.* 2003) a zřejmě také k úpravám pre-tRNA, neboť se zde vyskytuje prekurzorová tRNA a RNáza P (Pederson 1998, Gerbi *et al.* 2003). Jadérko je zřejmě také místem biogeneze signál rozpoznávající částice (signal recognition particle, SRP), která se podílí na kotranslačním transportu vybraných proteinů do endoplazmatického retikula. V jadérku byla nalezena i telomerázová RNA, což naznačuje roli jadérka v buněčném stárnutí (Pederson 1998, Olson *et al.* 2000, Thiry & Lafontaine 2005). Nukleolus taky slouží jako depo pro řadu proteinů účinkujících v regulaci buněčného cyklu. Jedna hypotéza tvrdí, že se tyto proteiny mohou shromažďovat jedině zde, protože všude jinde v buňce mají nějakou funkci (Bachant & Elledge 1999). Alternativní teorie přepokládá že tyto proteiny mají v nukleolu nějakou

funkci (Visintin & Amon 2000). Podle Smetany (2003) by se jádérko mohlo podílet také na programované buněčné smrti.

Oblast nukleolárního organizátoru je tvořena velkým množstvím kopií genů pro rRNA řazených za sebou ve formě tandemových repetit (Swarzacher & Wachtler 1993, Wachtler & Stahl 1993). Počet repetit může být u různých organismů velice odlišný (100 – 10 000 kopií). Jedna transkripční jednotka rRNA se skládá z genů pro 18S, 5,8S a 28S rRNA jdoucích za sebou v tomto pořadí, které je konzervované u všech eukaryot (Hillis & Dixon 1991) (Obr. 3). Součástí transkripční jednotky jsou ještě dva vnější přepisované mezerníky (ETS, external transcribed spacer) a dva vnitřní přepisované mezerníky (ITS; internal transcribed spacer), které od sebe oddělují kódující oblasti. Transkripční jednotky jsou od sebe odděleny nepřepisovanými intergenovými mezerníky (IGS, intergenic spacer), které obsahují iniciační místo transkripce a regulační oblasti (Moss & Stefanovsky 1994, Wang *et al.* 2003). Transkripční jednotka je přepisována RNA polymerázou I jako jedna molekula 45S a její součástí (až na výjimky – viz Adams *et al.* 1992) není gen pro 5S rRNA, který se v klastrech nachází v jiné části genomu, obvykle na jiných chromozomech. 5S rRNA je přepisována RNA polymerázou III. Její transkripční jednotky neobsahují žádné mezerníky (Swarzacher & Wachtler 1993, Wachtler & Stahl 1993, Wang *et al.* 2003). 5S rRNA je nakonec dopravována do jádérka k místu syntézy ribozomu pomocí proteinu velké ribozomální podjednotky L5 (Pederson & Politz 2000).

V rámci eukaryotních organismů se mohou sedimentační koeficienty jednotlivých genů rRNA od sebe mírně lišit, přesto se vyznačují značnou homologií (Sumner 2003). Naproti tomu se může u různých organismů značně lišit délka jednotlivých repetit (Wang 2003).



Obr. 3: Schéma rDNA transkripční jednotky a její tandemové uspořádání u vyšších eukaryot. Převzato z Raška 2003 a upraveno.

To je způsobeno variabilitou v ETS a ITS a především v IGS (Moss & Stefanovsky 1994, Sumner 2003). Jednotlivé úseky transkripční jednotky mají různou mutační rychlost, nejpomaleji mutuje gen pro 18S rRNA (patří mezi nejpomaleji mutující geny vůbec). Je proto hojně využíván ve fylogenetických analýzách (Hillis & Dixon 1991).

Nukleolární organizátory se mohou obecně nacházet na různých místech v rámci chromozomu. Často se vyskytují poblíž konců chromozomů, mohou být však i intersticiální. Tvorba konstriktce v těchto místech během mitózy může být způsobena zvláštní stavbou této oblasti nebo její nedostatečnou spiralizací. NOR jsou transkripčně aktivní i v profázi, proto kondenzují později než zbytek chromatinu. V prometafázi se jadérko rozpadá stejně jako jaderná membrána. Současně ustává transkripce rRNA v důsledku fosforylace transkripčního faktoru SL1 (Sheer & Hock, 1991; Medina *et al.*, 2001). Jadérko se znovu formuje až v telofázi, k jeho opětovnému vzniku je zapotřebí

transkripce rRNA v oblasti nukleolárního organizátoru (Dundr *et al.* 2000; Medina *et al.* 2000).

Nukleolární organizátory se dají zviditelnit pomocí stříbření dusičnanem stříbrným (AgNO₃) (Howel & Black 1980, Sumner 1990), specifičtější je použití metody FISH. Metoda stříbření totiž odhalí jen ty nukleolární organizátory, které byly aktivní v předchozí interfázi (Miller *et al.* 1976). Nedochozí při ní k vizualizaci vlastní rDNA, ale zvýrazní se specifické proteiny asociované s oblastmi rDNA, například transkripční faktory (UBF, SL1) a jedna či více podjednotek RNA polymerázy I. Tyto proteiny totiž zůstávají asociovány s NOR i během mitózy (Sumner 2003).

U pavoukoviců nebyla zatím distribuce konstitutivního heterochromatinu téměř vůbec studována. U pavouků byla určitá data získána jen v rámci některých skupin. C - pruhování odhalilo u většiny druhů konstitutivní heterochromatin v oblasti centromery (Rodríguez-Gil *et al.* 2007), méně se vyskytují bloky heterochromatinu na telomerách (Rowell 1985, Datta & Chatterjee 1988, Rowell 1991b, Araujo *et al.* 2005a). Interkalární heterochromatin je vzácný (Araujo *et al.* 2008). Konstitutivní heterochromatin byl studován i u některých sekáčů (Tsurusaki 2007), štírů (Shanahan 1989b, Schneider *et al.* 2009b) a štírenek (Král *et al.* 2008), kde má podobnou distribuci.

Distribuce NOR byla studována zatím jen u některých pavouků, štírů a štírenek. U pavouků se jednalo celkem o 20 druhů araneomorfních pavouků. Poloha NOR byla obvykle terminální s výjimkou některých bazálních araneomorfů (Král *et al.* 2006, Oliveira *et al.* 2007, Araújo *et al.* 2008). Karyotypy většiny analyzovaných entelegynních pavouků obsahovaly dva páry NOR, u některých druhů byly nalezeny dokonce tandemové duplikace NOR (Dolejš *et al.* přijato). U některých bazálních araneomorf se NOR nacházely i na pohlavních chromozomech (Král *et al.* 2006; Oliveira *et al.* 2007). U obou

prostudovaných štírenek byl nalezen pouze jediný pár NOR (Král *et al.* 2008). Jeden pár NOR byl nalezen i u štírů (Schneider & Cella 2010).

2.2.3 Průběh meiózy

V rámci třídy pavoukoců má většina druhů standardní průběh meiózy. U některých skupin se však v profázi I vyskytují určité odchylky. Mezi ně patří achiazmatická meióza a difúzní stádium. Achiazmatická meióza se u gonochoristů vyskytuje pouze u heterogametického pohlaví (Christensen 1961). U této modifikace nedochází ke tvorbě chiasmat, a tedy ani ke crossing overu. V celé profázi a metafázi I je zachováno paralelní párování homologů. Při tvorbě dělicího vřeténka se homology řadí tak, že páry sesterských chromatid jsou orientovány kolmo k ose dělicího vřeténka (Serrano 1981). V rámci pavoukoců byla achiazmatická meióza nalezena u štírů čeledi Buthidae (Shanahan 1986) a štírků Chthoniidae (Šťáhlavský & Král 2004).

Difúzní stádium je zvláštní etapa profáze I popsána již v roce 1925 Wilsonem. Dnes je již vnímána jako samostatná fáze, vyskytuje se většinou mezi pachytene a diplotene (MacGregor, 1993). Tato odchylka od standardního průběhu meiózy byla nalezena u některých rostlin i živočichů (Klásterská, 1977; Šťáhlavský *et al.* 2006; Sember, 2007). V rámci pavoukoců byla popsána jen u některých akariformních roztočů, sekáčů, štírků, pavouků a štírenek (Šťáhlavský *et al.*, 2006; Král *et al.* 2006, 2008). U některých pavouků s holocentrickými chromozomy tato etapa nahrazuje i diplotene, někdy dokonce i diakinezi (Benavente & Wettstein 1980, Rodríguez Gil *et al.* 2002, Král *et al.* 2006).

Difúzní stádium je charakterizováno značným zvětšením jader a despiralizací bivalentů až téměř na úroveň interfázního jádra. (Moses 1968, Wettstein & Sotelo 1971, Westergard & Wettstein 1972, Gillies 1975). Tyto charakteristiky naznačují, že v tomto

stádiu dochází k vysoké metabolické aktivitě (Klásterská 1977). Vzhledem k tomu, že difúzní stádium bylo nalezeno častěji u samic než u samců, dochází zde pravděpodobně k syntéze živin pro vyvíjející se vajíčko. Vývoj spermatocytů v tomto směru není tolik náročný (Benavente & Wettstein 1980). Některé studie naznačují, že by difúzní stádium mohlo být ekvivalentem G₂ fáze (Stack & Anderson 2001). Dekondenzace v difúzním stádiu se ovšem nemusí týkat všech bivalentů. Pokud jsou přítomny pohlavní chromozomy, tvoří v difúzním stádiu naopak kompaktní, pozitivně heteropyknotické tělísko ležící u pavouků často na periferii jádra (Král *et al.* 2006).

2.2.4 Pohlavní chromozomy

Geny determinující pohlaví jsou u řady živočichů a malého procenta rostlin umístěny na pohlavních chromozomech (Henking 1981, McClung 1902, Wilson 1905). Tyto chromozomy vznikly většinou diferenciací některého autozomového páru (Müller 1964, Ohno 1967), a to mnohokrát nezávisle na sobě. Mechanismus jejich vzniku zahrnuje supresi crossing-overu mezi oběma homologickými chromozomy v důsledku chromozomových aberací (Charlesworth & Charlesworth 1978, Charlesworth 1996, Brown *et al.* 1998, Clark & Wall 1996), která je následována sekvenční a strukturní diferenciací alozomu v důsledku několika různých procesů (Müllerova rohatka, genetický hitch-hiking, expanze heterochromatinu) (Clark & Wall 1996). V závislosti na tom, v jaké fázi evoluce pohlavních chromozomů daný organizmus zachytíme, můžeme v jeho karyotypu pozorovat buď homomorfní pohlavní chromozomy, které ještě nejsou morfologicky diferencované nebo již heteromorfní pohlavní chromozomy, které se dají odlišit ve světelném mikroskopu na základě morfologie. V raném stádiu evoluce se dají pohlavní chromozomy detekovat jen na molekulární úrovni.

Pavoukovci jsou podobně jako hmyz z hlediska způsobů determinace pohlaví velmi rozmanitá skupina. U některých skupin nebyly pohlavní chromozomy nalzeny vůbec (štíři, štírenky) (Schneider *et al.* 2009a, Král *et al.* 2008), jiné skupiny jsou zase naopak charakteristické svými složitými systémy pohlavních chromozomů (např. pavouci) (Král 1994). Řády roztočů se zase často vyznačují partenogenezí (Oliver 1977).

U pavouků je zřejmě původním systémem chromozomového určení pohlaví systém X_1X_20 , kde 0 znamená absenci gonozomu Y u samců (Hackman 1948). Tento systém se nachází již u nejprimitivnějších pavouků (Suzuki 1954) a je zároveň u pavouků nejčastější (77% studovaných druhů) (Araújo *et al.* 2005). V živočišné říši je vzácný, vyskytuje se druhotně u některých lasturnatek, hlístic a některých skupin hmyzu. Sekundárně vznikají u pavouků systémy s vyšším počtem chromozomů X, a to pravděpodobně nondisjunkcemi (Brum – Zorilla & Postiglioni 1981, Datta & Chatterjee 1988). Fúzí chromozomů X_1 a X_2 vzniká u pavouků systém X0. U některých pavouků byly objeveny i neopohlavní systémy, které vznikají přestavbami mezi autozomy a stávajícími pohlavními chromozomy, po nichž dojde k začlenění autozomů do systému pohlavních chromozomů. V těchto systémech se objevuje u pavouků jinak vzácný pohlavní chromozom Y (Maddison 1982, Rowell 1985). Příkladem může být systém $X_1X_2X_3X_4X_5Y_1Y_2Y_3Y_4$, který byl nalezen u některých ras maloočky *Delena cancerides* (Sparassidae) (Rowell 1985).

U štírků se obvykle vyskytují systémy ♂XY/♀XX a ♂X0/♀XX, případně ojediněle nepohlavní systémy (Šťáhlavský *et al.* 2006a). U většiny sekáčů se vyskytuje chromozomové určení pohlaví ♂XY/♀XX (Tsurusaki, 1982a, 1985a,b; Tsurusaki & Holmberg 1986, Tsurusaki & Cokendolpher 1990). Zajímavý a mezi pavoukovci ojedinělý je výskyt systému ZZ/ZW u dvou druhů sekáčů čeledi Phalangiidae, konkrétně u *Mitopus morio* (Tsurusaki & Cokendolpher 1990) a *Odiellus aspersus* (Tsurusaki 2007).

V rámci parazitiformních roztočů se pohlavní chromozomy vyskytují u podřádu Ixodida, opět se jedná o systémy ♂XY/♀XX (Kahn 1964) nebo ♂X0/♀XX (Oliver 1977). U některých australských zástupců rodu *Amblyomma* byl nalezen neopohlavní systém ♂X₁X₂Y /♀X₁X₁X₂X₂. U podřádu Gamasida je velmi častá haplodiploidie a thelytokie (Oliver 1977).

U akariformních roztočů byly pohlavní chromozomy nalezeny jen u čeledi Acarididae, a to systémy ♂XY/♀XX (Norton *et al.* 1993) a ♂X0/♀XX (Oliver 1977). Častý je výskyt haplodiploidie a thelytokie (Oliver 1967, 1971).

2.3 Cytogenetika amblypygidních a uropygidních bičovců

O cytogenetice řádů Amblypygi a Uropygi není dosud v podstatě nic známo. Jediné publikované práce se týkají uropygidních bičovců. Údaje týkající se druhů *Thelyphonus sepiaris* (Millot & Tuzet 1934) a *Typopeltis crucifer* (Warren 1939) jsou značně nekompletní. Karyotyp prvního druhu byl později revidován a řádně popsán Kasturim & Parthasarathym (1957). Tito autoři našli u samců karyotyp tvořený 44 chromozomy včetně pohlavních chromozomů X a Y.

Ve své bakalářské práci jsem analyzoval karyotypy dvou druhů amblypygidních bičovců. Karyotyp samce *Damon medius* (Phrynichidae) byl tvořen 66 autozomy a karyotyp samce *Charinus neocaledonicus* (Charinidae) 74 autozomy. Morfologicky diferencované pohlavní chromozomy nebyly nalezeny (Sember, 2007). U druhu *Damon medius* byla studována ještě sekvence telomerických repetitiv a jejich distribuce v karyotypu, a to pomocí telomerické fluorescenční *in situ* hybridizace. Tato analýza odhalila (TTAGG)_n motiv, který je považován za ancestrální u členovců (Vítková *et al.*, 2005).

3. Materiál a metodika

3.1. Materiál

Ve své práci se zabývám studiem karyotypu 18 druhů amblypygidů a 4 druhy uropygidů. Kromě amblypygidů čeledi Paracharontidae jsou zastoupeny všechny čeledi těchto dvou řádů. U řádu Amblypygi byla karyotypována většina rodů. Exempláře byly získány buď darem od chovatelů, nebo specialistů zabývajících se danými skupinami. Jedince druhů *Acantophrynus coronatus*, *Paraphrynus azteca* a *P. mexicanus* jsme získali přímým odchytem na expedici v Mexiku v červnu 2009. Kompletní seznam studovaných druhů včetně lokalit a použitých cytogenetických metod shrnuje Tabulka 2.

Bičovci byli chováni v dostatečně velkých plastových krabičkách s vhodným substrátem. Substrát byl tvořen směsí rašeliny a písku. Do terária bylo přidáno také suché listí a několik kusů kůry jako úkryt. U amblypygidů byly kusy kůry umístěny vertikálně, jinak by se tato zvířata nemohla úspěšně svlékat. Substrát bylo nutné pravidelně zvlhčovat, jedná se o vlhkomilné organismy. Krmivem byli obvykle usmrcení cvrčci (druhy *Achaeta domestica*, *Gryllus assimilis*, *G. bimaculatus*), zavíječi *Ephestia kuehniella* nebo kousky moučných červů (larvy potemníků rodu *Tenebrio*). Nejmenší nymfy byly krmeny bezkřídlými formami octomilky *Drosophila melanogaster* či větším, avšak pomalu se pohybujícím druhem, *D. hydei*. Bičovci byli chováni v termostatu nastaveném na dvě periody střídajícími se po 12 hodinách. Denní režim byl charakterizován teplotou 27° C a sporým osvětlením (červené LED diody), noční teplotou 24 °C.

Amblypygi				
Čeďed'	Druh	Lokalita sběru (sběratel)	Počed jedinců	Použitě metody
Charinidae	<i>Charinus australianus</i>	(P. Weygoldt)	♂ 1	P
	<i>Charinus neocaledonicus*</i>	Hora Mount Coghis, blízko Noumea, Nová Kaledonie (P. Weygoldt)	♂ 5; ♀ 3	Ag, F
	<i>Sarax cf. brachydactylus</i>	ostrov Cebu, Filipíny (S. Huber)	♂ 1	K
Charontidae	<i>Charon grayi</i>	ostrov Negros, Filipíny (M. Seiter)	♂ 2; ♀ 2	K, Ag, CGH
Phrynidae	<i>Acantophrynus coronatus</i>	Anenecuilco, stát Morelos, Mexiko (Gilberto Varo de la Rosa, J. Král)	♂ 1	K, C
	<i>Heterophrynus cheiracanthus</i>	Altagracia de Orituco, Venezuela (V. Šejna)	♂ 1	P
	<i>Paraphrynus aztecus</i>	stanice Univerzity V Mexico City, pohoří Los Tuxtlas u města Catemaco, stát Veracruz, Mexiko (A. Sember, J. Král, Arturo García Gómez)	♂ 3	K, C, Ag, FISH
	<i>Paraphrynus mexicanus</i>	jeskyně Juxtlahuaca u vsi Colotlipa, okolí města Chilpancingo, stát Guerrero, Mexiko (A. Sember, J. Král, Gilberto Varo de la Rosa, Arturo García Gómez, Fernando Villagomez)	♂ 2; ♀ 4	K, GISH, CGH
	<i>Phrynus whitei</i>	Cuajiniquil, severně od města Liberia (V. Šejna)	♂ 2; ♀ 1	K, Ag
Phrynichidae	<i>Damon diadema</i>	Tanzánie (M. Seiter)	♂ 2	P
	<i>Damon medius*</i>	Ziguinchor, Senegal (S. Huber)	♂ 5; ♀ 4	K
		Togo (M. Seiter)	♂ 1	K
	<i>Euphrynichus amanica</i>	z chovu (Tanzánie)	♂ 1	P
	<i>Euphrynichus bacilifer</i>	z chovu (Afrika) (M. Seiter)	♂ 1	K
	<i>Phrynichus ceylonicus</i>	Cejlon (V. Šejna)	♂ 3; ♀ 1	K, C, Ag
	<i>Phrynichus dhofarensis</i>	z chovu (Omán) (P. Weygoldt)	♂ 2	K, C, Ag
<i>Phrynichus orientalis</i>	Thajsko (M. Seiter)	♂ 4	P	
Uropygi				
Thelyphonidae	<i>Ginosigma schimkewitschi</i>	poblíž města Buon Ma Thuot, Vietnam, blízko hranice s Kambodžou (P. Nguyen)	♂ 1	K, C, Ag
	<i>Hypoctonus cf. gastrostictus</i>	z chovu (Malajsie) (O. Řehák)	♂ 2	K
	<i>Typopeltis crucifer</i>	Tchaj-wan (S. Huber)	♀ 1	P
	<i>Typopeltis guangxiensis</i>	provincie Guangxi, Čína (P. Grabowitz)	♂ 2; ♀ 1	K, C, Ag, CGH

Tabulka 2. Seznam studovaných druhů, lokalit a použitých metod.

P – stanovení počtu chromozomů, studium průběhu meiózy, K – sestavení karyotypu, studium průběhu meiotického dělení, C – vizualizace konstitutivního heterochromatinu metodou C-pruhování, Ag – detekce nukleolárních organizátorů pomocí AgNO₃, F – fluorescenční pruhování, FISH – vizualizace nukleolárních organizátorů pomocí rDNA FISH, CGH – detekce pohlavních chromozomů pomocí komparativní genomové hybridizace. * U těchto druhů resp. populací jsem navázal na poznatky, které jsem uvedl ve své bakalářské práci.

Pro přípravu preparátů byly u obou pohlaví nejvhodnější gonády jedinců v subadultním nebo adultním stádiu. Preparáty z pohlavních žláz samců obvykle poskytly kromě spermatogoniálních mitóz také různé fáze meiotického dělení. Preparáty z vaječníků obsahovaly pouze menší počet mitóz a časná stadia profáze I. Pozdější fáze meiózy ve vyvíjejících se oocytech byly buď zakryty žloutkem nebo k nim dochází až po oplození. Protože u bičovců nejsou na mitotických chromozomech většinou jasně patrné primární konstriktce, byly pro sestavování karyotypů vhodné pouze chromozomové figury ze samců. V některých případech byly použity pro výrobu chromozomových preparátů také jiné tkáně, například střevo nebo tzv. přídatné žlázy samců, které jsou součástí pohlavní soustavy a obsahují často mitotické buňky. Preparáty z těchto tkání se někdy vyznačovaly tak vysokým mitotickým indexem, že mohly být použity i na metody FISH.

Odlišení samčích jedinců nebylo jednoduché, a to vzhledem k nepříliš výraznému pohlavnímu dimorfismu. Znaky, podle kterých se dá pohlaví určit, lze často použít jen u subadultních nebo adultních stádií některých druhů a ani pak nemusí být determinace samčího pohlaví jednoznačná. U některých druhů amblypygidů (například *Phrynichus ceylonicus*) je možné odlišit pohlaví podle délky pedipalp. Dospělí samci mají pedipalpy obvykle další než samice. U nymf se tento rozdíl ještě nevyskytuje. Někdy je možné odlišit pohlaví na základě rozdílné intenzity pigmentace hlavohruď u adultních jedinců (*Charon grayi*). U adultních samic je někdy možné pozorovat na spodní straně zadečku

prosvítající vajíčka. U amblypygidů je další možností jak odlišit obě pohlaví tvar zadečku. Samičky mají zadeček spíše zaoblený, zatímco samci spíše kosodélníkovitý. Ani to ovšem není jednoznačné, jelikož se tvar zadečku dosti mění v závislosti na příjmu potravy. U uropygidů je determinace ještě obtížnější, určování na základě robustnosti pedipalp je málo spolehlivé. Pohlaví určí tedy spolehlivě až samotná pitva, a to na základě přítomnosti gonád určitého typu.

3.2 Metody

3.2.1 Příprava chromozomových preparátů

Pro zhotovení chromozomových preparátů byla použita modifikace roztěrové metody (Traut, 1976). Bičovci byli ihned po usmrcení přeneseni do fyziologického roztoku pro motýly rodu *Ephestia* (Lokwood 1961). V tomto roztoku byly pod binokulární lupou vypreparovány gonády (popř. přídatné žlázy nebo střevo). Tkáň byla hypotonizována v 0.075 M roztoku KCl (Lachema) po dobu 17-20 minut. Následně proběhla fixace v čerstvě připravené směsi jednosytného alkoholu (obvykle methanol p.a., zředka ethanol p.a.) (Merck nebo, Sigma - Aldrich) a kyseliny octové p.a. (Merck) v poměru 3:1. Fixace byla většinou prováděna třikrát za sebou po dobu 7, 10 a 20 minut. Menší gonády byly fixovány pouze dvakrát (10 a 20 minut). Po fixaci byl na vyčištěné podložní sklíčko přenesen malý kousek gonády a k němu byly přidány plastovou pastérkou 2-3 kapky 60% kyseliny octové. Pod stereolupou byla z tkáně pomocí páru wolframových jehel co nejrychleji vyrobena suspenze buněk. Preparát byl poté ihned přenesen na histologickou ploténku o teplotě 40°C. Kapka suspenze byla roztírána pomocí wolframové jehly rovnoměrně po celém povrchu sklíčka tak dlouho, dokud nedošlo téměř k jejímu odpaření. Zbytek kapky s nečistotami byl sklepnut na filtrační papír. Preparáty na C-pruhování

a detekci NOR pomocí AgNO_3 byly roztírány pouze za teploty 35°C aby se chromatin méně narušil. Tímto způsobem byl postupně zpracován celý nafixovaný materiál. Kvalita preparátů (stupeň rozptřeni chromozomových figur, hustota buněk) byla kontrolována mikroskopem pomocí fázového kontrastu.

Preparáty byly barveny další den (nebo později) 5% roztokem barviva Giemsa (Merck) v Sørensenově fosfátovém pufru (pH 6.8) po dobu 25 minut. Skla určená na C-pruhování a stříbření se nebarvila a byla uskladněna v ledničce. Preparáty vybrané pro metodu FISH byly odvodněny vzestupnou etanolovou řadou (70%, 80%, 96%) a uchovávány v hlubokomrazicím boxu (Sanyo) při -81°C .

V rané fázi mé diplomové práce byly figury fotografovány pod imerzním objektivem 100x na mikroskopu Jenaval na černobílý film Kodak Technical Pan. Filmy byly vyvolávány standardním postupem pomocí vývojky Kodak Professional HC – 110 (Kodak) a univerzálního rychloustalovače Fomafix (Foma). Vyvolané filmy byly poté převedeny do digitální podoby pomocí skeneru Nikon (Nikon Scan 4.0) a příslušného programu. Později byly preparáty pozorovány mikroskopem Olympus BX 50 pomocí imerzního objektivu 100x. Vhodné figury byly snímány pomocí CCD kamery DP71 a programu CellD (Olympus).

Z vybraných figur byly sestaveny karyogramy v programu Corel Photo Paint X3. Pro tyto účely se obvykle používají mitotické metafáze. U bičovců nejsou však na těchto chromozomech většinou jasně patrné primární konstriktce. Proto byly pro sestavení karyogramů použity sesterské metafáze II, u nichž je morfologie chromozomů lépe patrná. V některých případech se podařilo získat vhodně rozptřené figury na počátku anafáze I, kde jsou přímo vidět rozcházející se homologické chromozomy a jejich zařazení do páru je tudíž jednoznačné. U některých druhů ale tyto figury nebyly na preparátech pozorovány,

popis jejich karyotypu je tedy omezen na pozorované údaje u figur vhodných pro stanovení diploidního počtu a odhadu morfologie chromozomů. U většiny druhů byly proměřeny chromozomy 2 – 5 reprezentativních figur. Délka jednotlivých ramen chromozomů byla měřena v programu ImageTool (UTHSCSA). Měření bylo prováděno od středu centromery po okraj chromozomu. Pro stanovení karyogramu byla určena relativní délka jednotlivých chromozomových párů a jejich centromerické indexy. Relativní chromozomová délka je definována jako procentuální podíl na celkové délce všech chromozomů v diploidní sadě. Na základě této hodnoty byly páry chromozomů sestupně seřazeny v karyotypu. Pro popis morfologie chromozomů byla použita Levanova klasifikace (Levan *et al.* 1964). V souladu s ní byl centromerický index stanoven jako poměr dlouhého a krátkého ramene chromozomu. Pro označení morfologie chromozomů byly použity následující zkratky:

M = metacentrický, SM = submetacentrický, ST = subtelocentrický, A = akrocentrický.

Počet rekombinací v genomu byl u daného druhu určován na základě počtu chiazmat v profázi I v etapách diplotene a diakineze. U daného druhu bylo analyzováno v ideálním případě alespoň 10 figur, u kterých byl stanoven celkový počet chiazmat na fuguru a sledovala se jejich poloha. Ze získaných hodnot byla poté stanovena frekvence chiazmat na bivalent. Poloha chiazmat byla určována vzhledem k poloze centromery (proximální = blízko centromery, interkalární, distální = daleko od centromery). V případě, že na chromozomech nebylo umístění centromery patrné, byla poloha chiazmat určena vzhledem k umístění na chromozomu (terminální = na konci chromozomu, subterminální, interkalární = uvnitř ramen). Hodnocení polohy chiazmat bylo čistě orientační, nebylo podloženo nameřenými hodnotami a statistickým zpracováním.

3.2.1 Vizualizace konstitutivního heterochromatinu pomocí C - pruhování

Pro vizualizaci konstitutivního heterochromatinu jsem použil metodu C - pruhování (Sumner, 1972). V tomto případě bylo získáno nejvíce informací u mitotických metafází, u nichž byly C - pruhy nejlépe patrné.

Na neobarvené preparáty staré 4 - 5 dní se nejdříve předpůsobilo teplotou 60°C (v sušárně po dobu 1 hod). Po ochladnutí na pokojovou teplotu byly dále ponořeny na 45 min. do 0,2M roztoku HCl (Penta) a následně opláchnuty v destilované vodě. Potom se skla nechala sušit na 3 hodiny při pokojové teplotě. V následném denaturačním kroku se skla ponořila na 5 min. do nasyceného roztoku Ba(OH)₂ (Lachema) v lázni vyhřáté na 40°C. Teplota byla snížena oproti standardnímu protokolu (Sumner 1972) o 10°C, protože při vyšších teplotách nedocházelo k indukci C - pruhů. Po inkubaci byly preparáty ihned opláchnuty ve dvou nádobách s destilovanou vodou o různých teplotách - nejdříve o teplotě 30-35°C a následně o pokojové teplotě. Tento krok zamezil vysrážení uhličitanu barnatého na sklech. Následně se preparáty opět 3 hodiny sušily při pokojové teplotě. Poslední byl renaturační krok, při kterém byla skla ponořena do roztoku 2xSSC (pH 7,0, 60° C) na 75 min. Po uplynutí této doby se preparáty opláchly v destilované vodě a nechaly usušit při pokojové teplotě přes noc.

Preparáty byly další den obarveny stejným postupem jako obyčejná skla. Vzhledem k denuraci chromatinu se ale prodloužila doba barvení z 25 min. na 75. Vyhodnocení preparátů následně probíhalo stejným způsobem jako u standardních preparátů. Pokud byly množství a poloha C-pruhů dostatečným vodítkem pro rozeznání jednotlivých párů chromozomů, byl sestaven C – pruhovaný karyogram.

3.2.3 Analýza obsahu párů bází pomocí fluorescenčního pruhování

Zajímavý tandemový blok konstitutivního heterochromatinu u amblypygida druhu *Charinus neocaledonicus* ještě v průběhu vypracovávání své bakalářské práce (Sember, 2007) byl dále analyzován metodou fluorescenčního pruhování, která umožňuje podrobněji charakterizovat vlastnosti heterochromatinu. Při této metodě se využívá preferenční vazby některých fluorochromů k AT nebo GC bohatým oblastem heterochromatinu. V této práci byl použit GC - specifický fluorochrom chromomycin A₃, a AT - specifický fluorochrom DAPI.

Preparáty byly připraveny členy naší laboratoře na základě standardního protokolu (Sola *et al.*, 1992) s použitím určitých modifikací. Skla připravená standardním způsobem byla nejdříve odvodněna vzestupnou ethanolovou řadou (70%, 90%, 100%) a poté inkubována 10 min. při laboratorní teplotě v McIlvainově pufru (pH 7) s 10 mM MgCl₂. Následně se preparáty umístily do vlhké komůrky a za šera se na každý z nich nakapalo 150 µl roztoku chromomycinu A₃ (Serva) (0,5 mg/ml v McIlvainově pufru).. Preparáty se zakryly po celé své délce krycím sklem a inkubovány se 15 min. ve tmě. Následovalo odstranění krycích skel, krátký oplach preparátů v McIlvainově pufru a jejich ponoření do roztoku methylenové zeleně (Serva) v McIlvainově pufru (0,35mg/ml). Po inkubaci trvající 15 minut byly preparáty znovu opláchnuty v McIlvainově pufru a na každý z nich bylo přeneseno 1 ml roztoku DAPI (5 µl DAPI / 1 ml McIlvain). Následovala inkubace pod krycím sklem po dobu 20 min. Poté se každý preparát opláchl v McIlvainově pufru, osušil filtračním papírem a bylo na něj nanášeno 40 µl montovacího média (směs glycerolu s 2,5 % propylgalátu). Každý preparát byl nakonec překryt krycím sklem, jehož okraje byly zarámovány lakem na nehty jako prevence proti vysychání a míšení montovacího média s imerzním olejem. Preparáty byly prohlíženy na mikroskopu Provis AX 70 Olympus

a vybrané figury byly foceny CDD kamerou (Olympus; DP30BW) nainstalovanými na tomto mikroskopu.

3.2.4 Vizualizace NOR pomocí dusičnanu stříbrného

Tato klasická cytogenetická metoda byla aplikována podle protokolu Howela a Blacka (1980) na neobarvené i obarvené preparáty za účelem detekce polohy nukleolárních organizátorů. V některých případech byly touto metodou vizualizovány i kinetochory podobně jako např. u kobylek (Suja, *et al.*, 1990).

Na každé sklíčko byly nakapány skleněnou tyčinkou 3 kapky 2% želatiny (okyselené 1 ml kyseliny mravenčí) a 7 kapek 50% AgNO₃ tak, aby se kapky mezi sebou nespojily. Následně se kapky rychle promíchaly a rozetřely po celé ploše skla pomocí jiné skleněné tyčinky. Preparát byl zakryt velkým krycím sklem (25mm x 40mm) a přenesen na histologickou ploténku vyhřátou na teplotu 50°C. Během inkubace na ploténce byly sledovány barevné změny roztoku pod krycím sklem. Optimálně probarvený preparát by měl mít světle hnědou barvu. Pro bičovce byly optimální časy inkubace 5-7 minut, přičemž 7 minut byla maximální hranice, kdy preparát ještě nebyl přebarven. Po inkubaci byl preparát rychle opláchnut proudem studené vody, čímž došlo ke spláchnutí krycího skla i reagujících složek a tedy k ukončení reakce. Po uchnutí se preparáty vyhodnocovaly opět standardním způsobem.

3.2.5 Vizualizace NOR pomocí rDNA FISH

U amblypygidního bičovce druhu *Paraphrynus azteca* jsem ověřoval polohu NOR pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Princip této metody obecně spočívá v hybridizaci značené sondy a cílové DNA na základě komplementarity bází. V oblasti

párování pak můžeme díky značení sondy pozorovat pod fluorescenčním mikroskopem na chromozomech barevný signál.

Pro zesílení signálu byla použita nepřímo značená biotinylovaná sonda. Ta byla detekována protilátkou (streptavidinem) s navázaným fluorochromem Cy3. Pro získání ještě výraznějšího signálu byl dále použit antistreptavidin s navázaným fluorochromem (na jednu molekulu streptavidinu se váže více molekul antistreptavidinu).

Experimenty jsem prováděl v laboratoři Prof. F. Marece na oddělení genetiky Entomologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích pod vedením PhD. Magdy Vítkové podle standardního protokolu používaného na tomto pracovišti pro detekci NOR u motýlů.

Sonda pro detekci NOR u *P. aztecus* byla připravena ze samce příbuzného druhu (*P. mexicanus*), aby bylo sníženo pozadí. Celogenomová DNA druhu *P. mexicanus* byla izolována (i pro potřeby metody CGH, viz dále) chloroform/fenol/izoamylalkoholovou extrakcí (Graham, 1978). Z izolované DNA byl metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) amplifikován úsek 18S rDNA. K tomuto účelu byly použity primery pro 18S rDNA původně designované pro hmyz: 18S-Ins-forward primer (5'-CGATACCGCGAATGGCTCAATA-3') a 18S-Ins-reverse primer (5'-CAAAGGGCAGGGACGTAATCAAC-3') (Generi Biotech). Na jednu PCR reakci (celkový objem 25 μ l) byly použity následující reakční komponenty: 0,40 μ l Taq polymerázy (5 U/ μ l TaKaRa Ex Taq HS DNA polymeráza) (Takara), 10 μ l pufru pro Taq polymerázu (10 \times Ex Taq pufr (10 μ l) (Takara), 2 μ l dNTP (o koncentraci 2,5 mM) (Takara), 100 ng templátové DNA a 1,25 μ l každého z primerů o koncentraci 10 μ M. Směs byla doplněna do konečného objemu miliQ H₂O. PCR reakce byla provedena ve 30 cyklech, přičemž každý cyklus zahrnoval denuraci při teplotě 94°C (1 minutu), nasedání

primerů při 51°C (1 min.) a prodlužování řetězce při 72°C (1,5 min.). Počáteční denaturace byla prodloužená na 3 min. a čas prodlužování řetězce v posledním cyklu byl navýšen na 10 min.

Směs vzniklá PCR reakcí byla elektroforeticky separována v 1% agarózovém gelu. Proužek odpovídající amplifikovanému PCR produktu byl vyříznut a DNA byla extrahována kitem QIAquick Gel Extraction (Qiagen GmbH). Část takto získané 18S rDNA byla použita jako templát pro další PCR reakci, jejíž produkt byl nakonec označen biotin-14-dATP metodou „nick“ translace pomocí kitu Bionick Labeling System (Invitrogen, LifeTechnologies Inc.).

Ke značené sondě (45 ng na preparát) byla přidána DNA z lososích spermií (Sigma-Aldrich) (c = 10 µg/l; 2,5 µl DNA na preparát). Smyslem tohoto kroku je vyvázání drobných fragmentů nespecifických sekvencí. Sonda byla následně precipitována přidáním Na-acetátu a podchlazeného ethanolu (100%) a centrifugována (20 min., 13 tis. otáček/min). Po centrifugaci byl odstraněn supernatant, přidán 70% ethanol (200 µl) a centrifugace se opakovala (15 min., 13 tis. otáček/min). Potom byl důkladně odsán veškerý supernatant a sonda byla při 37°C zcela vysušena v termomixu. Po vysušení byla sonda rozpuštěna ve 5 µl 100 % formamidu (Fluka) při teplotě 37°C po dobu 30 min. Po následném přidání 20 % dextransulfátu (5 µl na každý preparát) byla sonda denaturována ve vodní lázni (95°C, 5 min.) a pak okamžitě přemístěna na led, aby nedošlo k renaturaci jednovláknových řetězců DNA.

Pro metodu FISH byly použity neobarvené preparáty zhotovené standardním postupem, odvodněné vzestupnou ethanolovou řadou (70%, 80%, 96%, Merck) a uchovávané v hlubokomrazicím boxu při teplotě -81°C. Před experimentem se preparáty nejprve odvodnily uvedenou vzestupnou ethanolovou řadou a poté se inkubovaly 4 hod. při

65°C. Bez této inkubace by při následném působení proteinázy K (5 min., 37°C) (Sigma-Aldrich) a promývání v kyvetách s 1x PBS, 2x 5 min. (37°C) došlo k uvolnění materiálu ze skel. Expozice skel vyšší teplotě také redukuje zbytky cytoplazmy na chromozomových figurách (tzv. „desky“), jež se intenzivně probarvují DAPI v případě, že bylo při přípravě preparátu použito hodně materiálu. Inkubace s proteinázou K napomáhá rovněž odstranění cytoplazmy z preparátů. U bičovců byla prováděna ve všech případech.

Pro odstranění RNA, která by mohla interagovat se sondou bylo přidáno na každý preparát 100 µl roztoku RNázy A (2 ul RNázy A o koncentraci 10 mg/ml + 10 ul 20x SSC + 88 ul MiliQ vody) (Biotech). Preparát s touto směsí byl zakryt krycím sklem, inkubován 1 hod. při 37°C, poté promýván dvakrát (po 5 min.) v kyvetách s 1x PBS ve vodní lázni (37°C) a nakonec inkubován v kyvetě s Denhardtovým činidlem za třepání ve vodní lázni (30 min., 37°C) kvůli potlačení nespecifické hybridizace.

V dalším kroku se na každý preparát přeneslo 100 µl 70 % formamidu (Sigma – Aldrich). Preparáty byly překryty krycím sklem a denaturovány v termomixu (3 min; 68°C). Ihned po denuraci byla z preparátů odstraněna krycí skla. Preparáty byly ponořeny do podchlazeného 70% ethanolu a odvodněny vzestupnou ethanolovou řadou. Po oschnutí byl každý preparát zakápnut 10 µl denaturované hybridizační směsí se sondou a zakryt krycím sklem, jehož okraje se zalepily Rubber cementem (Marabu), aby hybridizační směs nevyschla. Skla byla umístěna do krabičky s filtračním papírem napuštěným 2xSSC a inkubována až do dalšího dne ve tmě v termostatu při 37°C (délka hybridizace se pohybuje v rozmezí 16-20 hod.).

Následující den byl odstraněn Rubber cement s krycím sklem a proběhla série promývání preparátů v kyvetách s různými roztoky umístěnými v třepacích vodních lázních. Důvodem těchto kroků je zamezit, aby nezhybridizovaná sonda vytvářela na

preparátu pozadí interferující se signály. Nejprve byly preparáty promyty ve třech kyvetách obsahujících roztok 50 % formamidu v 2x SSC (v každé 5 min., 46°C), následně pětkrát v kyvetách s roztokem 2x SSC (v každé 2 min., 46°C) a nakonec třikrát v 0,1x SSC° (v každé 5 min., 62°C). Po důkladném oplachu byla skla ponořena do roztoku 4x SSC/0,1 % Tween 20 (Gerbu) (ve tmě, 5 min, pokojová teplota). Poslední krok je možné bez jakýchkoliv negativních důsledků prodloužit až na 40 min.

Po promývání následovala série kroků vedoucích k detekci sondy. Nejdříve byla zablokována reakce přidáním 500 µl 2,5 % BSA (Fluka) na každé sklo. BSA složí jako blokátor nespecifických vazebných míst pro protilátku, která se následně aplikuje. Preparáty překryté krycím sklíčkem byly inkubovány 20 min. ve tmě při pokojové teplotě. Potom se na každý preparát přidalo 100 µl Cy3 - streptavidinu (Jackson Immuno Research Laboratoies) a preparáty překryté krycím sklem se inkubovaly ve tmě po dobu 30 min. Preparáty byly nakonec proprány třikrát ve 4x SSC/0,1 % Tween 20 za třepání na vodní lázni (37°C, 3 min).

Další kroky vedly k zesílení signálu. Nejdříve byla reakce opět blokována 500 µl 2,5 % BSA (tma, pokojová teplota, 10 min.) a následně se na preparáty přidalo 50 µl antistreptavidinu (Vector). Poté se preparáty inkubovaly pod krycím sklem v termostatu (tma, 37°C, 20 min). Z preparátů se následně odstranila krycí skla a byly promyty stejným způsobem jako po aplikaci streptavidinu (ve 4x SSC/0,1 % Tween 20 za třepání na vodní lázni, 37°C, 3 min). Následovala další blokace reakce na sklech (inkubace ve tmě, pokojová teplota, 10 min.) a další zesílení signálu přidáním 100 µl Cy3 streptavidinu, (inkubace pod krycím sklem 20 min. při 37°C). Po skončení inkubace byla skla naposled třikrát promyta v 4x SSC/0,1 % Tween 20 a ponechána uschnout.

Nakonec byly chromozomy na sklech obarveny pomocí fluorescenčního barviva DAPI (Sigma-Aldrich). Proces barvení se skládal z několika po sobě jdoucích barvicích a promývacích kroků (všechny za pokojové teploty a na třepačce). Nejdříve byla skla promyta v 1% TritonX (Sigma-Aldrich)/2x PBS (5 min.). Následovalo barvení ve 40 ml roztoku obsahujícím 40 µl DAPI v 1% TritonX/1x PBS (5 min.), promytí v 1% PhotoFlo (Sigma-Aldrich)/1x PBS (3 min.) a nakonec promytí v roztoku PhotoFlo/miliQ H₂O (1 min.). Preparáty se nechaly částečně oschnout, potom se zakáply 20 µl Antifade (médiem zabraňující vyhasínání fluorescence) a zakryly krycím sklíčkem. Poté, co se Antifade rozprostřel pod celým krycím sklem, byla přebytečná tekutina vytlačena pomocí filtračního papíru. Okraje krycího sklíčka byly zarámovány barevným lakem na nehty, po jehož zaschnutí bylo možno preparáty pozorovat. Pro zlepšení fluorescence bylo ale vhodné uložit je alespoň na hodinu do ledničky.

Preparáty byly prohlíženy na fluorescenčním mikroskopu Zeiss Axioplan 2 vybaveném příslušnými sadami fluorescenčních filtrů. Vhodné figury byly fotografovány jako černobílé fotografie zvláště pro každou fluorescenční barvu chlazenou CCD kamerou F-View (Olympus) při využití softwaru AnalySIS. Snímky byly nakonec zpracovány v programu Adobe Photoshop CS2, kde byly jednotlivým fluorochromům přiřazeny barvy (modrá pro DAPI, červená pro Cy3) a dílčí obrazy pro jednotlivé flurochromy byly složeny do kompletního obrazu.

3.2.6 Detekce pohlavních chromozomů pomocí CGH

Komparativní genomová hybridizace (CGH) je varianta fluorescenční *in situ* hybridizace, při které hybridizují dva genomy k chromozomové DNA na preparátu, přičemž je možné detekovat rozdíly mezi nimi (Kallioniemi *et al.*, 1992). Původní užití

této metody spočívá v detekci amplifikovaných genů při kancerogenezi a nádorové cytogenetice (Weiss *et al.*, 2003) nebo nebalancovaných chromozomových aberací v klinické cytogenetice (Kirchhoff *et al.*, 2000). Stejná technika se dá použít i pro detekci morfologicky nediferencovaných pohlavních chromozomů (Traut *et al.*, 1999, 2001). V takovém případě se aplikují celogenomové sondy obou pohlaví na preparáty samce a/nebo samice. Sonda ze samce je obarvena jiným fluorochromem než sonda ze samice a chromozomy jsou obarveny DAPI. Takovým způsobem se dá odhalit nehomologický úsek alozomu u heterogametického pohlaví. V podstatě stejný protokol má i metoda GISH (genomic *in situ* hybridization) (Schwarzacher *et al.* 1989) s tím rozdílem, že je fluorescenčně značena jen sonda heterogametického pohlaví a neznačená DNA homogametického pohlaví se používá v nadbytku jako kompetitor který odejme ze značené sondy sekvence společné pro obě pohlaví. Sonda tak opět zvýrazní úsek specifický jen pro samce.

Detekci pohlavních chromozomů pomocí CGH jsem prováděl u amblypygidů *Paraphrynus mexicanus* (zástupce apulvilátních amblypygidů) a *Charon grayi* (zástupce pulvilátních amblypygidů) a u zástupce uropygidů, druhu *Typopeltis guangxiensis*. U druhu *P. mexicanus* byla nejprve provedena metoda GISH, aniž by došlo k vizualizaci úseku specifického pro heterogametické pohlaví. Později jsem přešel k metodě CGH, neboť má v podstatě stejný protokol a navíc může poskytovat více informací.

Experimenty jsem prováděl stejně jako FISH na oddělení genetiky Entomologického ústavu AV ČR v Českých Budějovicích v laboratoři Prof. F. Marece pod vedením Ph.D. M. Vítkové, Mgr. P. Nguyena a Mgr. M. Dalíkové, a to podle protokolu Ph.D. M. Vítkové, používaném na tomto pracovišti pro detekci pohlavních chromozomů u motýlů.

Celogenomová DNA obou pohlaví byla izolována chloroform/fenol/izoamylalkoholovou extrakcí (Graham, 1978). Kontrola kvality izolované DNA byla provedena štěpením restriční endonukleázou EcoRI (Takara), fragmenty byly separovány elektroforézou v 1% agarózovém gelu. Pokud ke štěpení DNA nedocházelo, tak s největší pravděpodobností obsahovala navázané cytoplazmatické proteiny a musela se přečišťovat opakovaným procesem izolace. Kvalita rozpuštění izolované DNA v MiliQ vodě a její koncentrace se měřila na fluorometru Hoefer DyNA Quant 200 (Amersham Biosciences) podle protokolu výrobce. Jako kalibrační DNA byla použita calf thymus DNA standart (Sigma). Údaje o koncentraci a množství izolované DNA byly nezbytné pro správné naplánování experimentů CGH.

Nejprve byla označena samčí a samičí DNA pomocí „nick“ translace (ROCHE Nick Translation Kit). Nejdříve bylo třeba na základě zjištěné koncentrace DNA vypočítat, kolik μl izolátu DNA se musí aplikovat, abychom získali dostatečné množství značené sondy pro dvojici sklíček. Pro dvojici preparátů (jeden od každého pohlaví) bylo potřeba naznačit 1 μg DNA samce a 1 μg DNA samice. Značící směs byla namíchána pro každou DNA odděleně v eppendorfce. Spočítaný objem DNA byl doplněn na 6 μl MiliQ H_2O . Dále se přidalo 2 μl dNTP (10xdNTP mix obsahující značené dUTP), 1 μl pufru (10xbuffer Nick Translation Kit No.6) a 1 μl enzymatické směsi (DNA polymeráza I a DNáza I) (10x enzyme mix Nick Translation Kit No.7). Při míchání směsi nukleotidů 10xdNTP mix bylo použito 2,5 μl dATP, dCTP, dGTP (2,5 mM), snížené množství dTTP (0,9 μl , 2,5 mM) a 4 μl 1 mM značeného dUTP. Směs byla doplněna MiliQ vodou do konečného objemu 25 μl . dUTP bylo značeno Cy3 v případě samčí DNA a Spectrum Green v případě samičí DNA. Vzhledem k tomu, že počáteční pokusy odhalily slabou excitaci fluorescenčního barviva Spectrum Green, bylo pro každý experiment připravováno

dvojnásobné množství samičí sondy. Namíchané směsi se nechaly stát přes noc ve tmě při teplotě 16°C (DNA polymeráza I má sice optimum při 37°C, ale v 16°C odbouráme její 3'-5' exonukleázovou aktivitu, která je v tomto případě nežádoucí).

Další den se ke každé směsi přidal 1 µl EDTA pro zastavení aktivity všech enzymů působících na DNA. Pomocí elektroforézy v 1% agarózovém gelu bylo ověřeno, zda značení proběhlo úspěšně. Dále bylo třeba připravit kompetitorovou DNA z homogametického pohlaví, kterým je u amblypygidních a uropygidních bičovců pravděpodobně samičí pohlaví. Samičí kompetitor byl připraven sonikací samičí DNA doplněné MiliQ vodou na konečný objem 200 µl (sonikátor: Bandelin Sonopuls). Poté byla změřena koncentrace na fluorometru a vypočítán objem potřebný pro aplikaci 9 µg kompetiční DNA na preparát. Nadbytek kompetiční DNA homogametického pohlaví se do hybridizačního mixu dává proto, aby byla co nejefektivněji odejmuta DNA společná pro obě pohlaví a zvýraznily se úseky, které jsou specifické pro heterogametické pohlaví. Následně byla připravena hybridizační směs. Pro každé sklo obsahovala hybridizační směs 450 ng samčí sondy (5 µl), 900 ng samičí sondy (10 µl), 9 µg samičí kompetitorové DNA a 25 µg DNA z lososích spermii. Dále se přidal Na-acetát (1/10 objemu hybridizační směsi) a vychlazený 100% ethanol (2,5x objem hybridizační směsi).. Hybridizační směs byla uchovávána 30 min. v hlubokomrazicím boxu. Následovala centrifugace (15-20 min., 13000 otáček/min.), po odsátí supernatantu byl k peletu přidán vychlazený 70% ethanol. Po další centrifugaci (15-20 min., 13 000 otáček/min.) byl co nejdůkladněji odsát veškerý supernatant. Eppendorfka s hybridizační směsí se nechala chvíli stát s otevřeným víčkem až do úplného vypaření ethanolu (ale ne úplného vysušení DNA). Následně bylo přidáno 5µl 100% formamidu a směs se inkubovala 30 min. v termomixu (37°C). Poté bylo přidáno 5µl 20% dextran sulfátu a následovala denaturace sondy ve vodní lázni (95°C, 5

minut). Denaturovaná sonda byla okamžitě přenesena na led a připravena pro aplikaci na preparáty.

Neobarvené preparáty vybrané pro CGH byly před použitím zpracovány stejným způsobem jako na jiné aplikace FISH (viz předchozí oddíl). Po vyjmutí z hlubokomrazicího boxu a odvodnění ve vzestupné ethanolové řadě následovala inkubace při 60°C po dobu 4 hod. Poté byla na každý preparát aplikována RNáza A (2 µl RNázy A o koncentraci 10 mg/ml + 10 µl 20x SSC + 88 ul MiliQ vody). Preparáty byly inkubovány 1 hod. při 37°C. Následovala série promývání v kyvetách (37°C, třepání): dvakrát 5 min. v roztoku 2x SSC, jednou 5 min. v roztoku proteinázy K (2 µl proteinázy, 4ml 10x PBS, 36ml MiliQ) a dvakrát 5 min. v roztoku 1x PBS. Následné zpracování skel bylo totožné jako v předchozím oddílu při rDNA FISH. Nakonec byl každý preparát zakápnut denaturovanou hybridizační směsí a zakryt krycím sklem. Krycí sklo bylo zarámováno Rubber cementem. Hybridizace byla prováděna ve vaničce s filtračním papírem napuštěným 2xSSC (termostat, 37°C, 3 dny).

Po hybridizaci se z preparátů sundala krycí sklíčka a následovala aplikace DAPI (Sigma-Aldrich) na podbarvení chromozomů. Preparáty se promývaly nejdříve v roztoku 1% Triton X-100/0,1xSSC (5 min., 62°C) v lázni. Následovalo promývání v roztocích za pokojové teploty a třepání. Promývání probíhalo v roztocích v pořadí: PBS/1% Triton (5 min.), DAPI v 1% Tritonu (100 ul DAPI, 80 ml PBS/1% Triton X) (5 min.), PBS/1% PhotoFlo (3 min.) a nakonec H₂O/PhotoFlo (1 min.). Skla se poté nechala chvíli stát (nesmí být ale úplně suchá), potom se na každé z nich nanoslo 200 µl Antifade. Preparáty byly zakryty krycím sklíčkem, pomocí filtračního papíru byl vytlačen přebytek tekutiny. Po orámování krycích sklíček lakem na nehty a jeho zaschnutí byly

preparáty připraveny k použití. Prohlížení preparátů a zpracování získaných dat probíhalo stejným způsobem jako u rDNA FISH.

4. Výsledky

4.1 Karyotypy amblypygidních bičovců

Charinidae (Quintero 1986)

***Charinus* (Simon 1892)**

V rámci tohoto rodu jsem studoval dva druhy: *C. australianus* (L. Koch 1867) a *C. neocaledonicus* (Kraepelin 1895). U druhu *C. australianus* nebylo možno vzhledem k nedostatku vhodných figur sestavit karyogram. Diploidní počet $2n=74$ byl stanoven na základě počtu bivalentů v pozdní profázi I samce (Obr. 4a). Na základě pozorování chromozomů v metafázi II meiotického dělení (Obr. 4b) se dá usuzovat na značnou převahu jednoramenných chromozomů v karyotypu. Meióza je stejně jako u všech dalších druhů amblypygidů chiazmatická, v tomto případě s převahou bivalentů s jedním chiazmatem (Obr. 4a). Mezi pachytene a diplotene samce jsem pozoroval tzv. difúzní stádium. Tato etapa profáze I se vyznačuje značnou despiralizací bivalentů (Obr. 4c), které je rovněž charakteristické pro všechny ostatní studované druhy amblypygidů.

Karyotypem a distribucí konstitutivního heterochromatinu u druhu *C. neocaledonicus* jsem se zabýval v rámci bakalářské práce. Karyotyp sestává z 37 párů chromozomů ($2n = 74$), převažují chromozomy akrocentrické (24 párů). V karyotypu jsou dále 2 páry subtelocentriků, 2 páry submetacentriků a 9 párů metacentriků. Metodou C – pruhování (Obr. 4d) byly odhaleny terminální bloky konstitutivního heterochromatinu na jednom či obou koncích u řady chromozomů, vzácně se vyskytovaly drobné pruhy

interkalárního heterochromatinu. U jednoho páru delších metacentrických chromozomů však interkalární heterochromatin sestával ze dvou velkých, tandemově uspořádaných bloků v oblasti centromery (Sember, 2007). V rámci diplomové práce jsem analyzoval tento tandemový blok metodou fluorescenční pruhování. Výsledky ukázaly, že dvojitý blok heterochromatinu se nachází v oblasti centromery a je heterogenní co do obsahu bází. Jeden blok je GC-bohatý (zvýrazněný fluorochromem chromomycinem A₃) (Obr. 4g), druhý AT-bohatý (zvýrazněný fluorochromem DAPI) (Obr. 4h). Barvením dusičnanem stříbrným byly na dvou párech mitotických chromozomů odhaleny NOR (Obr. 4e - f). Vzhledem ke špatnému vyznačení primárních konstrikcí na mitotických chromozomech amblypygidů není možné stanovit morfologii těchto párů. Jedná se o středně velké chromozomy. U jednoho páru se nachází NOR v terminální, u druhého pravděpodobně v subterminální oblasti chromozomu. Morfologicky diferencované pohlavní chromozomy nebyly u tohoto druhu pozorovány, stejně jako u většiny ostatních amblypygidů.

Obr. 4: Analýza karyotypu a meiózy u *Charin neocaledonicus* a *C. australianus*.

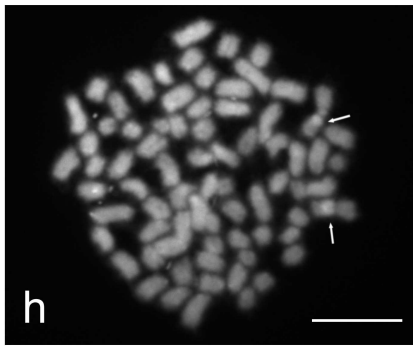
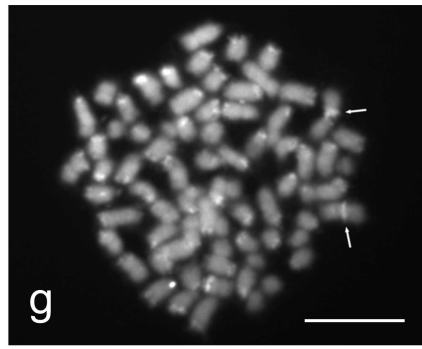
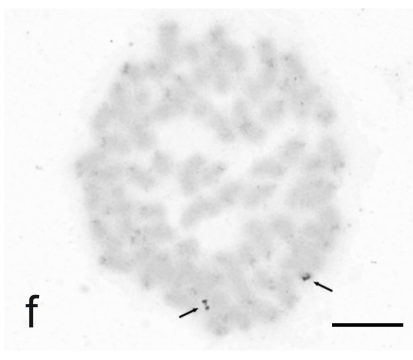
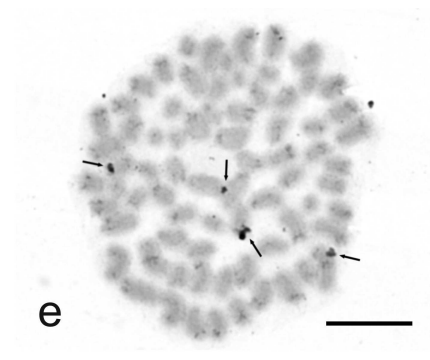
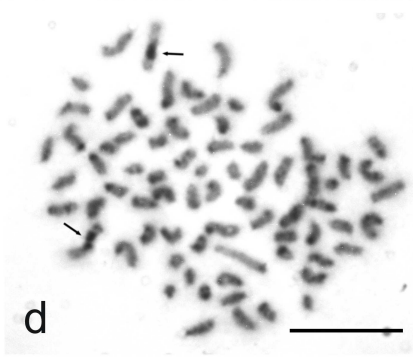
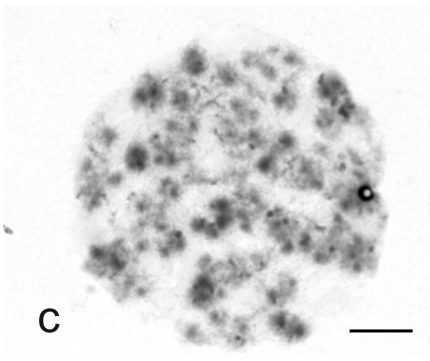
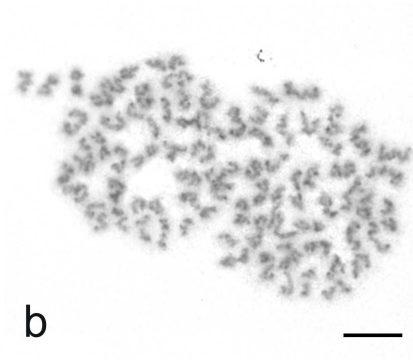
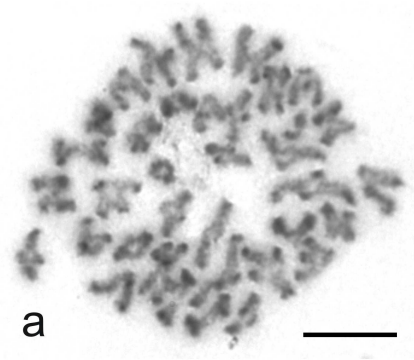
a,b *C. australianus*. **a** diakineze – je patrná převaha bivalentů s jedním chiazmatem.

b sesterské figury metafáze druhého meiotického dělení; v této etapě je morfologie chromozomů u bičovců lépe patrná než v mitotických metafázích.

c-h *C. neocaledonicus*.

c difúzní stádium. **d** C-pruhovaná mitotická metafáze - šipky ukazují na tandemový blok konstitutivního heterochromatinu u většího metacentrického páru chromozomů.

e,f mitotické metafáze, detekce NOR pomocí dusičnanu stříbrného; šipky ukazují na nukleolární organizátory, **g** mitotická metafáze, fluorescenční pruhování chromomycinem A₃ – vizualizace GC bohatých oblastí chromozomů. U chromozomového páru s tandemovým blokem heterochromatinu se vizualizuje jen jeden blok (šipky). **h** stejná mitotická metafáze, fluorescenční pruhování pomocí DAPI - jsou zvýrazněné AT bohaté oblasti; U chromozomového páru s tandemovým blokem heterochromatinu se vizualizuje jiný blok než než v obr. **g**. Měřítka – 10 μm.



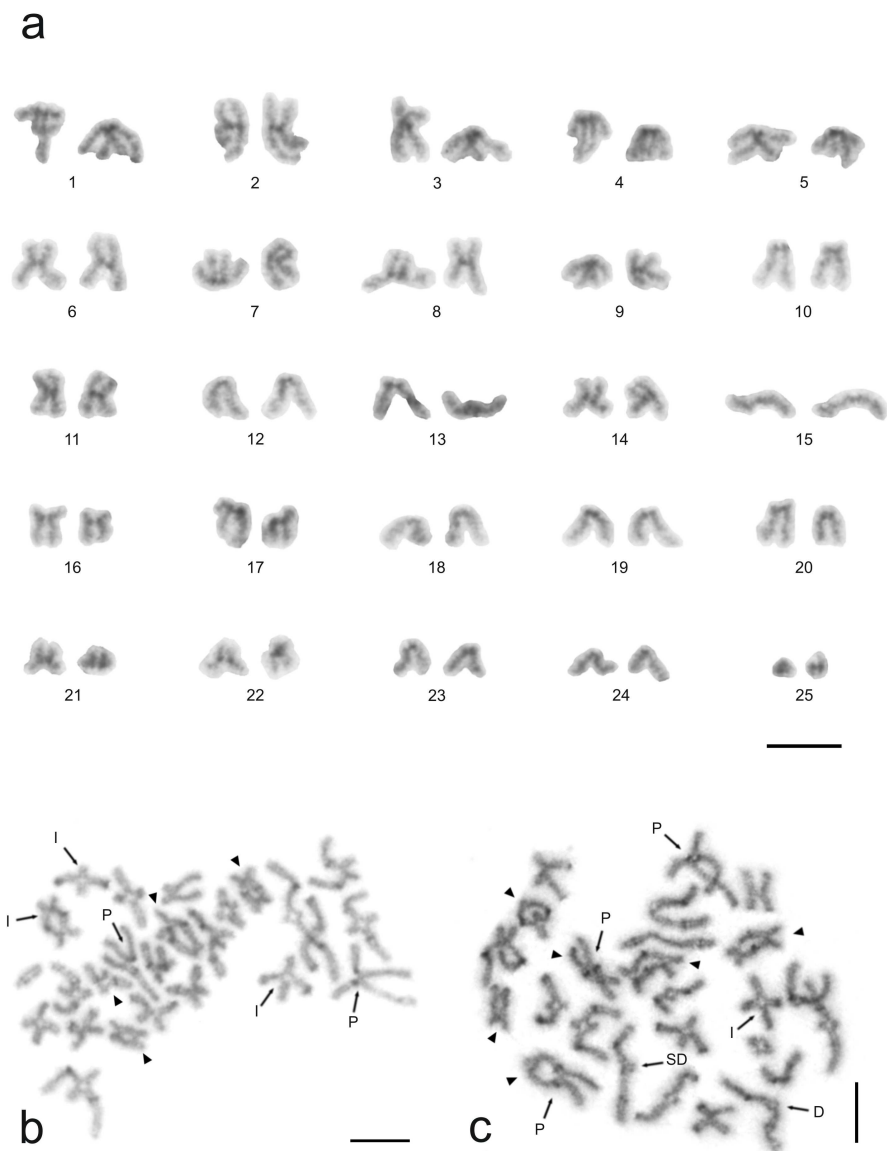
Sarax (Simon, 1892)

Sarax brachydactylus (Simon, 1892)

Samčí karyotyp tohoto druhu sestává z 50 středně velkých až menších chromozomů (Obr. 5a). Na rozdíl od zástupců rodu *Charinus* v karyotypu převažují dvouramenné chromozomy (Tab. 3). Nejvíce párů je metacentrických (14), dále jsou v karyotypu zastoupeny chromozomy submetacentrické (2 páry – č. 1, 16), subteloцентриcké (4 páry – č. 13, 19, 20, 23) a akrocentrické (5 párů). Délka chromozomů klesá plynule, pouze

Pár č.	Průměrná relativní délka páru	Průměrný centromerický index	Morfolog. typ
1	6,04	1,79	SM
2	6,04	1,25	M
3	5,8	1,21	M
4	5,76	1,36	M
5	5,12	1,18	M
6	4,9	1,18	M
7	4,86	1,13	M
8	4,74	1,32	M
9	4,72	1,18	M
10	4,16	7,56	A
11	4	1,11	M
12	3,98	46,53	A
13	3,76	5,44	ST
14	3,56	1,24	M
15	3,5	46,90	A
16	3,44	2,14	SM
17	3,42	1,70	M
18	3,42	54,09	A
19	3,34	5,73	ST
20	3,2	6,20	ST
21	2,88	1,19	M
22	2,7	1,19	M
23	2,7	5,64	ST
24	2,48	16,28	A
25	1,46	1,24	M

poslední pár metacentrických chromozomů je výrazně menší v porovnání s ostatními chromozomy v karyotypu. U tohoto druhu převažují v meióze opět bivalenty s jedním chiazmatem (Obr. 5b – c), počet bivalentů se dvěma chiazmaty je však vyšší než u rodu *Charinus* – průměrně 4 na figuru (sledováno bylo 10 figur). Chiazmata byla často proximální a interkalární (Obr. 5b). Někdy se vyskytla i distální a subdistální chiazmata (Obr. 5c). Pokud bivalent obsahoval dvě chiazmata, jedno bylo většinou proximální.



Obr. 5: Analýza karyotypu a meiózy u *Sarax brachydactylus*.

a karyogram - sestaveno z počátku anafáze I. **b,c** diplotene – široké šipky ukazují na bivalenty se dvěma chiazmaty; obyčejné šipky ukazují polohu chiazmat na některých bivalentech. Poloha chiazmat: D = distální, I = interkalární, P = proximální, SD = subdistální. Měřítko – 10 μ m.

Charontidae (Simon, 1892)

Charon grayi (Gervais, 1842)

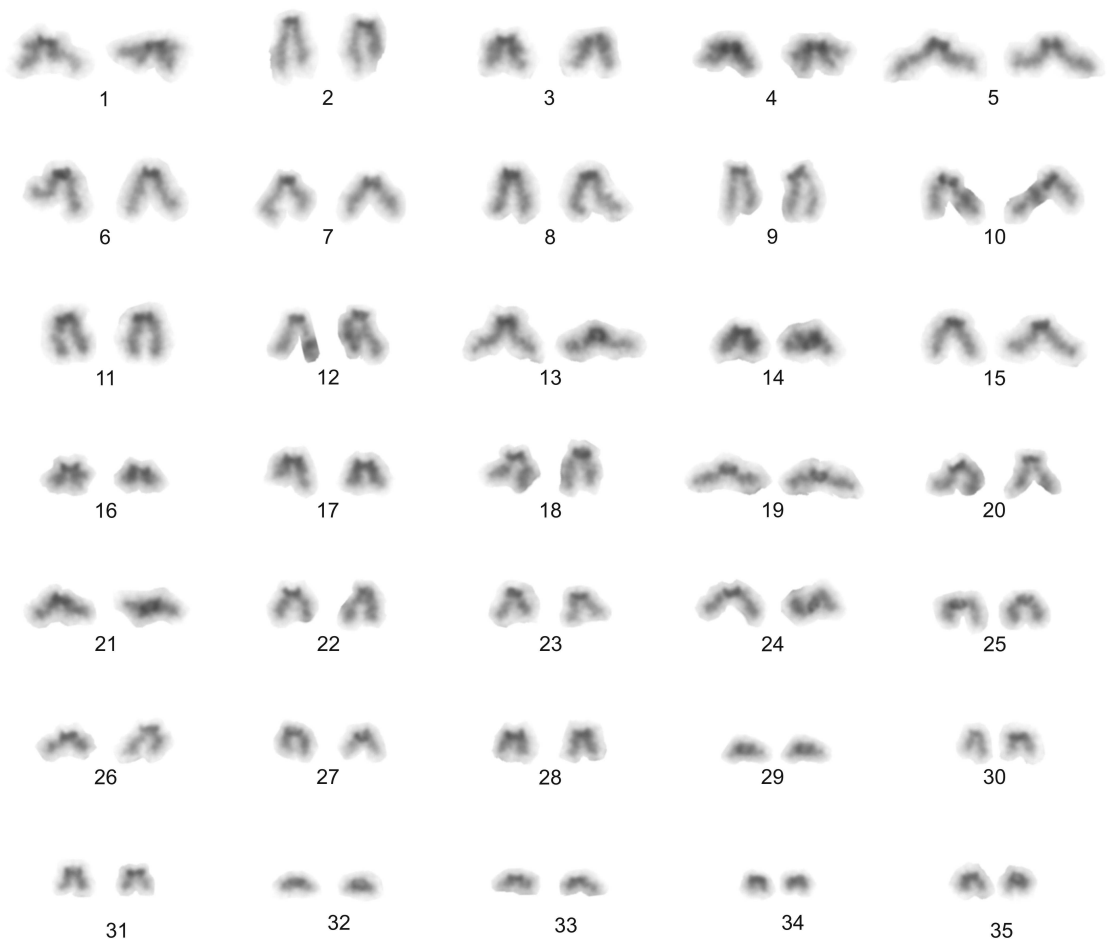
Karyotyp se skládá ze 70 chromozomů (Obr. 6), převažují chromozomy jednoramenné (8 párů subtelocentrických a 12 párů akrocentrických) (Tab. 4). Dvouramenné chromozomy jsou reprezentovány 7 páry metacentriků a 8 páry submetacentriků. Délka chromozomů se snižuje plynule bez významných velikostních skoků. Pomocí dusičnanu stříbrného byly detekovány dva páry chromozomů s terminálním NOR. NOR byly obvykle aktivní na třech chromozomech (Obr. 7a, 7b). V meióze se vyskytují v mírné převaze bivalenty s jedním chiazmatem, počet bivalentů se dvěma chiazmaty se pohybuje v rozmezí 6 – 13 (Obr. 7c, 7d). Průměrně se vyskytovalo 9 bivalentů se dvěma chiazmaty na figuru (sledováno bylo 13 figur). Pozoruhodné je, že řada bivalentů tvořených dlouhými akrocentrickými chromozomy nese často dvě interkalární chiazmata velmi blízko u sebe (Obr.

Pár č.	Průměrná relativní délka páru	Průměrný centromerický index	Morfolog. typ
1	4,34	1,85	SM
2	4,22	18,08	A
3	3,92	1,68	M
4	3,84	1,21	M
5	3,78	3,83	ST
6	3,64	9,58	A
7	3,62	7,92	A
8	3,52	9,13	A
9	3,42	9,62	A
10	3,42	7,93	A
11	3,36	7,94	A
12	3,34	3,95	ST
13	3,28	9,39	A
14	3,24	1,32	M
15	3,18	8,66	A
16	3,14	1,18	M
17	3,08	1,66	M
18	3,04	3,34	ST
19	2,86	3,01	ST
20	2,84	7,39	A
21	2,8	2,49	SM
22	2,6	3,42	ST
23	2,54	8,24	A
24	2,52	3,65	ST
25	2,26	8,82	A
26	2,2	4,36	ST
27	2,12	2,45	SM
28	2,1	2,39	SM
29	1,88	1,44	M
30	1,8	3,14	ST
31	1,78	2,20	SM
32	1,74	1,94	SM
33	1,66	2,58	SM
34	1,52	1,62	M
35	1,32	2,02	SM

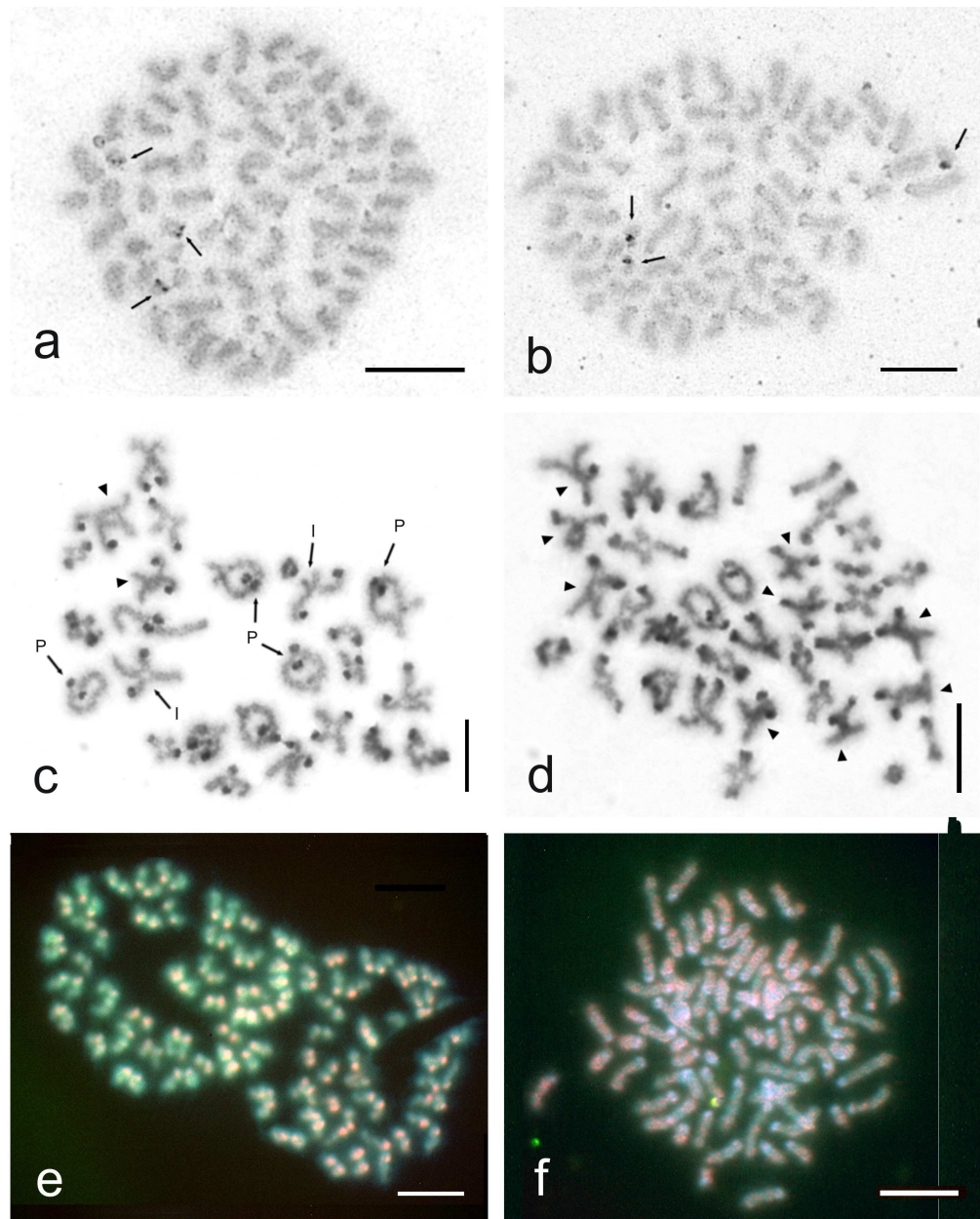
7c, 7d). Počet těchto bivalentů se lišil u jednotlivých figur v rozmezí 1 - 7. Průměrně se vyskytovaly 3 takové bivalenty na figuru. Poloha chiazmat byla nejčastěji interkalární,

často se vyskytovala také proximální poloha, zejména u bivalentů se dvěma chiazmaty (Obr. 7c).

C. grayi byl vybrán jako zástupce amblypygidů s vysokým počtem chromozomů pro detekci pohlavních chromozomů pomocí CGH (Obr. 7e, 7f). Celogenomové samčí a samičí sondy hybridizovaly s chromozomy rovnoměrně na preparátech obou pohlaví, pouze v oblastech centromer hybridizovala více samčí DNA (červený signál), což souviselo zřejmě s výskytem



Obr. 6: *Charon grayi* – karyogram samce. Sestaveno z počátku anafáze I. Měřítko – 10 μ m.



Obr. 7: Analýza karyotypu a meiózy u *Charon grayi*.

a,b detekce NOR dusičnanem stříbrným. Aktivní NOR se nachází na koncích třech chromozomů. **c,d** diplotene - široké šipky ukazují na bivalenty se dvěma interkalárními chiazmaty umístěnými blízko sebe; obyčejné šipky ukazují polohu chiazmat na některých bivalentech; figura **c** není tvořena kompletní sestavou bivalentů. Poloha chiazmat: I = interkalární, P = pericentromerické, SD = subdistální. **e** CGH – samec, sesterské figury metafáze II; v místech repetitivní DNA centromer převládá signál ze samčí sondy. **f** CGH – samice, pravidelné nasedání sond obou pohlaví vytváří nazelenalé zabarvení všech chromozomů, aniž by došlo k vizualizaci nějakého specifického úseku. Měřítko – 10 μ m.

repetitivní DNA, nikoliv s přítomností pohlavně - specifického úseku na chromozomu. Nebyla detekována oblast, jež by byla specifická pro samce. Je tedy možné, že pohlavní chromozomy tohoto druhu nejsou diferencovány ani na molekulární úrovni. Pro definitivní potvrzení výsledku bude podle mého názoru zapotřebí experiment zopakovat vícekrát, protože na některých menších chromozomech v karyotypu samce by mohly centromerické signály interferovat se signálem na pohlavně-specifickém úseku. Pro další experimenty by byla vhodná modifikace protokolu, při které by došlo k potlačení signálu samčí sondy na repetitivních sekvencích centromer u samčích preparátů. Řešením by mohlo být zvýšení koncentrace kompetitivní DNA, nebo příprava kompetitivní DNA přímo z izolované vysoce repetitivní frakce DNA samice (tzv. Cot DNA). CGH jsem u tohoto druhu provedl dvakrát.

Phryniidae (Blanchard, 1852)

***Acanthophrynus coronatus* (Kraepelin, 1899)**

V rámci americké čeledi Phryniidae jsem studoval karyotypy šesti druhů, zastoupeny byly všechny čtyři rody této čeledi.

Karyotyp samce druhu *Acanthophrynus coronatus* je tvořen 86 drobnými chromozomy (Obr. 8a), přičemž délka chromozomů se snižuje plynule bez významných skoků. Jedná se o dosud nejvyšší diploidní počet u amblypygidních bičovců. Na rozdíl od jiných druhů s vysokým počtem chromozomů má ovšem *A. coronatus* v karyotypu převahu dvouramenných (19 párů metacentrických a 8 párů submetacentrických) chromozomů (Tab. 5). Osmi páry jsou zastoupeny také subtelocentrické a akrocentrické chromozomy.

C – pruhování odhalilo u tohoto druhu vysoký obsah heterochromatinu (obr. 8b). Srovnání standardního a C-pruhovaného karyogramu (Obr. 8b) ukazuje, že se konstitutivní heterochromatin vyskytuje u většiny chromozomových párů v oblasti centromer, časté jsou ale rovněž terminální bloky. Některé páry chromozomů (např. páry č. 5, 9) obsahují také bloky interkalárního heterochromatinu, které na základě srovnání se standardním karyogramem neodpovídají polohám centromer. Stejně jako u ostatních druhů s vysokými diploidními počty převažují v meióze samců bivalenty s jedním chiazmatem (obr. 9a,b). U některých bivalentů je však vzhledem k jejich malé velikosti těžké stanovit přesně počet a polohu chiazmat. Je patrná převaha terminálních a subterminálních chiazmat (obr. 9a).

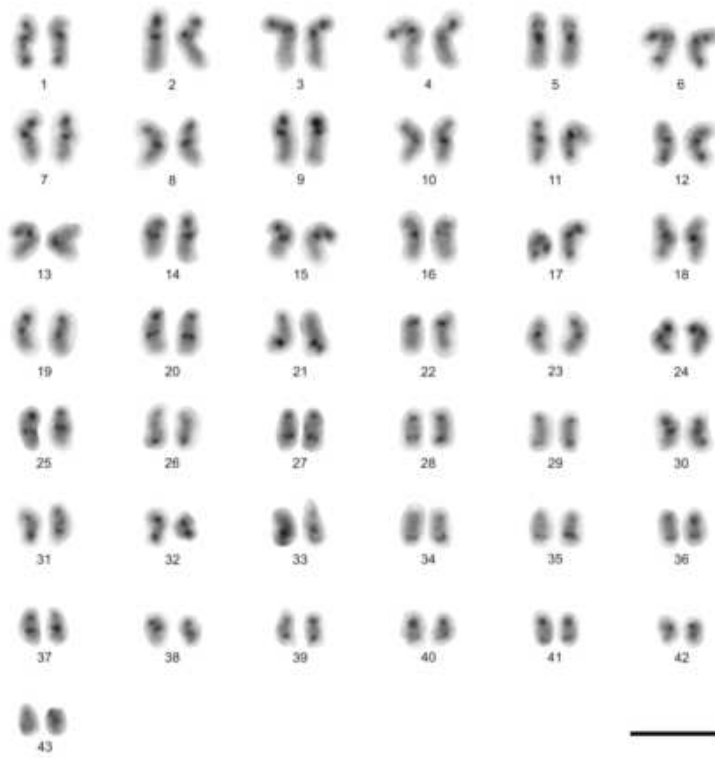
8: *Acantophrynus coronatus*, karyogramy samce. a standardní karyogram sestavený ze sesterských metafází II. **b** C-pruhovaný karyogram – sestaveno z mitotické metafáze. Měřítko – 10 µm.

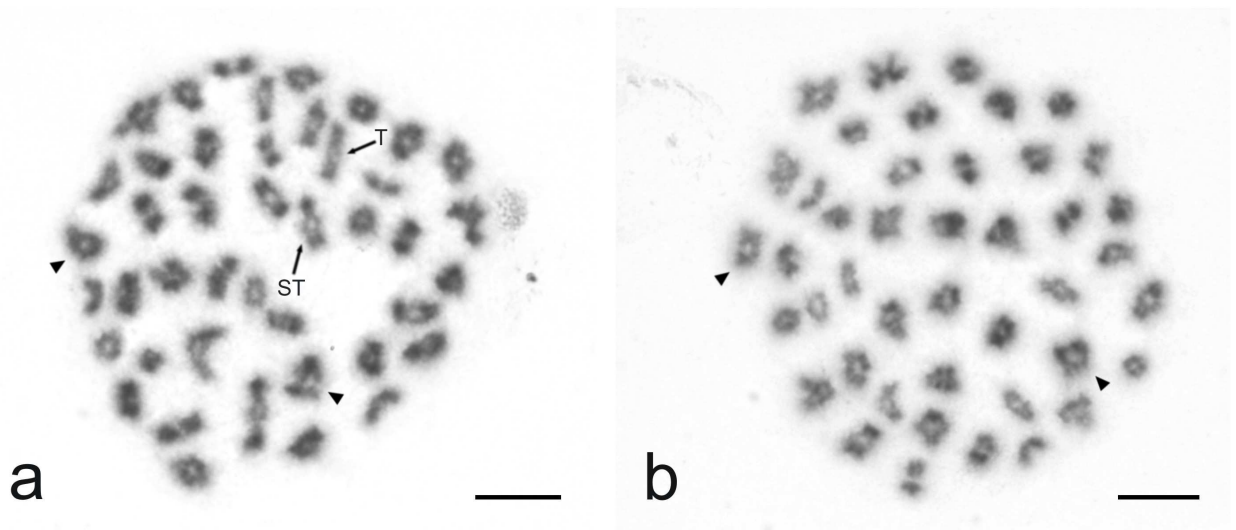
Pár č.	Průměrná relativní délka páru	Průměrný centromerický index	Morfolog. typ
1	3,64	1,45	M
2	3,2	2,14	SM
3	3,06	1,42	M
4	3,04	1,22	M
5	2,86	6,91	ST
6	2,86	1,62	M
7	2,84	1,18	M
8	2,82	1,72	SM
9	2,8	78,91	A
10	2,78	1,17	M
11	2,76	1,08	M
12	2,7	4,25	ST
13	2,62	2,11	SM
14	2,62	1,20	M
15	2,34	1,29	M
16	2,34	1,41	M
17	3,36	2,00	SM
18	2,34	1,37	M
19	2,32	1,49	M
20	2,32	1,40	M
21	2,28	3,41	ST
22	2,2	1,01	M
23	2,2	1,14	M
24	2,18	1,20	M
25	2,16	4,85	ST
26	2,14	7,15	A
27	2,12	1,49	M
28	2,12	27,94	A
29	2,06	7,59	A
30	2,02	1,27	M
31	1,9	8,07	A
32	1,86	2,57	SM
33	1,88	11,82	A
34	1,84	4,50	ST
35	1,8	1,85	SM
36	1,8	11,07	A
37	1,66	1,21	M
38	1,64	7,65	A
39	1,58	1,99	SM
40	1,56	5,87	ST
41	1,5	4,60	ST
42	1,42	2,45	SM
43	1,4	3,58	ST

a



b



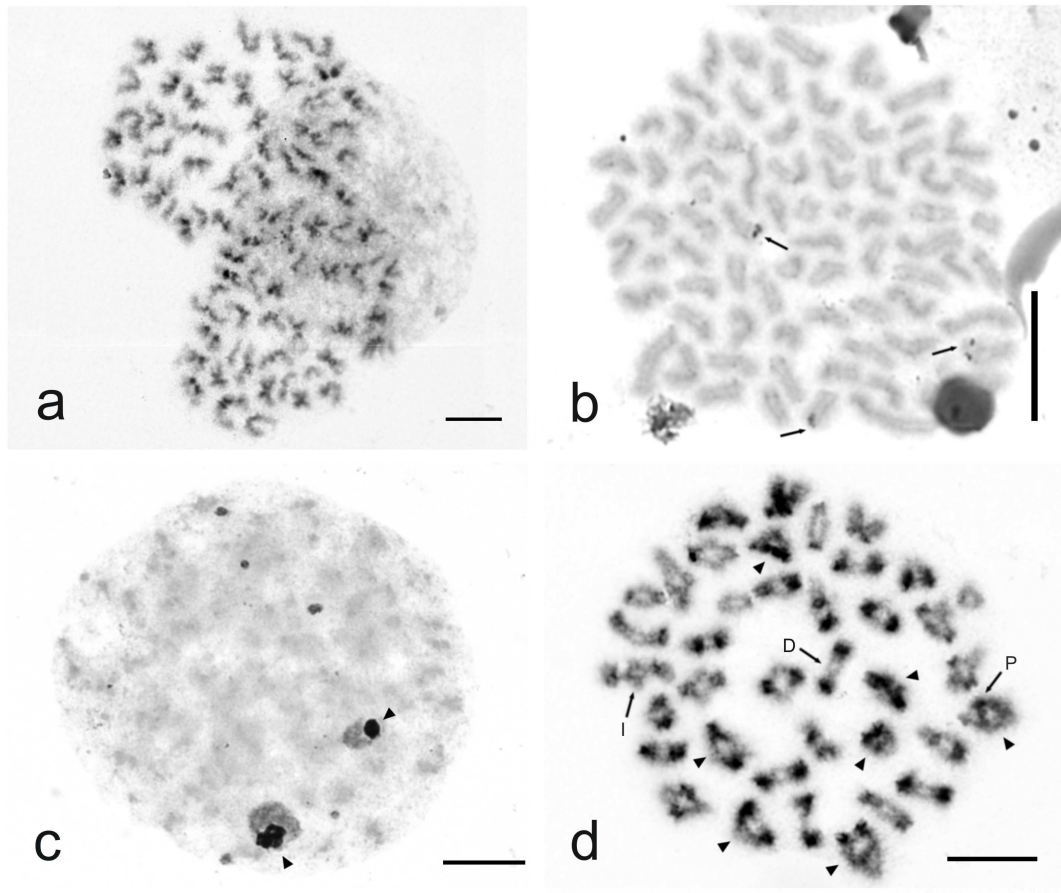


Obr. 9: *Acanthophrynus coronatus*, distribuce chiazmat

a diplotene. **b** diakineze - široké šipky ukazují na bivalenty se dvěma chiazmaty; obyčejné šipky ukazují na polohu některých chiazmat. Poloha chiazmat: T = terminální, ST = subterminální. Měřítka – 10 μ m.

***Heterophrynus cheiracanthus* (Gervais, 1842)**

Karyotyp samce je tvořen 76 chromozomy. Bylo získáno velké množství metafází II. Poloha centromer na chromozomech však nebyla většinou jasně patrná, takže nebylo možno sestavit karyogram. Je však patrný vyrovnaný poměr dvouramenných a jednoramenných chromozomů (Obr. 10a). Barvení dusičnanem stříbrným odhalilo tři aktivní NOR (Obr. 10b), což ukazuje na dva páry chromozomů s NOR. Na jednom páru chromozomů je NOR terminální, u druhého páru je aktivní NOR subterminální. V difúzním stádiu byla stříbřením odhalena dvě jádérka (obr. 10c), což svědčí o transkripční aktivitě v této fázi. V meióze samce převažují bivalenty s jedním chiazmatem (Obr. 10d), počet bivalentů se dvěma chiazmaty se pohyboval v rozmezí hodnot 2-8 na figuru, průměrně se vyskytovaly 4 takové bivalenty (sledováno bylo 13 figur). Poloha chiazmat byla nejčastěji distální, některé bivalenty měly chiazmata proximální a interkalární.



Obr. 10: Analýza karyotypu a meiózy u *Heterophrynus cheiracanthus*

a sesterské figury metafáze II - počet jednoramenných a dvouramenných chromozomů je přibližně stejný. **b** detekce NOR pomocí dusičnanu stříbrného, mitotická metafáze (šipky - tři aktivní nukleolární organizátory. **c** difúzní stádium - šipky ukazují na jádérka **d** diakineze - je patrná převaha bivalentů s jedním chiazmatem; široké šipky označují bivalenty se dvěma chiazmaty; obyčejné šipky - ukázky některých typů. Poloha chiazmat: I = interkalární, P = pericentromerické, D = distální. Měřítko - 10 μ m.

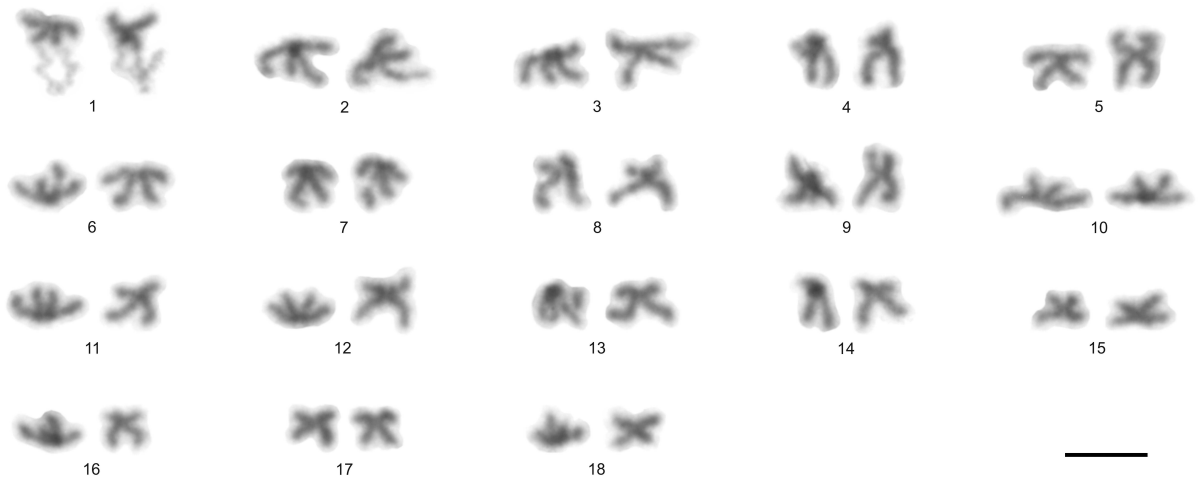
Paraphrynus (Moreno, 1940)

V rámci tohoto rodu jsem studoval karyotypy druhů *P. aztecus* (Pocock, 1894) a *P. mexicanus* (Bilimek, 1867). Karyotyp samce *P. aztecus* je tvořen 36 chromozomy (Obr. 11). Všechny páry jsou dvouramenné a až na 4 páry submetacentrických chromozomů (č. 1, 4, 13, 17) se jedná výhradně o chromozomy metacentrické (Tab. 6). Velikost chromozomů klesá plynule s výjimkou prvního páru. Dlouhá raménka tohoto páru jsou tvořena nápadně dlouhou negativně heteropyknotickou oblastí.

Pár č.	Průměrná relativní délka páru	Průměrný centromerický index	Morfolog. typ
1	8,64	2,40	SM
2	6,76	1,39	M
3	6,34	1,40	M
4	6,18	1,83	SM
5	5,9	1,25	M
6	5,96	1,25	M
7	5,84	1,43	M
8	5,66	1,24	M
9	5,74	1,47	M
10	5,48	1,41	M
11	5,42	1,58	M
12	5,14	1,54	M
13	4,82	1,83	SM
14	5,24	1,51	M
15	4,5	1,14	M
16	4,32	1,33	M
17	4	1,87	SM
18	3,98	1,37	M

Tento achromatický úsek byl nalezen u více jedinců a nevykazoval velkou variabilitu délky. V podobných achromatických úsecích bývají klastry genů, zejména repetice rDNA. Pro testování této alternativy jsem použil metodu rDNA FISH. Výsledky ukazují, že v karyotypu *P. aztecus* se vyskytuje 1 pár interkalárních NOR (Obr. 14 a - c). Nejlépe je tento NOR patrný na bivalentu v profázi I (Obr. 14c). Nejedná se ovšem o chromozomy páru č. 1 s achromatickou oblastí. Detekce NOR dusičnanem stříbrným potvrdila výsledky rDNA FISH (obr. 12d - f). Zároveň se však vizualizovaly i některé další oblasti. Porovnání s výsledkem C-pruhování (Obr. 12b - c) ukázalo, že tyto úseky odpovídají konstitutivnímu heterochromatinu. Ze stříbření vyplývá, že achromatické úseky prvního páru jsou tvořeny argentofilními bloky konstitutivního heterochromatinu, které spolu asociují v metafázi (Obr. 12b - c) a v anafázi mají opožděný rozchod (Obr. 12e). Z C - pruhování vyplývá, že intenzita zabarvení těchto úseků není homogenní (Obr. 12c).

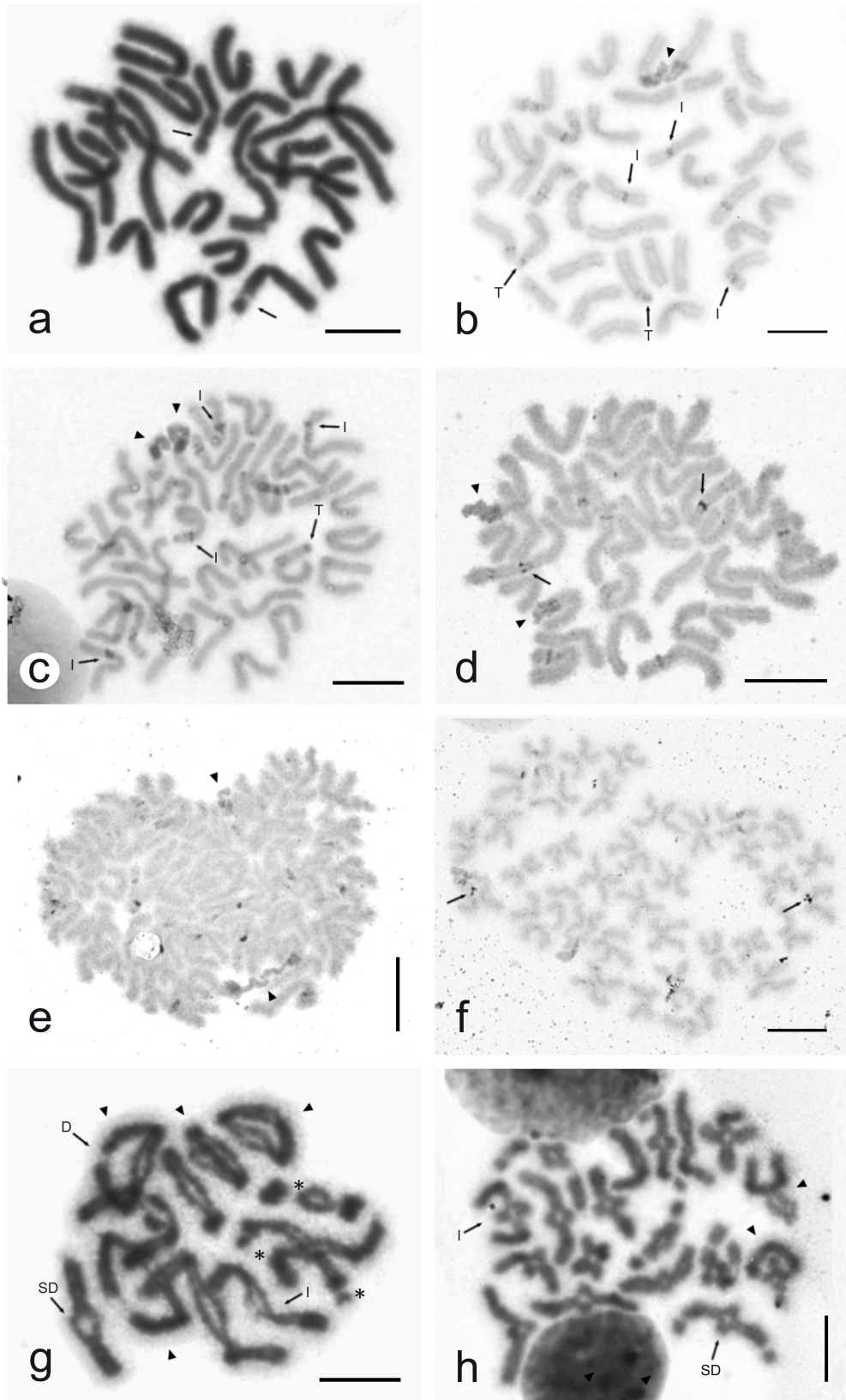
U tohoto druhu se nacházejí četné další bloky heterochromatinu, a to s interkalární nebo terminální polohou (Obr. 12b, 12c). Interkalární bloky odpovídají pravděpodobně většinou centromerickým oblastem. V meióze převažují bivalenty s jedním chiazmatem. Počet bivalentů se dvěma chiazmaty byl celkem konstantní (1 – 3 bivalenty na figuru). U bivalentu chromozomového páru č. 1 vznikalo v některých figurách chiazma v subterminální části achromatické oblasti (Obr. 12h). Chiazmata jsou často interkalární nebo subdistální (Obr. 12h).



Obr. 11: *Paraphrynus aztecus* – karyogram samce. Sestaveno ze sesterských metafází II. Měřítko - 10 μ m.

Obr. 12: Analýza karyotypu a meiózy u rodu *Paraphrynus*

a *P. mexicanus*,: mitotická metafáze. Šipky - sekundární konstriktce. **b-c** *P. aztecus*: C – pruhované mitotické metafáze. Šipky ukazují polohu konstitutivního heterochromatinu (I - větší bloky interkalárního heterochromatinu, T - větší bloky terminálního heterochromatinu). Široké šipky - bloky konstitutivního heterochromatinu ve zvláštní oblasti prvního páru chromozomů (patrná je asociace těchto úseků). **d-f** *P. aztecus*, detekce NOR pomocí dusičnanu stříbrného (**d** – mitotická metafáze, **e** – mitotická anafáze, **f** – metafáze II); šipky - NOR; široké šipky - bloky argentofilního heterochromatinu včetně zvláštního úseku prvního páru chromozomů. **g** *P. mexicanus*, diplotene. Široké šipky ukazují na bivalenty se dvěma chiazmaty; hvězdičky označují pravděpodobné sekundární konstriktce. **h** *P. aztecus* - diakineze; široké šipky - bivalenty se dvěma chiazmaty. Poloha chiazmat: D = distální I = interkalární, SD = subdistální. Měřítko - 10 μ m.



Karyotyp samce druhu *P. mexicanus* je tvořen pouze 24 chromozomy (Obr. 13), což je nejnižší diploidní počet objevený u amblypygidních bičovců. Chromozomy jsou ovšem v porovnání s amblypygidy s vyšším diploidním počtem mnohem větší. Všechny páry jsou dvouramenné (10 párů metacentriků a 2 páry submetacentriků) (Tab. 7). Velikost jednotlivých párů klesá plynule, řada chromozomů se vyznačuje

Pár č.	Průměrná relativní délka páru	Průměrný centromerický index	Morfolog. typ
1	11,44	1,49	M
2	10,4	1,54	M
3	9,96	1,95	SM
4	9,9	1,35	M
5	8,86	1,43	M
6	8,2	1,79	SM
7	7,32	1,60	M
8	6,8	1,43	M
9	7,68	1,42	M
10	6,66	1,15	M
11	6,42	1,22	M
12	6,36	1,36	M

podobnou délkou a morfologií. Je však patrný drobný skok mezi 1. a 2. párem a 4. a 5. párem. Na některých dobře rozprostřených mitotických metafázích byly patrné sekundární konstriktce na jednom páru chromozomů (Obr.12a).

I přes velmi nízký diploidní počet a jasně patrnou morfologii chromozomů nebyly ani u tohoto druhu nalezeny morfologicky diferencované pohlavní chromozomy. Metoda CGH ale odhalila diferenciaci pohlavních chromozomů na molekulární úrovni (Obr. 14d – g). Na preparátech ze samčího pohlaví (Obr. 14d - f) byl touto metodou v terminální části jednoho z nejdelších metacentrických chromozomů vizualizován krátký úsek specifický pouze pro samčí pohlaví. Jedná se tedy pravděpodobně o chromozom Y. Signál v terminální části daného chromozomu byl patrný u většiny pozorovaných figur. Další signály na chromozomech jsou způsobeny intenzivnější fluorescencí DAPI v oblastech centromer, které jsou tedy patrně AT-bohaté. V oblastech repetitivní DNA, které hybridizují rychleji, se na některých chromozomech vytvořily nespecifické signály. U samičky nebyl na preparátech patrný žádný signál, který by naznačoval přítomnost diferencovaného pohlavního chromozomu. V oblastech centromer byla opět intenzivnější

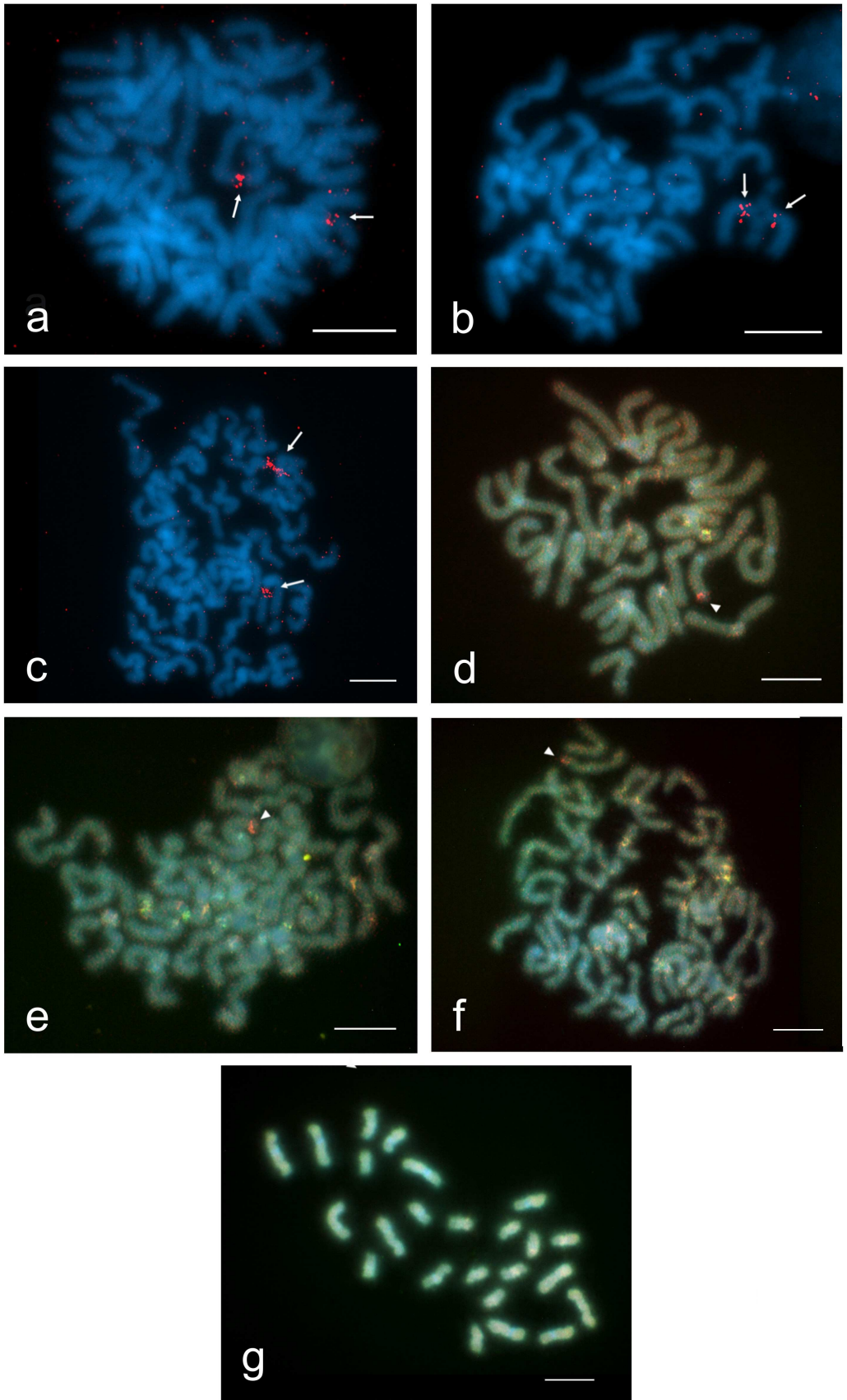
fluorescence DAPI (Obr. 14g). Výsledky naznačují přítomnost systému pohlavních chromozomů XX/XY, vzhledem k přítomnosti dalších signálů při značení samčí DNA by však bylo žádoucí zopakovat experiment.

V meióze převažují bivalenty s jedním chiazmatem, sledováno bylo 10 figur (Obr. 12g). Jejich převaha je na rozdíl od příbuzného druhu *P. aztecus* méně výrazná. Počet bivalentů se dvěma chiazmaty kolísal obvykle mezi hodnotami 3-5, jedna figura obsahovala pouze bivalenty s jedním chiazmatem a naopak jedna 6 bivalentů se dvěma chiazmaty. Průměrně se vyskytovaly 4 bivalenty se dvěma chiazmaty na figuru (obr. 12g). Poloha chiazmat je většinou interkalární nebo distální.



Obr. 13: *Paraphrynus mexicanus* – karyogram samce. Sestaveno ze sesterských metafází II. Měřítko - 10 μ m.

Obr. 14: Rod *Paraphrynus*, analýza karyotypu pomocí metod FISH. a–c Detekce NOR u *P. aztecus* pomocí FISH s 18S rDNA sondou; šípky ukazují na hybridizační signály na dvou chromozomech (a,c) resp. na jednom bivalentu (b) (a - mitotická metafáze, b - diakineze, c - mitotická prometáfáze). **d–g** Detekce pohlavních chromozomů pomocí CGH u *P. mexicanus*. **d–f** samčí mitotické metafáze; šípka míří na hybridizační signál v terminální části chromozomu Y; ostatní signály jsou patrně nespecifické; v oblastech centromer je vyšší fluorescence DAPI, a to patrně v důsledku přítomnosti AT – bohatých úseků DNA. **g** samičí mitotická metafáze; chromozomy neobsahují oblast specifickou pro toto pohlaví. Měřítko - 10 μ m.



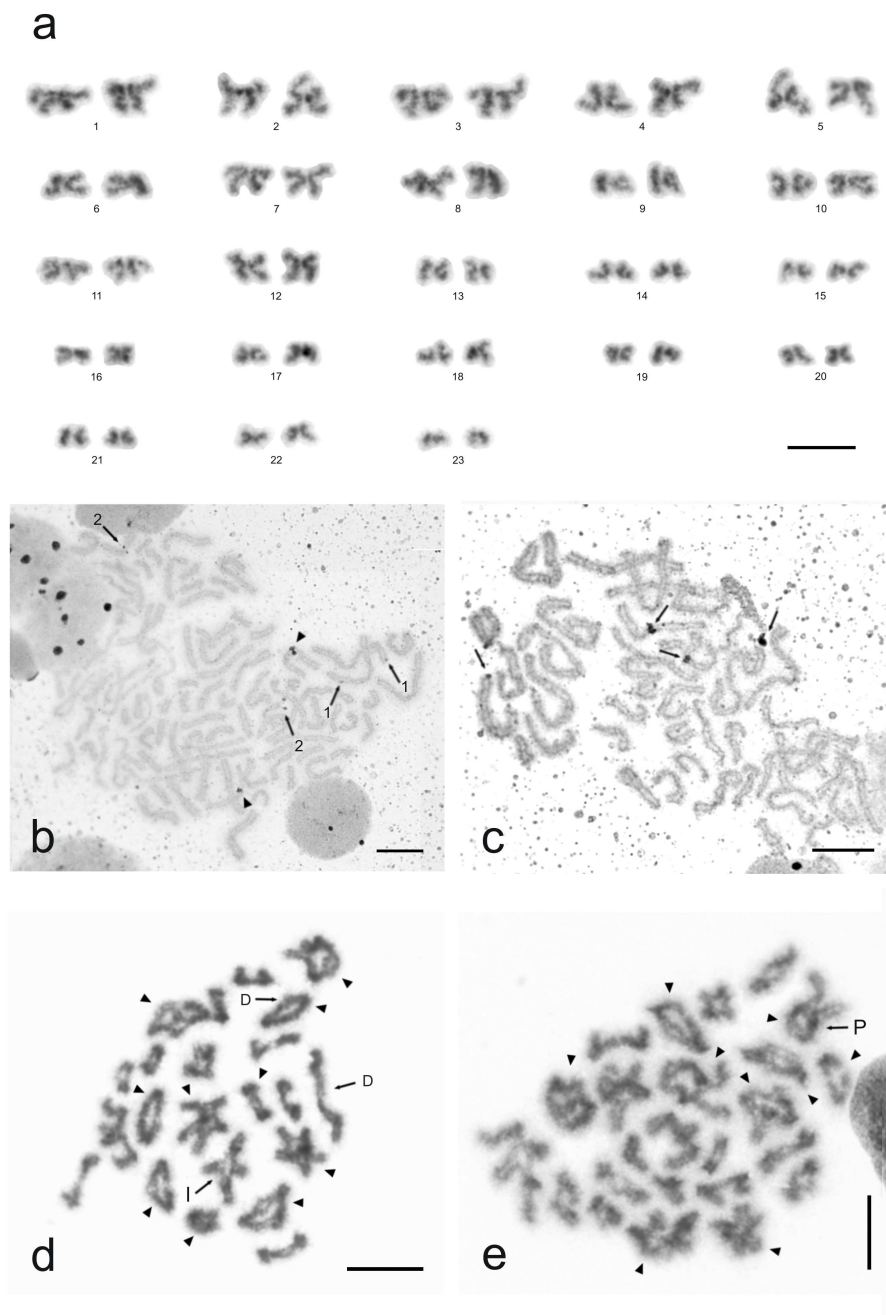
***Phrynus* (Lamarck, 1801)**

***Phrynus whitei* (Lamarck, 1801)**

Karyotyp samce je tvořen 46 chromozomy (Obr. 15a). Podobně jako u zástupců rodu *Paraphrynus* i zde karyotyp tvořen výhradně dvouramennými chromozomy (20 párů metacentriků a 3 páry submetacentriků) (Tab. 8). Velikost chromozomů klesá pozvolna, i když odlišná velikost prvních třech a posledního páru jsou již znatelné. Obzvláště poslední pár chromozomů je velmi malý. Detekce NOR pomocí dusičnanu stříbrného odhalila 3 páry chromozomů s NOR (Obr. 15 b,

15c). Jeden pár menších chromozomů má NOR umístěný terminálně. Druhý pár NOR se nachází terminálně až subterminálně na velkých metacentrických chromozomech a středně velký metacentrický pár má umístěn NOR v blízkosti centromery – signál v této oblasti je v rámci detekovaných NOR nejsilnější. V jedné mitotické metafázi (Obr.15b) byl u páru velkých metacentrických chromozomů pozorován signál pouze na jedné chromatidě. Jeden chromozom tohoto páru měl NOR umístěn terminálně a druhý interkalárně. V meióze sice převažují bivalenty s jedním chiazmatem, počet bivalentů se dvěma chiazmaty je ale vysoký (Obr. 15d – e). V 17 zkoumaných figurách se pohyboval počet bivalentů se dvěma chiazmaty mezi 5 – 11 na figuru, průměrně se těchto bivalentů nacházelo 7. Poloha chiazmat je u většiny bivalentů distální nebo interkalární (Obr. 15d).

Pár č.	Průměrná relativní délka páru	Průměrný centromerický index	Morfolog. typ
1	7,14	1,22	M
2	6,92	1,16	M
3	6,6	1,25	M
4	6,04	1,12	M
5	6,02	1,99	SM
6	5,78	1,09	M
7	5,62	1,19	M
8	5,32	1,46	M
9	4,82	1,10	M
10	4,72	1,34	M
11	4,66	1,25	M
12	4,58	1,30	M
13	3,74	1,25	M
14	3,3	1,09	M
15	3,28	1,39	M
16	3,1	2,01	SM
17	2,96	1,14	M
18	2,96	1,18	M
19	2,72	1,39	M
20	2,7	1,23	M
21	2,54	1,93	SM
22	2,34	1,24	M
23	1,94	1,46	M



Obr. 15: *Phrynus whitei* – analýza karyotypu a meiózy. a karyogram samce; sestaveno ze sesterských metafází II. **b,c** mitotická metafáze, detekce NOR pomocí dusičnanu stříbrného; šipky - NOR; **d,e** diplotene široké šipky - bivalenty se dvěma chiazmaty. Obvyčejné šipky ukazují na polohu některých chiazmat. Poloha: D = distální, I = interkalární, P = proximální. Měřítko - 10 μ m.

Phrynichidae (Simon, 1892)

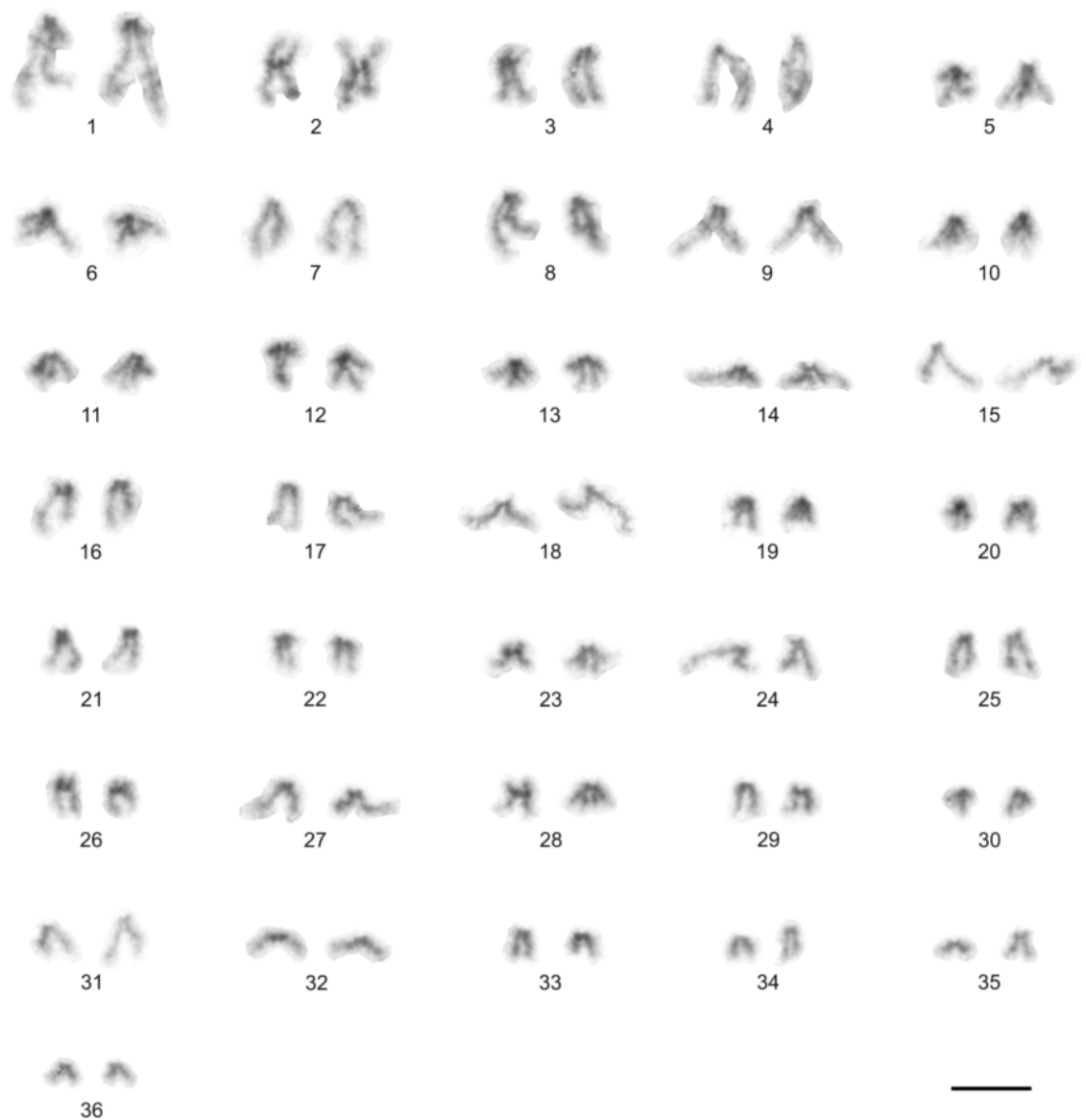
***Damon* (C. L. Koch, 1850)**

V rámci tohoto rodu jsem studoval druh *D. medius* (Herbst, 1797) a sociální druh *D. diadema* (Simon, 1876). U druhu *D. medius* jsem navázal na svoje výsledky z bakalářské práce (Sember, 2007). Původní karyogram *D. medius* ze Senegalu ($2n = 66$) byl ovšem na základě nově získaných údajů z většího množství materiálu přepracován. V rámci diplomové práce jsem měl k dispozici jedince ze dvou lokalit. Jedinci z populace ze Senegalu mají diploidní počet chromozomů 70 (Obr. 16), zatímco jedinec pocházející z Toga má 72 chromozomů (Obr. 17). Jedinci z obou populací se navzájem lišili morfologií chromozomů. Zatímco samec ze Senegalu měl karyotyp tvořený 16 páry metacentriků, 8 páry submetacentriků, 10 páry subtelocentriků a jediným párem akrocentriků (nejmenší pár) (Tab. 9), karyotyp samce z Toga obsahoval více akrocentrických chromozomů (11 párů) na úkor metacentrických (9 párů) (Tab 10). V počtech párů submetacentriků (7 párů) a subtelocentriků (9 párů) se jedinec z Toga od jedinců ze Senegalu příliš nelišil. U obou populací jsem pozoroval velký rozdíl ve velikosti mezi prvním a posledním párem chromozomů. Největší pár chromozomů je v obou karyotypech výrazně delší než následující páry a vykazuje v obou populacích podobnou morfologii. Mezi nejmenšími chromozomy se v karyotypu exempláře z Toga vyskytuje větší podíl akrocentrických chromozomů oproti karyotypu jedince ze Senegalu. Obě populace se mezi sebou mírně liší také distribucí chiazmat. V obou populacích převažují bivalenty s jedním chiazmatem. Průměrný počet bivalentů se dvěma chiazmaty na figuru jsou dvě u jedinců ze Senegalu (sledováno 9 figur) (Obr. 18b) a 4 u jedince z Toga (sledováno 8 figur) (Obr. 18c). Chiazmata jsou u obou populací převážně distální a interkalární, vzácně se vyskytují i chiazmata proximální.

Tabulka 9: Charakteristika karyotypu <i>Damon medius</i> (Senegal)				Tabulka 10: Charakteristika karyotypu <i>Damon medius</i> (Togo)			
Pár č.	Průměrná relativní délka páru	Průměrný centromerický index	Morfolog. typ	Pár č.	Průměrná relativní délka páru	Průměrný centromerický index	Morfolog. typ
1	5,28	2,83	SM	1	6,76	4,75	ST
2	4,92	1,16	M	2	4,24	1,21	M
3	4,7	1,37	M	3	4,14	3,18	ST
4	3,62	2,27	SM	4	4,02	50,87	A
5	3,56	1,48	M	5	3,76	1,66	M
6	3,56	1,54	M	6	3,56	1,56	M
7	3,52	2,49	SM	7	3,46	10,54	A
8	3,5	1,08	M	8	3,4	5,89	ST
9	3,46	1,07	M	9	3,28	13,59	A
10	3,26	5,79	ST	10	3,24	1,29	M
11	3,18	1,07	M	11	3,22	1,28	M
12	3,18	2,41	SM	12	3,04	2,11	SM
13	3,08	6,90	ST	13	2,98	1,35	M
14	2,68	6,96	ST	14	2,88	1,77	SM
15	2,66	2,03	SM	15	2,72	6,46	ST
16	2,66	1,30	M	16	2,7	7,93	A
17	2,64	1,20	M	17	2,64	135,04	A
18	2,62	3,25	SM	18	2,62	1,53	M
19	2,62	5,72	ST	19	2,62	13,34	A
20	2,58	1,31	M	20	2,54	1,89	SM
21	2,54	1,16	M	21	2,48	8,30	A
22	2,52	4,31	ST	22	2,36	2,63	SM
23	2,46	4,54	ST	23	2,36	1,80	SM
24	2,44	1,17	M	24	2,3	10,15	A
25	2,42	1,18	M	25	2,22	6,46	ST
26	2,4	3,85	ST	26	2,22	2,92	SM
27	2,32	1,97	M	27	2,2	5,85	ST
28	2,24	3,08	ST	28	2,2	1,20	M
29	2,24	2,34	SM	29	2,16	3,83	ST
30	2,1	4,59	ST	30	2,12	1,53	M
31	2,08	1,27	M	31	2,08	8,17	A
32	1,92	1,27	M	32	1,8	64,61	A
33	1,76	1,89	SM	33	1,64	5,23	ST
34	1,6	3,73	ST	34	1,62	76,44	A
35	1,42	11,25	A	35	1,28	2,60	SM
				36	1,2	3,13	ST

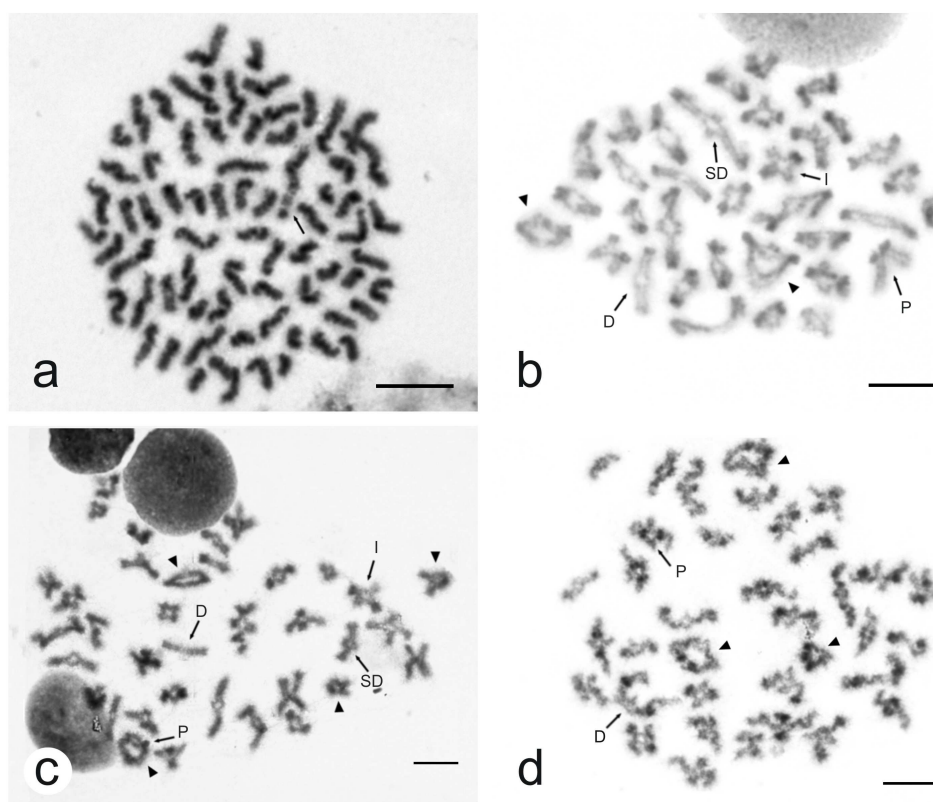


Obr. 16: *Damon medius* (Senegal) – karyogram samce. Sestaveno ze sesterských metafází II. Měřítko - 10 μ m.



Obr. 17: *Damon medius* (Togo) – karyogram samce. Sestaveno z počátku anafáze I. Měřítko - 10 μm.

Dalším studovaným zástupcem rodu *Damon* byl *D. diadema*, u něhož se podařilo stanovit pouze diploidní počet ($2n = 74$), a to na základě počtu bivalentů v profázi I (Obr. 18d). Z hlediska distribuce a polohy chiazmat vykazuje tento druh podobné charakteristiky jako *D. medius*. Dalším studovaným zástupcem rodu *Damon* byl *D. diadema*, u něhož se podařilo stanovit pouze diploidní počet ($2n = 74$), a to na základě počtu bivalentů v profázi I (Obr. 18d). Z hlediska distribuce a polohy chiazmat vykazuje tento druh podobné charakteristiky jako *D. medius*.



Obr. 18: Rod *Damon* – analýza karyotypu a meiózy.

a *D. medius* (Senegal): mitotická metafáze - šipka ukazuje pravděpodobnou sekundární konstrikcii. **b** *D. medius* (Senegal): diakineze **c** *D. medius* (Togo), diplotene. **d** *D. diadema*, raná diplotene. Široké šipky u obrázků **b** – **d** ukazují na bivalenty se dvěma chiazmaty; obyčejné šipky u obrázků **b** – **d** ukazují polohu některých chiazmat. Poloha: D = distální, P = proximální, SD = subdistální). Měřítka - 10 μm .

Euphrynichus (Weygoldt, 1995)

U čeledi Phrynichidae jsem studoval zástupce tří rodů. U rodu *Euphrynichus* jsem se zaměřil na druhy *E. amanica* (Werner, 1936) a *E. bacilifer* (Weygoldt, 1995).

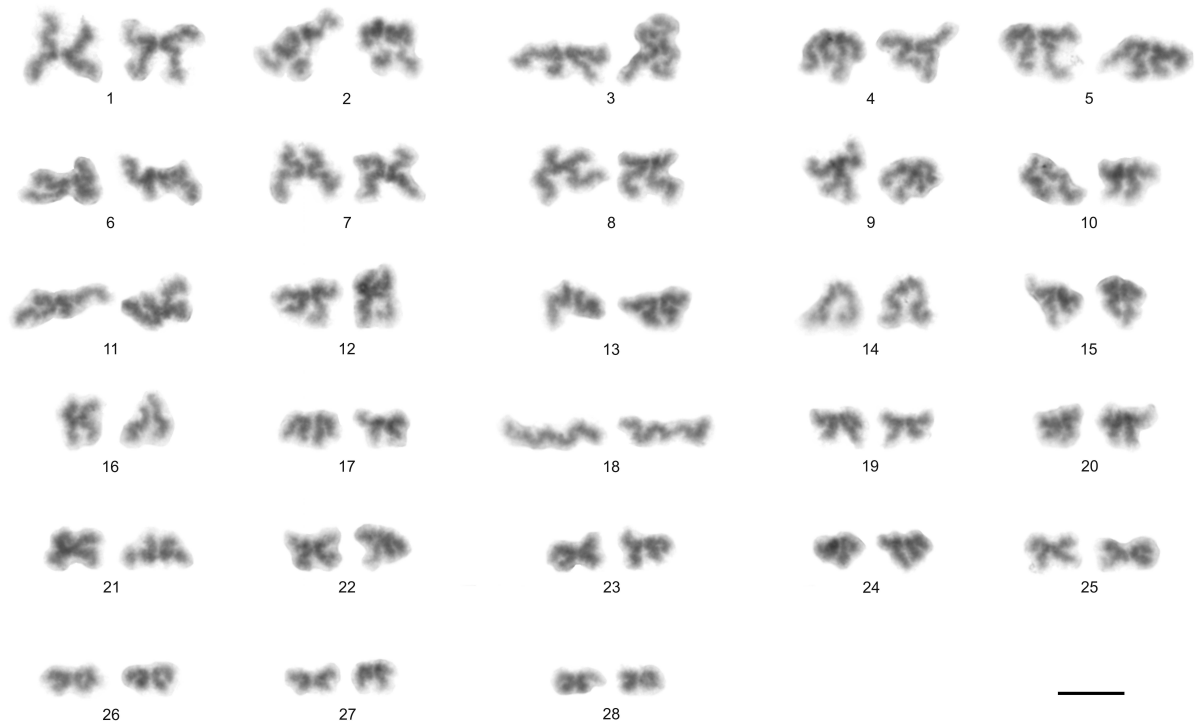
Karyotyp samce *E. amanica* je tvořen 78 chromozomy. Počet chromozomů byl zjištěn na základě počtu bivalentů v profázi I (Obr. 20c). Nejlépe rozprostřené metafáze II naznačují, že poměr jednoramenných a dvouramenných chromozomů je přibližně vyrovnaný. Některé chromozomy mají velmi výrazné centromery (Obr. 20c, 20f). Zajímavá je dále dále přítomnost dvou méně spiralizovaných chromozomů na periferii mitotických metafází (Obr. 20a). Neobvyklý je také heteropyknotický bivalent pozorovaný v difúzním stádiu samce (Obr. 20b).

Tabulka 11: Charakteristika karyotypu *Euphrynichus bacilifer*

Pár č.	Průměrná relativní délka páru	Průměrný centromerický index	Morfolog. typ
1	5,4	1,25	M
2	5,34	1,22	M
3	5,1	1,68	M
4	4,94	1,41	M
5	4,86	1,26	M
6	4,68	1,20	M
7	4,46	1,17	M
8	4,38	1,65	M
9	4,16	1,36	M
10	4,1	1,24	M
11	3,92	2,11	SM
12	3,84	1,10	M
13	3,58	1,41	M
14	3,34	15,91	A
15	3,34	1,27	M
16	3,22	1,21	M
17	3,22	1,10	M
18	3,16	148,32	A
19	3,06	1,21	M
20	3,02	1,34	M
21	2,94	1,17	M
22	2,8	1,26	M
23	2,7	1,23	M
24	2,7	1,23	M
25	2,5	1,11	M
26	2,34	1,12	M
27	2	1,29	M
28	2	1,18	M

U druhu *E. bacilifer* je karyotyp samce tvořen 56 chromozomy (Obr. 19). Až na tři páry jsou všechny chromozomy metacentrické. Pár č. 11 je submetacentrický a páry č. 14 a 18 akrocentrické (Tab. 11). Chromozomy tohoto druhu jsou jedny z největších v rámci amblypygidních bičovců. Velikost chromozomů klesá pozvolna. Pár č. 2 nese rozsáhlou interkalární sekundární konstrikci patrnou i na diplotenních bivalentech (Obr. 20g - f). Na obrázku 20g je patrná sekundární konstrikce ještě na dalším bivalentu. Bivalenty mají

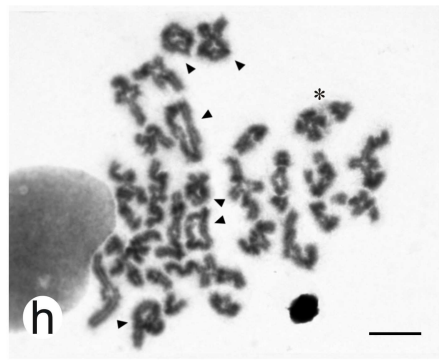
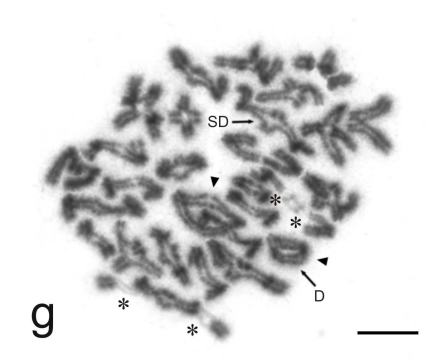
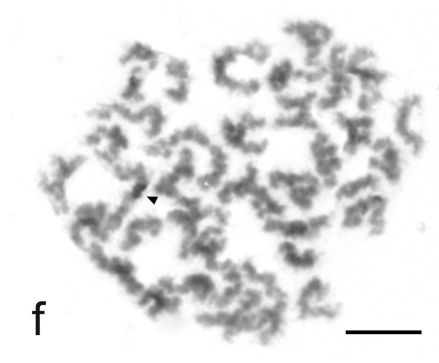
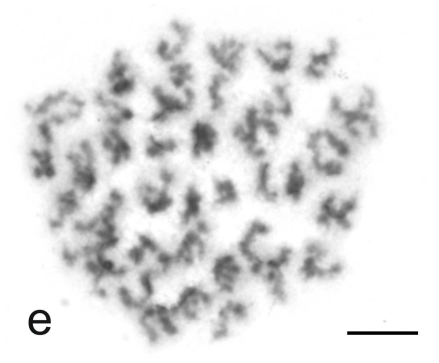
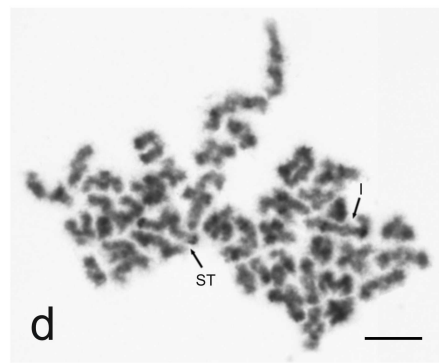
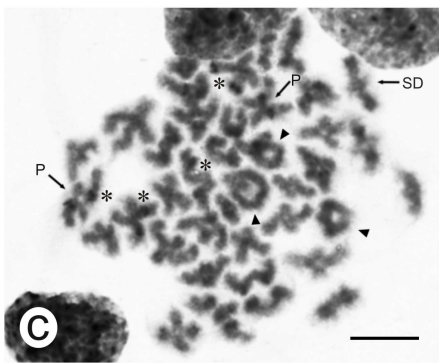
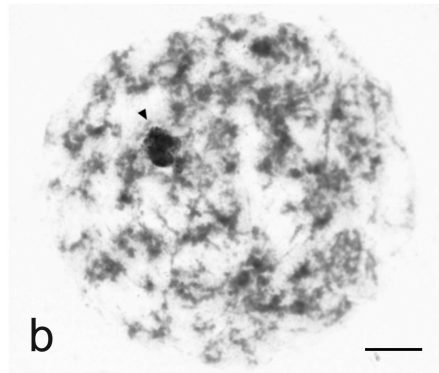
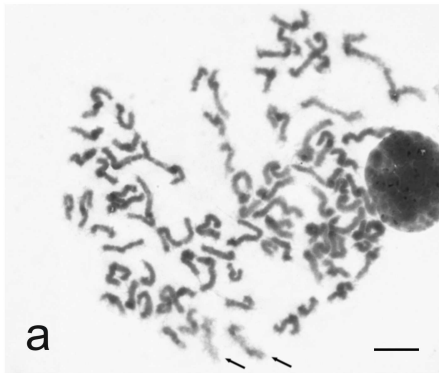
většinou jedno chiazma. Počet bivalentů se dvěma chiazmaty značně osciluje, a to v rozmezí 2 – 7 bivalentů na figuru (sledováno bylo 9 figur). Chiazmata jsou obvykle distální a subdistální. U některých menších bivalentů jsou chiazmata proximální.



Obr. 19: *Euphrynichus bacilifer* – karyogram samce. Sestaveno ze sesterských metafází II. Měřítko - 10 μm .

Obr. 20: Rod *Euphrynichus* – analýza karyotypu a meiotického dělení

a-e *E. amonica*. **a** mitotická prometáfáze; šipky - nápadně despiralizované chromozomy na okraji figury. **b** difúzní stádium. Široké šipky ukazují na pozitivně heteropyknotické tělísko. **c,d** diplotene. **e** metafáze II; šipka - nápadně velké centromery. **f -h** *E. bacilifer*, **f,g** diplotene – široké šipky ukazují na bivalenty se dvěma chiazmaty, hvězdičky označují polohu sekundární konstrikce, obyčejné šipky ukazují polohu některých chiazmat. Poloha – D – distální, SD – subdistální. Měřítko - 10 μm .



Phrynichus (Karsch, 1879)

V rámci rodu *Phrynichus* jsem analyzoval karyotypy třech druhů: *P. ceylonicus* (C.L. Koch, 1843), *P. dhofarensis* (Weygoldt, Pohl and Polak, 2002) a *P. orientalis* (Weygoldt, 1998).

Karyotyp samce druhu *P. ceylonicus* se skládá z 52 dvouramenných, převážně metacentrických chromozomů (Obr. 21). Pouze páry č. 10, 14, 15, 17 jsou submetacentrické (Obr. 21, Tab. 12). Velikost chromozomů v karyotypu klesá velmi pozvolna. Metodou C-pruhování byly na některých chromozomech vizualizovány drobné centromerické a interkalární bloky heterochromatinu. Řada chromozomů však neobsahovala cytologicky

Tabulka 12: Charakteristika karyotypu *Phrynichus ceylonicus*

Pár č.	Průměrná relativní délka páru	Průměrný centromerický index	Morfolog. typ
1	6,02	1,1	M
2	5,5	1,16	M
3	5,4	1,15	M
4	4,92	1,04	M
5	4,7	1,6	M
6	4,38	1,35	M
7	4,36	1,34	M
8	4,36	1,27	M
9	4,22	1,71	M
10	3,96	2,31	SM
11	3,8	1,28	M
12	3,8	1,14	M
13	3,78	1,4	M
14	3,7	2,38	SM
15	3,58	2,27	SM
16	3,56	1,29	M
17	3,56	2,76	SM
18	3,56	1,47	M
19	3,2	1,26	M
20	3,16	1,31	M
21	2,92	1,05	M
22	2,92	1,48	M
23	2,92	1,24	M
24	2,32	1,77	M
25	2,32	1,18	M
26	2,2	1,08	M

detekovatelný heterochromatin v oblasti centromery (Obr. 23a). V meióze převažují bivalenty s jedním chiazmatem (Obr. 23b), počet bivalentů se dvěma chiazmaty je průměrně dva na figuru (sledováno bylo 16 figur). Poloha chiazmat je často distální nebo interkalární, vzácně proximální.

Karyotyp samce *P. dhofarensis* je tvořen pouze 30 chromozomy (obr. 21), což je druhý nejmenší počet v rámci amblypygidních bičovců. Až na dva páry (č. 2 a 13) se jedná o chromozomy metacentrické (Tab. 13). Nejdelší chromozomy tohoto druhu jsou

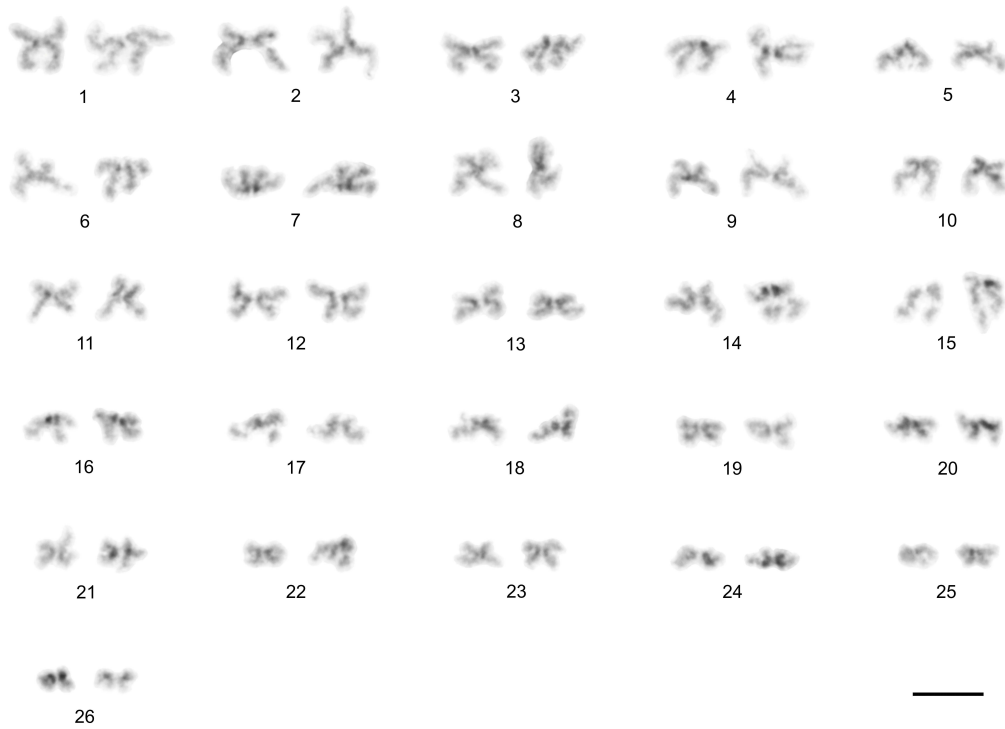
zřejmě největšími chromozomy pozorovanými u amblypygidních bičovců. U prvních třech párů klesá délka výrazněji, pak je již snižování délky chromozomových párů pozvolné. s výjimkou posledního páru, který je výrazně menší. Tento pár se svou velikostí blíží velikosti mikrochromozomů. Ve většině figur v rané anafázi I (Obr. 23d - e) se chromozomy jednoho páru morfologicky poněkud liší, což se projevuje tím, že nepárují přesně svými centromerickými oblastmi. Výsledky

Pár č.	Průměrná relativní délka páru	Průměrný centromerický index	Morfolog. typ
1	11,92	1,14	M
2	9,98	1,86	SM
3	8,34	1,4	M
4	8,16	1,19	M
5	7,28	1,21	M
6	7,16	1,34	M
7	6,96	1,35	M
8	7,12	1,49	M
9	6,68	1,24	M
10	5,14	1,25	M
11	5,02	1,23	M
12	4,98	1,42	M
13	4,88	2,1	SM
14	3,94	1,19	M
15	1,42	1,52	M

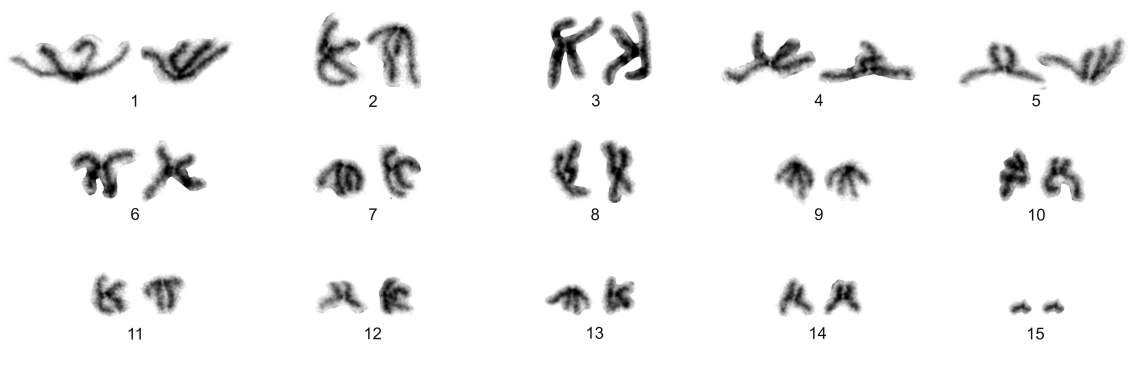
statistického vyhodnocení tří figur rané anafáze I však průkazný rozdíl v morfologii obou chromozomů neukazují. Potvrzení morfologické odlišnosti obou chromozomů by patrně vyžadovalo proměření více figur. V meióze převažují bivalenty se dvěma chiazmaty (průměrně 10 bivalentů na figuru) (Obr. 22a). U 7 figur ze 17 hodnocených byl nalezen rovněž jeden bivalent se třemi chiazmaty, v jedné figurě byly nalezeny dokonce dva takové bivalenty. Bivalenty se dvěma chiazmaty mají často jedno chiazma v pericentromerické oblasti. Časté jsou také interkalární chiazmata; distální a subdistální chiazmata jsou vzácná. U bivalentů se třemi chiazmaty bývají dvě interkalární a jedno distální (Obr. 22a).

Karyotyp samce druhu *P. orientalis* se skládá ze 64 chromozomů. Počet chromozomů byl stanoven na základě počtu bivalentů (Obr. 22e), pozorované metafáze II nebyly dostatečně kvalitní pro sestavení karyogramu. Přesto je patrné že v karyotypu převažují akrocentrické chromozomy (Obr. 22f). V profázi I převažují sice bivalenty s jedním chiazmatem, velký je ale také podíl bivalentů se dvěma chiazmaty. Průměrně se

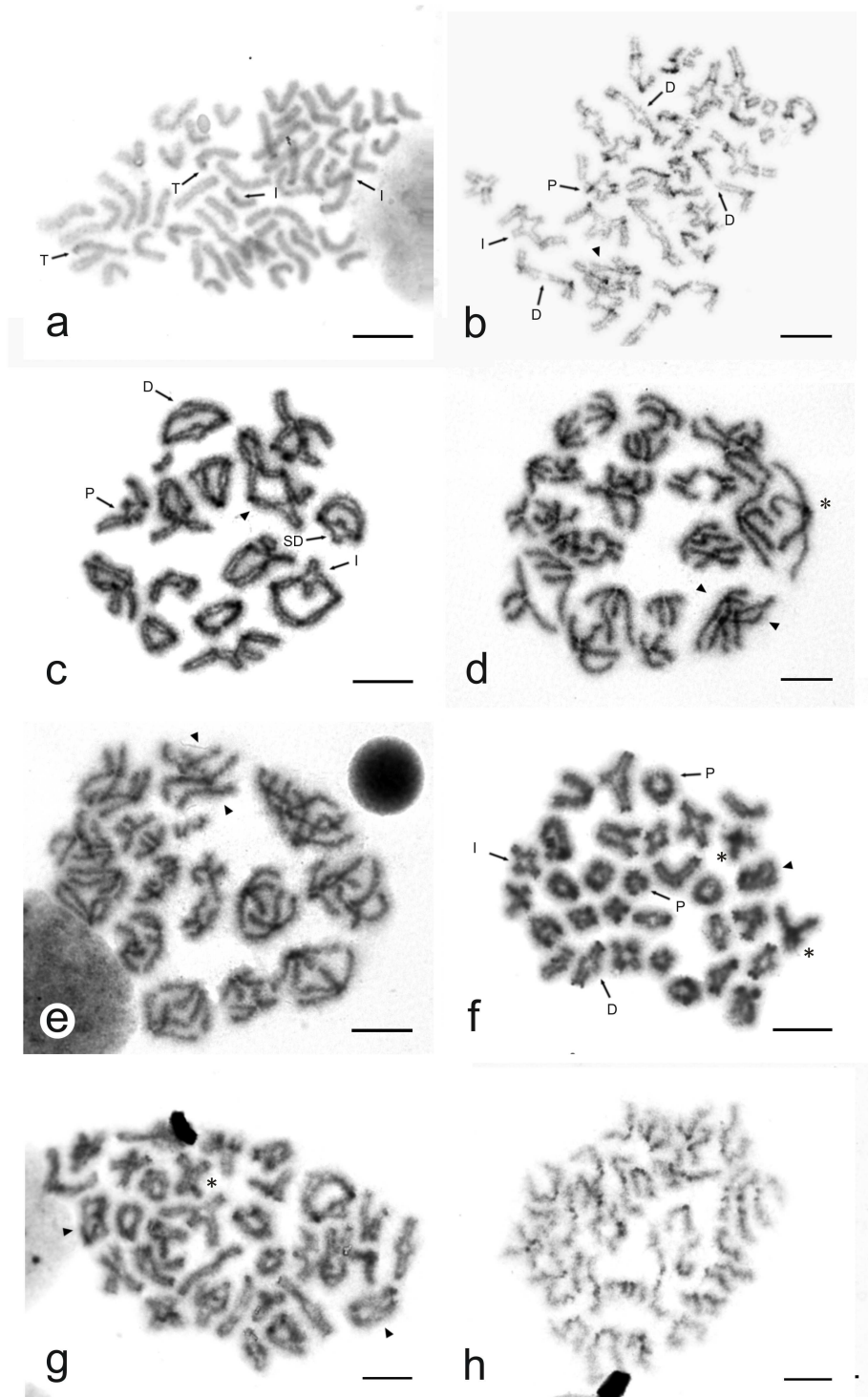
vyskytovalo 11 bivalentů se dvěma chiazmaty na figuru (u 10 zkoumaných figur). Jeden až dva takové bivalenty tvořily dvě distální chiazmata blízko sebe. Ve dvou figurách byl pozorován i bivalent se třema chiazmaty a v jedné dokonce dva takové bivalenty. Většinou jsou chiazmata umístěna distálně nebo interkalárně, výjimečně se objevují chiazmata proximální.



Obr. 21: *Phrynichus ceylonicus* – karyogram samce. Sestaveno ze sesterských metafází II. Měřítka - 10 μ m.



Obr. 22: *Phrynichus dhofarensis* – karyogram samce. Sestaveno ze sesterských metafází II. Měřítka - 10 μ m.



Obr. 23: *Phrynichus* – analýza karyotypu a meiotického dělení.

a,b *P. ceylonicus*. **a** mitotická metafáze; šípky ukazují na větší bloky konstitutivního heterochromatinu (I - interkalární heterochromatin, T - terminální heterochromatin).

b diplotene – široká šipka ukazuje na bivalent se dvěma chiazmaty; obyčejné šípky ukazují polohu některých chiazmat. **c-e** *P. dhofarensis*. **c** diplotene - široká šipka ukazuje na bivalent se třemi chiazmaty; obyčejné šípky ukazují polohu některých chiazmat.

d,e počátek anafáze I – široká šipka ukazuje na pár jehož chromozomy se poněkud liší morfologií. Hvězdička na obrázku d označuje pár chromozomů, jejichž rozdíly ve velikosti jsou způsobené deformací. **f-h** *P. orientalis*. **f,g** diakineze – široké šípky ukazují na bivalenty se třemi chiazmaty; hvězdičky - bivalenty se dvěma přilehlými chiazmaty; obyčejné šípky ukazují polohu některých chiazmat. **h** metafáze II; je patrná převaha jednoramenných chromozomů. Poloha chiazmat: D – distální, I – interkalární, P – proximální, SD – subdistální. Měřítko - 10 μ m.

4.2 Karyotypy uropygidních bičovců

Thelyphonidae (Lucas, 1835)

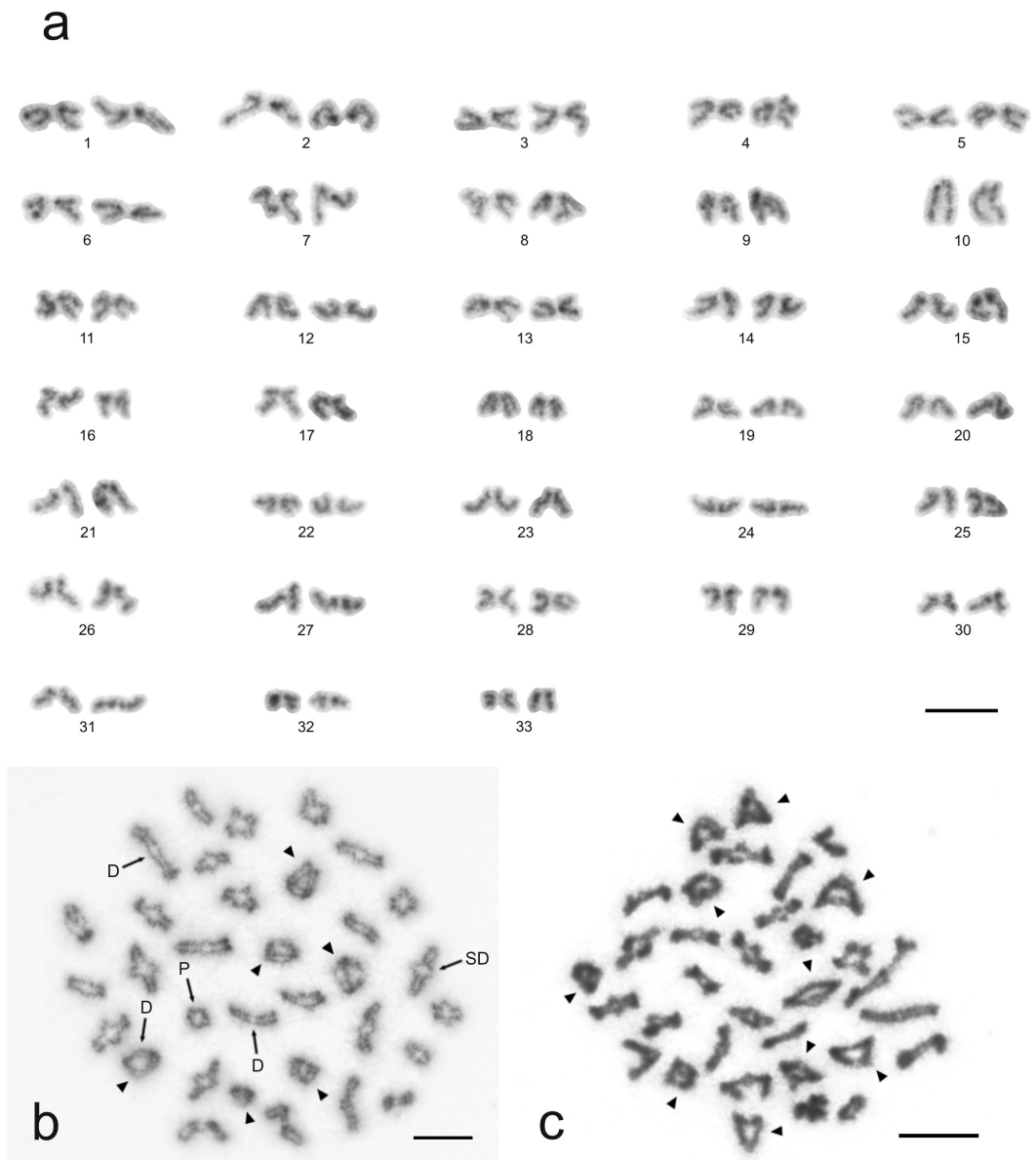
Hypoctoninae (Pocock, 1899a)

***Hypoctonus cf. gastrostictus* (Kraepelin, 1897a)**

Karyotyp samce je tvořen 66 chromozomy (Obr. 24a). Převažují chromozomy dvouramenné (15 párů metacentrických a 13 párů submetacentrických). V karyotypu se nachází pouze 5 párů subtelocentrických chromozomů (páry č. 2, 10, 15, 21, 30) a žádný akrocentrický pár. Velikost chromozomů v karyotypu klesá plynule, poslední pár je znatelně menší (Obr. 24, tab. 14). V profázi I tvoří bivalenty většinou jedno chiazma (23b, 23c). Počet bivalentů se dvěma chiazmaty se pohybuje v širokém rozmezí (4-12), průměrně je ve figurách 9 takových bivalentů (hodnoceno celkem 11 figur). Chiazmata jsou často distální. Bivalenty tvořené menšími chromozomy mají však chiazmata proximální.

Tabulka 14: Charakteristika karyotypu
Hypoctonus cf. gastrostictus

Pár č.	Průměrná relativní délka páru	Průměrný centromerický index	Morfolog. typ
1	4,12	1,62	M
2	3,94	3,09	ST
3	3,78	1,26	M
4	3,78	1,57	M
5	3,78	1,16	M
6	3,74	1,51	M
7	3,7	2,14	SM
8	3,52	1,19	M
9	3,5	1,84	SM
10	3,48	4,34	ST
11	3,46	1,19	M
12	3,4	1,81	SM
13	3,38	1,16	M
14	3,26	1,51	M
15	3,14	3,62	ST
16	3,08	1,82	SM
17	3,06	2,49	SM
18	3,04	1,17	M
19	2,94	2,07	SM
20	2,76	2,73	SM
21	2,72	4,15	ST
22	2,66	1,50	M
23	2,62	2,99	SM
24	2,56	2,50	SM
25	2,54	1,86	SM
26	2,54	1,79	SM
27	2,44	2,64	SM
28	2,42	1,25	M
29	2,38	1,24	M
30	2,32	3,89	ST
31	2,16	2,31	SM
32	2,12	1,54	M
33	1,62	1,52	M



Obr. 24: *Hypoctonus cf. gastrostictus* – karyogram samce a analýza meiózy. **a** karyogram; sestaveno ze sesterských metafází II. **b** Měřítka - 10 μ m. **b,c** diplotene – široké šipky ukazují na bivalenty se dvěma chiazmaty; obyčejné šipky ukazují polohu některých chiazmat. Poloha: D – distální, SD – subdistální. Měřítka - 10 μ m.

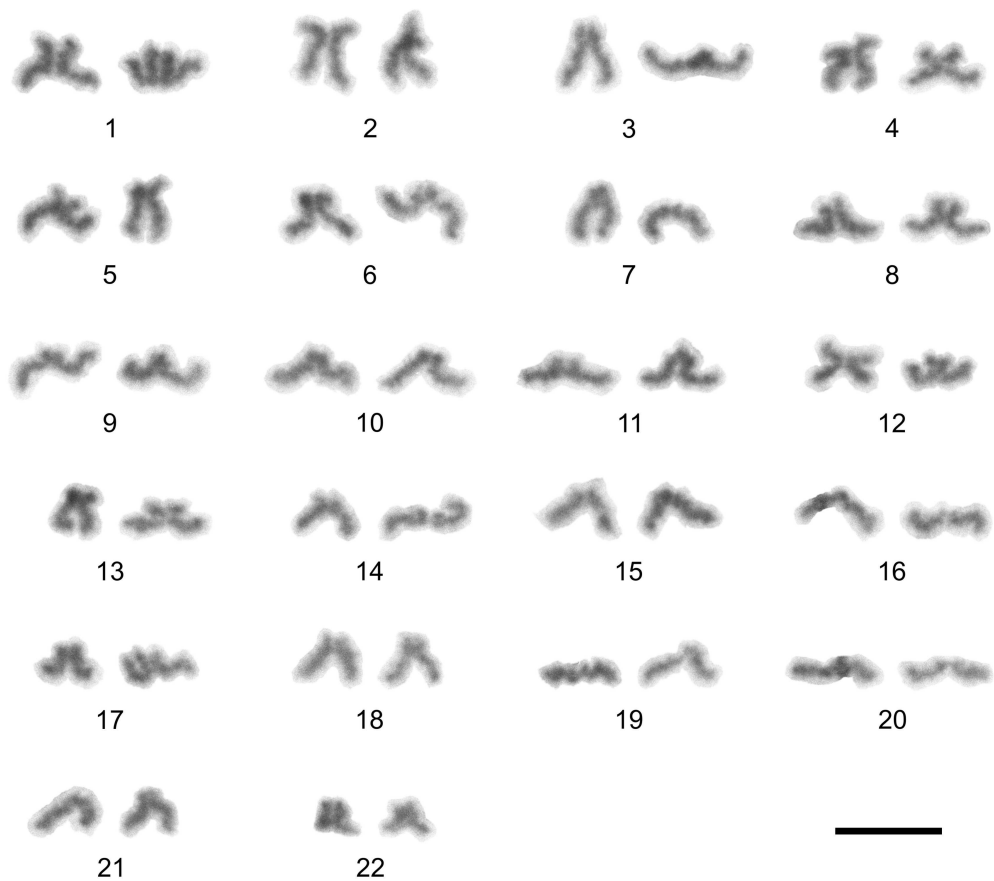
Thelyphoninae (Lucas, 1973)

Ginosigma schimkewitschi (Tarnani 1894)

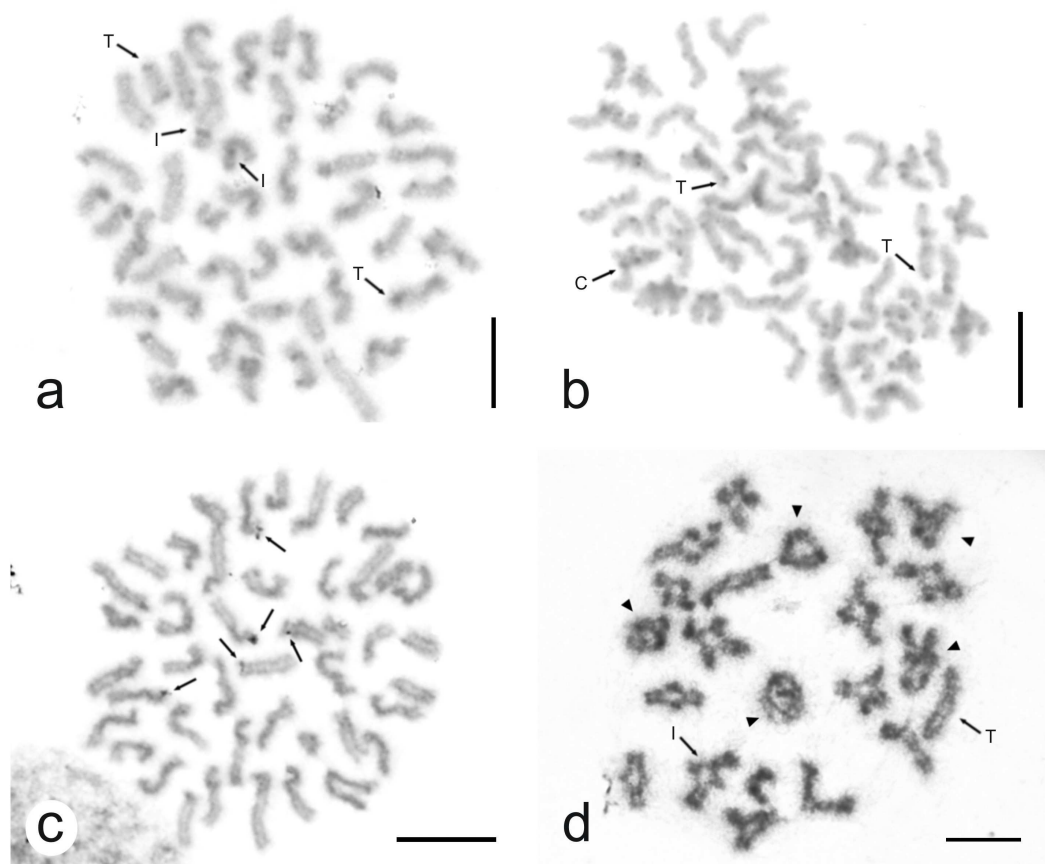
Karyotyp samce je tvořen 44 chromozomy (Obr. 25), mírně převažují chromozomy dvouramenné. V karyotypu se nachází 5 párů metacentriků, 8 párů submetacentriků, 7 párů subtelocentriků a pouze 2 páry (č. 16 a 20) akrocentriků (Tab. 15). Velikost chromozomů v karyotypu je značně vyrovnaná, pouze poslední pár je znatelně menší než předposlední. Metoda C – pruhování ukázala, že karyotyp obsahuje jen malé množství konstitutivního heterochromatinu (Obr. 26a - b). Konstitutivní heterochromatin se vyskytuje především v centromerických oblastech, méně

Pár č.	Průměrná relativní délka páru	Průměrný centromerický index	Morfolog. typ
1	5,84	1,25	M
2	5,78	2,38	SM
3	5,46	4,34	ST
4	5,18	1,49	M
5	5,1	2,03	SM
6	4,88	3	SM
7	4,70	3,37	ST
8	4,7	1,41	M
9	4,68	4,11	ST
10	4,62	3,02	ST
11	4,6	2,55	SM
12	4,44	1,39	M
13	4,32	2,26	SM
14	4,28	2,86	SM
15	4,26	4,92	ST
16	4,06	95,6	A
17	4,04	2,27	SM
18	4,02	2,65	SM
19	3,92	5,66	ST
20	3,9	95,67	A
21	3,8	4,33	ST
22	3,44	1,5	M

v terminálních částech chromozomů. Detekce NOR pomocí dusičnanu stříbrného odhalila 3 páry větších chromozomů s nukleolárními organizátory (Obr. 26c). NOR se nacházejí v terminálních částech chromozomů. Morfologie těchto chromozomů není zcela zřejmá, u uropygidů nejsou stejně jako u amblypygidů vyznačeny zřetelně primární konstriktce na mitotických chromozomech. V profázi I převažují bivalenty s jedním chiazmatem (Obr. 26d). Počet bivalentů se dvěma chiazmaty je poměrně konstantní (celkem bylo hodnoceno 10 figur). Pohybuje se v rozmezí 3 – 5 bivalentů, přičemž průměrně se vyskytují 4 bivalenty se dvěma chiazmaty na figuru. Poloha chiazmat je nejčastěji terminální nebo interkalární.



Obr. 25: *Ginosigma schimkewitschi* – karyogram samce. Sestaveno ze sesterských metafází II. Měřítka - 10 μ m.



Obr. 26 *Ginosigma schimkewitschi* – analýza karyotypu a meiózy.

a,b C-pruhované figury (a - mitotické metafáze, b - metafáze II); šipky ukazují na větší bloky konstitutivního heterochromatinu (I - interkalární heterochromatin, T - terminální heterochromatin). **c** mitotická metafáze, detekce NOR dusičnanem stříbrným. Šipky - NOR. **d** diplotene – široké šipky ukazují na bivalenty se dvěma chiazmaty; obyčejné šipky ukazují polohu chiazmat na některých bivalentech. Poloha chiazmat: I = interkalární, T = terminální; šipky - Měřítko - 10 μ m.

Typopeltinae (Rowland & Cook 1973)

Typopeltis (Pocock 1984a)

V rámci tohoto rodu jsem prostudoval druhy *T. crucifer* (Pocock, 1894a) a *T. guangxiensis* (Haupt a Song 1996). U druhu *T. crucifer* jsem měl k dispozici pouze preparáty z adultní samičky, které poskytly dobře rozprostřené mitotické metafáze vhodné pro stanovení diploidního počtu. Karyotyp samičky je tedy tvořen 40 chromozomy (Obr. 28a). Morfologie chromozomů je vzhledem ke

špatnému vyznačení primárních konstrikcí špatně patrná.

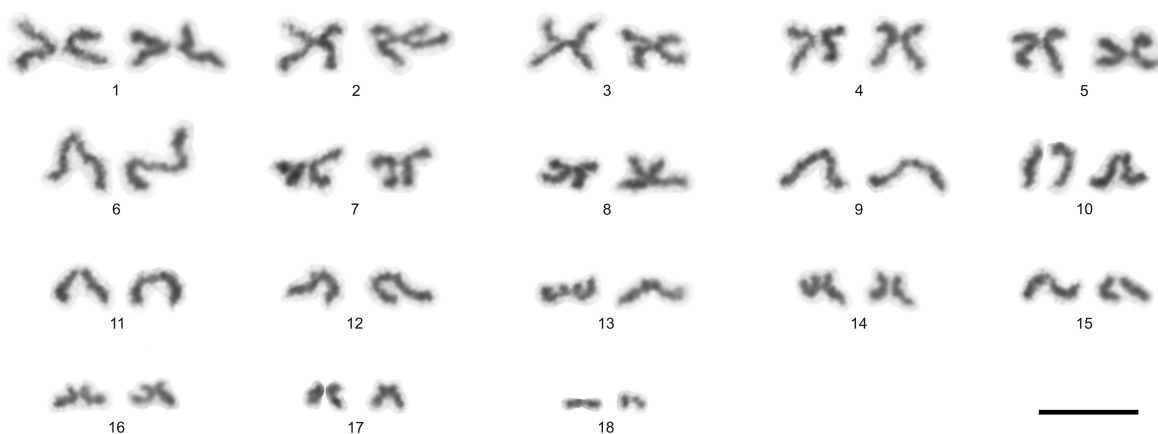
Karyotyp samce druhu *T. guangxiensis* je tvořen 36 chromozomy (Obr. 27), jedná se o nejnižší dosud objevený diploidní počet u uropygidních bičovců. V karyotypu se nachází 7 párů metacentriků, 3 páry submetacentriků (páry č. 14, 16 a 17), 1 pár subtelocentricků (nejmenší 18. pár) a 7 párů akrocentriků (Tab. 16). Velikost chromozomů v karyotypu klesá plynule kromě posledního páru který je znatelně menší než předposlední (Tab. 16, Obr. 27). Poslední pár se svou velikostí přibližuje velikosti mikrochromozomů. C – pruhování ukázalo,

Pár č.	Průměrná relativní délka páru	Průměrný centromerický index	Morfolog. typ
1	8,9	1,22	M
2	7,76	1,29	M
3	7,38	1,25	M
4	7,02	1,35	M
5	6,92	1,28	M
6	6,74	44,23	A
7	6,56	1,25	M
8	6,14	1,28	M
9	5,52	113,21	A
10	5,5	24,56	A
11	5	76,31	A
12	4,8	76,89	A
13	4,48	13,45	A
14	4,38	1,95	SM
15	4,28	63,16	A
16	3,66	2,34	SM
17	3,28	1,60	SM
18	2,02	4,08	ST

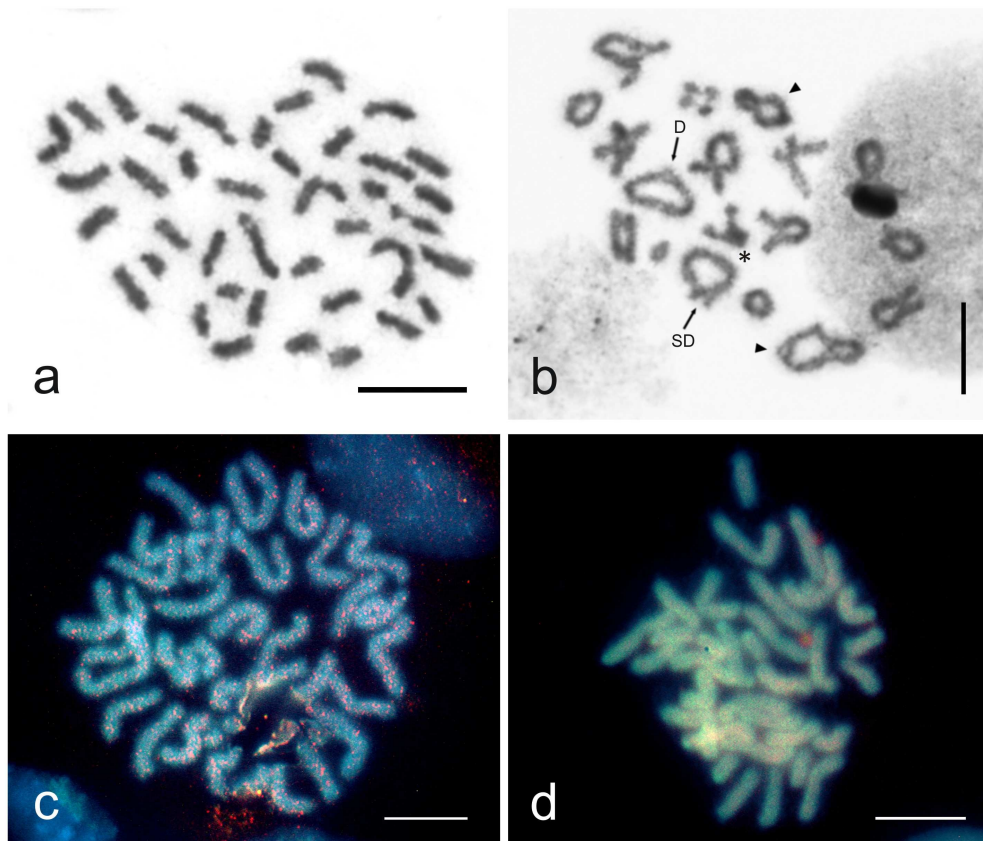
že karyotyp tohoto druhu obsahuje jen nepatrné množství konstitutivního heterochromatinu (obr. 29a). Výrazný terminální blok byl nalezen pouze na jednom chromozomu, některé chromozomy mají drobný blok pericentromerického heterochromatinu. Pomocí dusičnanu stříbrného byly detegovány NOR na 3 párech chromozomů (Obr. 29b – f). Morfologie párů, na kterých leží NOR nebyla úplně jednoznačná. Zdá se ale, že se jedná o dva větší metacentrické a jeden malý akrocentrický pár. Pozice NOR u akrocentrického páru je nejčastěji terminální u jednoho chromozomu a subterminální u druhého chromozomu. Pozice NOR na jednom metacentrickém páru je interkalární, často je signál patrný pouze na jedné chromatidě (Obr. 29b). U druhého páru metacentrických chromozomů je pozice NOR nejčastěji terminální. U tohoto druhu jsem měl k dispozici velké množství kvalitních figur s vizualizovanými NOR, mohl jsem proto vyhodnotit i variabilitu exprese NOR. U nejmenšího páru byly někdy oba signály subterminální (Obr. 29f). U páru s interkalárními NOR se signál vytvářel na jedné nebo obou chromatidách. U metacentrického

páru s terminálními NOR byla poloha signálu někdy i subterminální (Obr. 29e). V difúzním stádiu bylo nalezeno až šest jadérek, což odpovídá třem párům NOR (Obr. 29g). Metoda stříbření zvýrazňovala u tohoto druhu i kinetochory, zejména v metafázi II a diplotene. (Obr. 29h). Vzhledem ke zvýraznění kinetochorů v profázi I bylo možno stanovit polohu centromer na bivalentech a určit tak přesně polohu chiazmat.

Meióza je pozoruhodná vysokou frekvencí chiazmat, převažují bivalenty se dvěma chiazmaty (Obr. 29h, 28b). Průměrný počet bivalentů se dvěma chiazmaty byl 11 na figuru, přičemž počet kolísal v rozmezí 8 – 15 (celkem bylo prostudováno 23 figur). V pěti figurách byl nalezen také bivalent se třemi chiazmaty (Obr. 29h), v dalších dvou figurách dokonce dva bivalenty se třemi chiazmaty (28b). Poloha chiazmat je u většiny bivalentů distální popř. subdistální. Jeden bivalent pravidelně tvoří dvě distální chiazmata blízko u sebe (Obr. 29h). U tohoto druhu byla jako zatím u jediného druhu uropygida provedena CGH (Obr. 28c – d). Nebyl zjištěn žádný úsek specifický pro samčí nebo samičí pohlaví, výsledky tedy naznačují nepřítomnost pohlavních chromozomů.

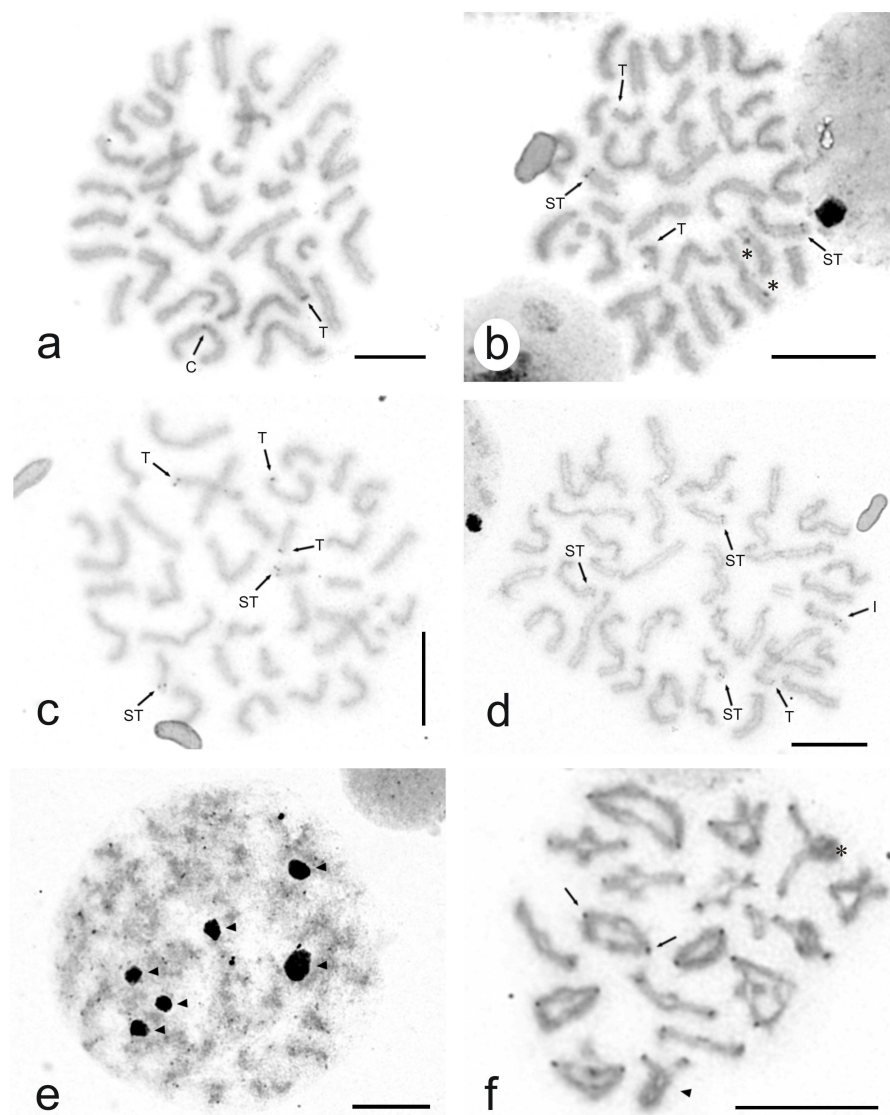


Obr. 27: *Typopeltis guangxiensis* – karyogram samce. Sestaveno ze sesterských metafází II. Měřítko - 10 μ m



Obr. 28: Rod *Typopeltis* – analýza karyotypu a meiózy.

a *T. crucifer*; mitotická metafáze samičky. **b-d** *T. guangxiensis* **b** diplotene; široké šipky ukazují na bivalenty se třemi chiazmaty; obyčejné šipky ukazují na polohu chiazmat některých bivalentů. Poloha: D = distální, SD = subdistální; šipka ukazuje na bivalent se dvěma chiazmaty blízko u sebe. **c** mitotická metafáze samce, CGH – není patrný žádný specifický signál. **d** mitotická metafáze samičky, CGH – není patrný žádný specifický signál. Měřítko - 10 μ m.



Obr. 29: *Typopeltis guangxiensis* – analýza karyotypu a meiózy.

a C- pruhovaná mitotická metafáze – šipky ukazují na ojedinělé větší bloky konstitutivního heterochromatinu (C - centromerický heterochromatin, T - terminální heterochromatin). **b - f** detekce NOR pomocí dusičnanu stříbrného. **b-d** mitotická metafáze. Šipky – NOR (ST = subterminální poloha, I = interkalární poloha NOR); hvězdička označuje NOR detekovaný pouze na jedné chromatidě. **e** difúzní stádium – široké šipky směřují na jádérka. **f** diplotene – obyčejné šipky ukazují na obarvené kinetochory, široká šipka ukazuje na bivalent se třemi chiazmaty (poloha chiazmat je interkalární a distální). Hvězdička označuje bivalent se dvěma chiazmaty blízko u sebe. Měřítka - 10 μ m.

5.2. Počet a distribuce rekombinací v genomu

V Tab. 17 jsou shrnuty údaje o počtech chiazmat u zkoumaných druhů. Poloha chiazmat byla u pulvilátních amblypygidů převážně proximální a interkalární, zatímco u apulvilátních amblypygidů a také uropygidů převažovala chiazmata interkalární a distální.

Druh	2n	Frekvence chiazmat/bivalen t	Počet sledovaných figur
Amblypygi			
<i>Phrynichus dhofarensis</i>	30	1,74	17
<i>Phrynichus orientalis</i>	64	1,39	10
<i>Phrynus whitei</i>	46	1,34	17
<i>Paraphrynus mexicanus</i>	24	1,29	14
<i>Charon grayi</i>	70	1,27	13
<i>Euphrynichus bacilifer</i>	56	1,15	9
<i>Damon medius</i>	72	1,14	9
<i>Heterophrynus cheiracanthus</i>	76	1,13	13
<i>Sarax brachydactylus</i>	50	1,12	10
<i>Paraphrynus aztecus</i>	36	1,1	12
<i>Acantophrynus coronatus</i>	86	1,09	10
<i>Phrynichus ceylonicus</i>	52	1,08	16
<i>Damon medius</i>	70	1,06	8
<i>Charinus neocaledonicus</i>	74	1,02	10
Uropygi			
<i>Typopeltis guangxiensis</i>	36	1,66	23
<i>Ginosigma schimkewitschi</i>	44	1,19	10
<i>Hypoctonus gastrostictus</i>	66	1,13	13

Tab. 17: Frekvence chiazmat v karyotypu zkoumaných amblypygidních a uropygidních bičovců.

5. Diskuze

5.1 Počty a morfologie chromozomů u amblypygidních a uropygidních bičovců

Chromozomy pavoukoců (Arachnida) jsou dosud relativně málo prozkoumány, karyotypy některých řádů nebyly dosud vůbec studovány. To platí i pro řády amblypygidních a uropygidních bičovců. Dosud byl popsán pouze karyotyp jednoho druhu amblypygidního (Millot & Tuzet 1934) a jednoho druhu uropygidního bičovce (Kasturi Bai & Parthasarathy 1957) (Tab. 18). Ve své práci jsem popsal karyotypy 16 druhů amblypygidních a 4 druhů uropygidních bičovců. U amblypygidních bičovců jsem prostudoval zástupce všech čeledí s výjimkou čeledi Paracharontidae, přičemž jsem měl k dispozici zástupce většiny rodů (10 z celkového počtu 17). U americké čeledi Phrynidae byli analyzováni zástupci všech rodů. U řádu uropygidních bičovců s jedinou známou čeledí byli popsáni 4 zástupci, kteří patří do tří z pěti podčeledí. Kromě výsledků získaných v této diplomové práci byly pro rekonstrukci karyotypové evoluce těchto řádů použity i údaje o karyotypech dalších druhů, které získali paralelně členové naší laboratoře a Dr. F. Šťáhlavský z katedry zoologie. Výčet všech druhů včetně základních karyotypových údajů uvádí tabulka 18.

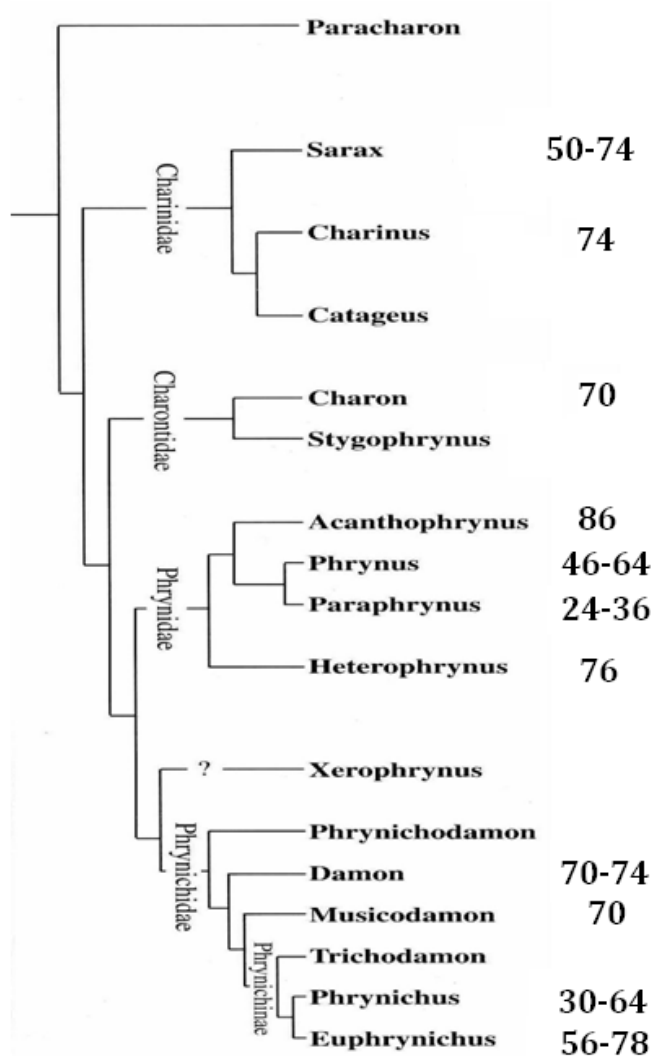
Jak je patrné z tabulky č. 18, u obou zkoumaných řádů bičovců je značná variabilita diploidních počtů chromozomů (24 – 86 u amblypygidů a 36 – 78 u uropygidů). U amblypygidních bičovců je variabilita vysoká i v rámci jednotlivých čeledí, nejvíce u čeledí Phrynidae (24 - 86) a Phrynichidae (30 – 78). Výsledky ukazují značnou variabilitu počtu chromozomů i na úrovni amblypygidních rodů (*Phrynus* 45 – 64; *Euphrynichus* 56 – 78, *Phrynichus* 30 – 64). U druhu *Damon medius* byla variabilita v počtu chromozomů nalezena dokonce i na úrovni druhu (70-72). Velké rozpětí v počtu chromozomů bylo u pavoukoců nalezeno také u jiných řádů, a to pavouků ($2n = 7 - 128$)

(Suzuki 1954, Dulíková & Král 2007), štírů ($2n = 6 - 175$) (Schneider *et al.* 2009b), sekáčů (10 – 109) (Tsurusaki 2007) a štírků (10 – 74) (Šťáhlavský 2006).

Čeď	Rod, druh	2n	Počet párů autozomů				Pohlavní chromoz.		Počet ramen
			M	SM	ST	A	Morfol. difer.	Molekul. difer.	
Charinidae	<i>Charinus australianus</i>	74							96 82
	<i>C. neocaledonicus*</i>	74	9	2	2	24			
	<i>Sarax brachydactylus</i>	50	14	2	4	5			
	<i>S. sp.</i>	74							
	<i>S. sarawakensis**</i>						X0		
Charontidae	<i>Charon grayi</i> (Inodonézie)	70	3	8	11	13			92
	(Filipíny)	70	7	8	8	12			100
Phrynidae	<i>Acantophrynus coronatus</i>	86	19	8	8	8			140
	<i>Heterophrynus cheiracanthus</i>	76							
	<i>Paraphrynus azteca</i>	36	14	4	0	0			72
	<i>P. mexicanus</i>	24	9	2	0	0		XY(M,M)	44
	<i>Phrynus cf. marginemaculatus</i>	64	14	4	4	10			100
	<i>P. whitei</i>	46	20	3	0	0			92
Phrynichidae	<i>Euphrynichus amanica</i>	78							
	<i>E. bacilifer</i>	56	25	1	0	2			108
	<i>Damon diadema</i>	74							
	<i>D. medius</i> (Senegal)*	70	16	8	10	1			118
	(Togo)	72	9	7	9	11			104
	<i>Musicodamon atlanteus</i>	70	9	8	9	9			104
	<i>Phrynichus ceylonicus</i>	52	22	4	0	0			104
	<i>P. deflersi arabicus</i>	30	10	3	0	1	XY(M,SM)		62
	<i>P. dhofarensis</i>	30	12	2	0	0	XY?		62
<i>P. orientalis</i>	64								
Thelyphonidae									
Hypoctoninae	<i>Hypoctonus cf. gastrostictus</i>	66	15	13	5	0			122
	<i>H. siamensis</i>	54	10	7	1	9			88
	<i>Labochirus proboscideus</i>	78	7	5	8	19			102
Thelyphoninae	<i>Thelyphonus sepiaris***</i>	44				21	XY		
	<i>T. cf. linganus</i>	66					XY		
	<i>Ginosigma schimkewitschi</i>	44	5	8	7	2			70
Typopeltinae	<i>Typopeltis crucifer</i>	40							
	<i>T. guangxiensis</i>	36	7	3	1	7			56

Tabulka 18: Seznam karyotypovaných druhů a základní údaje o jejich karyotypech. Zvýrazněno – druhy resp. populace karyotypované v diplomové práci. Údaje o dalších druzích byly publikovány jinými autory popř. se jedná o nepublikovaná data poskytnutá členy naší laboratoře a dr. F. Šťáhlavským z katedry zoologie. * druhy analyzované zčásti již v bakalářské práci (Sember, 2007), ** Milot & Tuzet 1934, *** Kasturi Bai & Parthasarathy (1957)

U bazálních čeledí amblypygidních bičovců (Charinidae a Charontidae) jsou karyotypy většinou tvořeny vysokým diploidním počtem chromozomů ($2n = 70 - 74$)



s převahou jednoramenných chromozomů. U rodu *Sarax* tomuto trendu neodpovídá jeden ze dvou dosud karyotypovaných druhů (*S. brachydactylus*), u něhož byl nalezen nižší diploidní počet ($2n = 50$) a převažují naopak metacentrické chromozomy. U odvozenějších čeledí amblypygidů (Phryniidae a Phrynichidae) je rovněž patrné, že druhy s nižším diploidním počtem chromozomů vykazují vyšší zastoupení dvouramenných chromozomů oproti druhům, které mají vyšší diploidní počet. Po vynesení údajů o počtu chromozomů do kladogramu amblypygidů (Tab. 18)

Obr. 30: Systematické členění řádu Amblypygi s dosazenými diploidními počty analyzovaných rodů. Převzato z Weygoldt 2000 a upraveno

a porovnání morfologie chromozomů se jeví jako nejpravděpodobnější, že výchozí karyotyp amblypygidních bičovců byl tvořen vysokým diploidním počtem ($2n = 74- 86$) a měl převahu jednoramenných chromozomů. Evoluce amblypygidních bičovců byla zřejmě doprovázena snižováním počtu chromozomů a zvyšováním počtu dvouramenných chromozomů, což podporuje značné zastoupení dvouramenných chromozomů u většiny amblypygidů s nižším diploidním počtem. Redukce diploidního počtu je předpokládána i v karyotypové evoluci pavouků (Suzuki 1954), kteří jsou některými autory považováni za sesterskou skupinu amblypygidů (Weygoldt a Paulus 1979). Pokles počtu chromozomů se projevuje v karyotypové evoluci i u řady jiných skupin živočichů (White 1973). Naopak např. u sekáčů jsou za ancestrální považovány nižší diploidní počty (Schneider *et al.* 2009). U pavouků nasvědčuje hypotéze o snižování diploidního počtu vysoký počet chromozomů u bazálních pavouků (podřád Mesothelae) a nově i výsledky studia infrařádu Mygalomorphae (Dulíková & Král 2007, Dulíková 2009). V ancestrálním karyotypu pavouků pravděpodobně převažovaly také jednoramenné chromozomy jak ukazují karyotypy nejbazálnějších pavouků - sklípkošů (J. Král & T. Kořínková, osobní sdělení).

Zvyšování počtu dvouramenných chromozomů v karyotypové evoluci amblypygidů je možno vysvětlit působením centrických fúzí. Tuto hypotézu podporují některé nálezy. Centrickou fúzí se dá vysvětlit například vznik dvojitého bloku heterochromatinu u metacentrického páru bazálního amblypygida *Charinus neocaledonicus*. Výsledky fluorescenčního pruhování ukázaly, že dvojitý blok heterochromatinu v oblasti centromery je heterogenní co do obsahu bází. Jeden blok je GC-bohatý a druhý AT-bohatý. Tento výsledek nasvědčuje hypotéze, že daný chromozom vznikl centrickou fúzí dvou různých akrocentrických chromozomů, přičemž

centromera jednoho z nich byla AT-bohatá a centromera druhého GC-bohatá. Takové chromozomové páry se v karyotypu *C. neocaledonicus* vyskytují. Účast centrických fúzí na evoluci karyotypů je předpokládána i u jiných skupin pavoukovců, např. u entelegynních pavouků (Bole – Gowda, 1952; Hackman, 1948) nebo u štírků čeledi Chthoniidae (Šťáhlavský & Král, 2004), u nichž převažují také jednoramenné chromozomy. Působení centrických fúzí se projevuje u amblypygidů i na úrovni rodů. U rodu *Euphrynichus* (Phrynichidae) má *E. amanica* 78 chromozomů a zhruba vyrovnaný poměr jednoramenných a dvouramenných chromozomů. Naopak druh *E. bacilifer* má diploidní počet značně nižší ($2n=56$) a v jeho karyotypu se vyskytují pouze dva páry jednoramenných chromozomů. Dá se tedy opět předpokládat, že v karyotypové evoluci tohoto rodu docházelo k centrickým fúzím. Tuto hypotézu podporuje nález rozsáhlých centromer u některých chromozomů *E. amanica*, které se podobají nálezu u *C. neocaledonicus* a mohly tedy vzniknout fúzemi. U amblypygidů jsou totiž centromery jinak většinou drobné a cytologicky špatně detekovatelné. Velice zajímavé je srovnání druhu *Musicodamon atlanteus* ($2n = 70$) a jedince druhu *Damon medius* z Toga ($2n = 72$). Rody *Musicodamon* a *Damon* jsou navzájem blízce příbuzné. Porovnání zastoupení jednotlivých morfologických typů chromozomů v karyotypu ukazuje, že dva akrocentrické páry *D. medius* (Togo) mohly fúzovat za vzniku jedno submetacentrického páru u *M. atlanteus*. V rámci fylogenetického stromu se navíc rod *Musicodamon* jeví jako odvozenější vzhledem k rodu *Damon*.

Je zajímavé, že jedinci senegalské populace *D. medius* mají rozdílný karyotyp než jedinec z Toga. Je možné, že se v tomto případě jedná o kryptické druhy nebo chromozomové rasy. Senegalská populace má v karyotypu o dva chromozomy méně, má však mnohem více dvouramenných chromozomů než by odpovídalo snížení počtu

chromozomů o jeden pár. Tento náález naznačuje, že se v karyotypové evoluci amblypygidních bičovců uplatňovaly i chromozomové přestavby, které mění polohu centromery, ale nemění počet chromozomů jako např. pericentrické inverze. Je ovšem možné, že u jedince z Toga mohla být analýza do určité míry zkreslena použitím anafáze I pro sestavení karyotypu. Nespornou výhodou této fáze je snadná detekce homologických chromozomů, na druhou stranu jsou během anafáze I ramena rozcházejících se chromozomů často přitížena k sobě, takže se počet jednoramenných chromozomů může jevit větší než je ve skutečnosti. Na přítomnost pericentrických inverzí v karyotypové evoluci amblypygidů ovšem ukazují i jiné nálezy. Důsledkem pericentrické inverze může být pozice jednoho páru NOR téměř v pericentromerické oblasti u druhu *Phrynus whitei*. Nukleolární organizátory amblypygidů mají totiž jinak terminální nebo subterminální polohu (viz níže).

Dalšími přestavbami, které se mohly uplatňovat v karyotypové evoluci amblypygidů, jsou tandemové fúze. Působením těchto fúzí by bylo možno teoreticky vysvětlit přítomnost neobvyklých bivalentů v profázi I u *Charon grayi*, tedy u druhu s dosti vysokým diploidním počtem a převahou jednoramenných chromozomů. Jedná se konkrétně o bivalenty, jež jsou tvořeny jednoramennými chromozomy a mají dvě chiazmata blízko sebe. Tyto bivalenty se vyskytovaly u *Charon grayi* s poměrně vysokou frekvencí. To je pro bivalenty tvořené jednoramennými chromozomy dosti neobvyklé, tyto bivalenty mají většinou jediné chiazma (John 1990). Zvláštní bivalenty mohou být důsledkem tandemových fúzí - ve fúzovaných chromozomech mohou být pro rekombinaci preferována stejná místa jako před fúzí (White 1973).

U apulvilátních amblypygidních bičovců (čeledi Phrynidae a Phrynichidae) lze u zástupců s nejvyšším počtem chromozomů pozorovat vyšší zastoupení

dvouramenných chromozomů než je tomu u pulvilátních amblypygidů (čeledi Charinidae a Charontidae) s vysokými počty. Jedná se o druhy *Acantophrynus coronatus* ($2n = 86$), *Heterophrynus cheiracanthus* ($2n = 76$) a *Euphrynichus amanica* (78). Pokud vyjdeme z hypotézy o vysokém ancestrálním diploidním počtu u amblypygidů, mohlo by to znamenat, že ancestrální karyotyp apulvilátních amblypygidů byl tvořen vyrovnanějším poměrem jednoramenných a dvouramenných chromozomů oproti pulvilátním amblypygidům. Dá se tedy předpokládat, že se evoluce karyotypu u těchto dvou čeledí odvíjela trochu jiným způsobem než u bazálních čeledí Charinidae a Charontidae.

U druhu *Acantophrynus coronatus* s nejvyšším nalezeným diploidním počtem u amblypygidů dokonce dvouramenné chromozomy v karyotypu převažují. Vzhledem k malé velikosti chromozomů v karyotypu *A. coronatus*, přítomnosti interkalárních bloků heterochromatinu na některých chromozomech a malé četnosti bivalentů se dvěma chiazmaty (u dvouramenných chromozomů jsou bivalenty s více chiazmaty běžnější než u jednoramenných chromozomů) se domnívám, že v evoluci karyotypu tohoto druhu mohlo docházet k pericentrickým inverzím za vzniku malých metacentrických chromozomů. Této hypotéze by odpovídala i neobvykle vysoká hodnota celkového počtu ramen v karyotypu *A. coronatus* (140) (Tab. 18) oproti ostatním zkoumaným druhům.

Pericentrické inverze produkující jednoramenné chromozomy se mohly uplatňovat při vzniku karyotypu amblypygida *Phrynichus orientalis* ($2n = 64$). Na rozdíl od příbuzného druhu *P. ceylonicus* ($2n=52$, pouze dvouramenné chromozomy) převažují u tohoto druhu jednoramenné chromozomy. Vzhledem k tomu, že mezi oběma druhy není příliš velký rozdíl v diploidním počtu, nedala by se tak dramatická změna

v morfologii chromozomů vysvětlit centrickými fúzemi nebo rozpadem dvouramenných chromozomů na jednoramenné. Je spíše pravděpodobné, že karyotyp *P. orientalis* vznikl sekundárně za přispění pericentrických inverzí. Této hypotéze by napovídala značná velikost jednoramenných chromozomů u tohoto druhu. Jednoramenné chromozomy u *P. orientalis* tvoří navíc v profázi I velký počet bivalentů se dvěma, vzácně i se třemi chiazmaty. Toto pozorování je v rozporu s obecně pozorovanými trendy (John 1990), kdy jednoramenné chromozomy tvoří většinou menší počet chiazmat, obvykle jedno. Frekvence bivalentů se dvěma chiazmaty je ale v tomto případě podobná jako u druhů s převahou dvouramenných chromozomů v karyotypu. Tvorba akrocentrických bivalentů se dvěma chiazmaty by ovšem mohla být také důsledkem značné velikosti jednoramenných chromozomů. U malých chromozomů bude s větší pravděpodobností blokován vznik dalšího chiazmatu v důsledku interference chiazmat.

Také uropygidní bičovci vykazují velkou diverzitu v diploidních počtech chromozomů ($2n = 36 - 78$). U uropygidů ale dosud neexistuje spolehlivý kladogram prezentující vztahy jednotlivých podčeledí a rodů uropygidů, proto jsem získaná data nemohl zasadit do fylogenetického schématu tak jako u amblypygidů. Nejvyšší diploidní počet ($2n=78$) byl u uropygidů nalezen u druhu *Labochirus proboscideus* (J. Král, osobní sdělení) náležícího do podčeledi Hypoconinae, která se podle dosavadních údajů jeví jako jedna z možných bazálních větví (Rowland & Cook 1973). Ancestrální karyotyp uropygidů mohl být tedy tvořen vysokým počtem chromozomů stejně jako u amblypygidních bičovců. V karyotypové evoluci uropygidů se však zřejmě uplatňovaly jiné trendy než u amblypygidů. Druhy s nízkými diploidními počty nemají v karyotypu výraznou převahu dvouramenných chromozomů. Srovnání druhů *Hypoconus gastroctictus* a *H. siamensis* dokonce ukazuje vyšší počet jednoramenných chromozomů

(10 párů) u druhu *H. siamensis* s nižším diploidním počtem ($2n=54$). Karyotyp *H. siamensis* je zajímavý i z hlediska přítomnosti jednoho páru mikrochromozomů (J. Král, ústné sdělení).

Karyotypy uropygidních bičovců se zdají být v porovnání s amblypygidy více homogenní z hlediska morfologie chromozomů. To pravděpodobně souvisí s nižší diverzitou a vyšší uniformitou tohoto řádu. Získané výsledky neumožňují zatím další hypotézy o karyotypové evoluci tohoto řádu, také vzhledem k nižšímu počtu karyotypovaných druhů.

5.2 Distribuce heterochromatinu a nukleolárních organizátorů jadérka

V rámci práce byla popsána distribuce konstitutivního heterochromatinu u 4 druhů amblypygidních a 2 druhů uropygidních bičovců. U většiny studovaných druhů bylo nalezeno velmi malé množství konstitutivního heterochromatinu. U uropygida *Typopeltis guangxiensis* se na chromozomech dokonce nenacházel téměř žádný cytologicky detekovatelný konstitutivní heterochromatin. U druhů s malým množstvím heterochromatinu se jednalo nejčastěji o drobné bloky interkalárního heterochromatinu pravděpodobně v oblasti centromer, zřídka se vyskytovaly i terminální bloky. Podobná distribuce konstitutivního heterochromatinu jako u obou řádů bičovců byla nalezena i u většiny dosud studovaných pavouků. Koncentrace konstitutivního heterochromatinu do oblastí centromer je u pavouků považována za ancestrální znak (Rodríguez-Gil *et al.* 2007). Terminální bloky se u pavouků vyskytují méně často (Rowell 1985, Datta & Chatterjee 1988, Rowell 1991b, Araujo *et al.* 2005a) a interkalární heterochromatin je vzácný (Araujo *et al.* 2008). Podobnou distribuci vykazuje konstitutivní heterochromatin i u dosud studovaných sekáčů (Tsurusaki 2007), štírů (Shanahan 1989b, Schneider *et al.*

2009b) a štírenek (Král *et al.* 2008). U těchto řádů byl však dosud studován jen nepatrný zlomek druhů.

U některých amblypygidů s vysokým počtem chromozomů (*C. neocaledonicus*, *A. coronatus*) bylo naopak nalezeno relativně velké množství interkalárního a terminálního konstitutivního heterochromatinu. Interkalární heterochromatin často odpovídal polohám centromer, některé bloky se ale nacházely uvnitř ramen chromozomů. Je možné, že u druhu *A. coronatus* jsou některé interkalární bloky důsledkem chromozomových přestaveb, např. pericentrických inverzí (viz předchozí kapitola). Vysoký obsah konstitutivního heterochromatinu by mohl přispívat k nižšímu počtu rekombinací u tohoto druhu oproti jiným amblypygidům s převahou metacentrických chromozomů v karyotypu. U *C. neocaledonicus* již byla diskutována heterogenita tandemového bloku centromerického heterochromatinu u jednoho většího metacentrického páru. Fluorescenční pruhování zároveň odhalilo převahu GC - bohatého heterochromatinu u tohoto druhu. U amblypygida *Paraphrynus mexicanus* byly jako vedlejší výsledek aplikace CGH naopak vizualizovány AT-bohaté bloky v oblasti centromer u obou pohlaví. Je tedy možné, že u amblypygidních bičovců se vyskytují druhy s GC – bohatým i AT-bohatým heterochromatinem. U pavouků převažuje většinou AT – bohatý heterochromatin (Brum-Zorrilla & Postiglioni 1980; Gorlova *et al.* 1997, Araujo *et al.* 2005, 2008). O ostatních pavoukvcích není zatím v tomto směru nic známo. Zajímavým problémem je stavba dlouhých achromatických úseků u prvního páru chromozomů *P. aztecus*. Metody C – pruhování a stříbření dusičnanem stříbrným poskytly v daném úseku shodný pozitivní vzor. Z tohoto důvodu se domnívám, že je achromatický úsek tvořen argentofilním heterochromatinem. Tato vlastnost některých bloků konstitutivního heterochromatinu byla poprvé popsána u rostliny *Trillium* (Utsumi

a Takehisa 1974, Sumner 1990). Achromatická oblast na páru č. 1 nebyla tvořena rozsáhlou oblastí NOR jak jsem se domníval nejprve - tak jak je tomu např. u pavouka *Diplura cf. petrunkevitchi* (Dulíková 2009). Vzhledem k rozsáhlosti tohoto úseku heterochromatinu se nabízí možnost, že by se mohlo jednat o nadpočetný heterochromatin inkorporovaný do chromozomu (tzv. supernumerary segment) (White 1954, Shaw 1970, John 1981). Nadpočetné segmenty heterochromatinu byly nalezeny např. u některých sarančat (White 1954, Shaw 1970, Shaw 1971), kde vykazují velkou variabilitu ve velikosti mezi jedinci daného druhu. Byl prokázán vliv těchto segmentů na počet chiazmat v profázi I (John a Hewitt 1965, 1966, Jones a Rees, 1967). Tento údaj je zajímavý vzhledem k tomu, že jsem u *P. aztecus* objevil neobvykle malý počet bivalentů se dvěma chiazmaty v porovnání s jinými druhy, jejichž karyotyp je tvořen převážně dvouramennými chromozomy. Hypotéze o nadpočetném segmentu naopak odporuje nízká variabilita délky tohoto úseku při srovnání tří samců tohoto druhu které jsem měl k dispozici. Pozoruhodné je, že v některých figurách profáze I tvoří bivalent prvního páru v achromatické části jedno subterminální chiazma, a to i přesto, že se podle získaných výsledků jedná o konstitutivní heterochromatin, ve kterém k rekombinacím obvykle nedochází (John 1988, Sumner 1990). Vzhledem k tomu, že poloha chiazmatu byla stabilní, je možné, že se v dané části nachází drobný úsek euchromatinu, ve kterém dochází k rekombinaci. V některých profázích I však achromatické úseky obou homologů v dané oblasti pouze asociovaly. Domnívám se, že achromatický úsek prvního páru by si do budoucna zasloužil hlubší analýzu.

Přítomnost argentofilního heterochromatinu u *P. aztecus* znesnadňovala detekci NOR. Metoda rDNA FISH odhalila u tohoto druhu jen jeden pár interkalárních nukleolárních organizátorů. U většiny ostatních amblypygidních bičovců se nacházely

dva páry NOR, a to v terminální nebo subterminální oblasti. Je tedy možné, že neobvyklá poloha NOR u *P. aztecus* může být důsledkem pericentrické (případně paracentrické) inverze. Vzhledem ke sníženému počtu NOR u tohoto druhu je možné i vysvětlení spočívající v centrické fúzi dvou jednoramenných chromozomů nesoucích terminální NOR na krátkém raménku. Taková poloha NOR nebyla však zatím na jednoramenných chromozomech amblypygidů nalezena.

U druhů *Charinus neocaledonicus* a *Heterophrynus cheiracanthus* byl vždy jeden pár NOR terminální a druhý subterminální, u druhu *Charon grayi* jsou oba páry terminální. Dva páry NOR byly nalezeny také u většiny studovaných pavouků, a to většinou v terminální oblasti (Král *et al.* 2006, Oliveira *et al.* 2007, Araújo *et al.* 2008). U některých pavouků ze skupiny bazálních araneomorf se NOR nacházely i na pohlavních chromozomech (Král *et al.* 2006; Oliveira *et al.* 2007). Rodriguez Gil *et al.* (2007) se domnívá, že dva páry nukleolárních organizátorů by mohly být u pavouků ancestrálním znakem. Protože je tento počet nejčastější i u amblypygidů, je možné že se jedná o ancestrální znak i této skupiny; tento znak by tak mohl podporovat blízkou příbuznost těchto dvou řádů pavoukovců. Jediný amblypygid s vyšším počtem NOR je *Phrynus whitei*, kde byly nalezeny 3 páry. Dva páry NOR jsou stejně jako u většiny amblypygidů v terminálních až subterminálních oblastech. Třetí pár je interkalární a nachází se pravděpodobně v blízkosti centromery. Jak již bylo diskutováno výše, je možné, že tato pro amblypygidy neobvyklá pozice NOR mohla být způsobena pericentrickou (případně paracentrickou) inverzí.

U dvou studovaných uropygidních bičovců byly pozorovány 3 páry NOR. U *Ginosigma shimkewitschi* byly všechny NOR terminální, u *Typopeltis guangxiensis* byly dva páry NOR terminální až subterminální a jeden interkalární. U *T. guangxiensis*

jsem pozoroval variabilitu v expresi NOR na dvou párech chromozomů (sledován byl však jen jeden samec tohoto druhu). V různých figurách byla různá poloha signálů u stejných chromozomových párů (od subterminální po interkalární), z čehož vyvozují, že tyto NOR jsou tvořeny dlouhými tandemových repeticemi rDNA.

U dalších řádů pavoukoců byly NOR detekovány pouze u štírenek (Král *et al.* 2008) a štírů (Schneider & Cella 2010). V obou případech byl nalezen pouze jediný pár terminálních NOR.

5.3 Průběh meiózy a frekvence rekombinací v genomu

Meióza se u všech zkoumaných druhů amblypygidů a uropygidů vyznačuje standardním průběhem. Jedinou odchylkou je přítomnost difúzního stádia v profázi I (mezi pachytene a diplotene), vyznačujícího se značnou dekonzenzací chromatinu (Wilson 1925). Tato odchylka se obvykle nachází u samičího pohlaví. Dosud byla popsána u některých skupin živočichů a rostlin (Klásterská, 1977; Šťáhlavský *et al.* 2006) včetně zástupců některých řádů pavoukoců – např. u některých akariformních roztočů, sekáčů, štírků, pavouků a štírenek (Šťáhlavský *et al.*, 2006; Král *et al.*, 2006, 2008). Stejně jako u sekáčů, štírků, pavouků a štírenek se difúzní stádium u obou studovaných řádů bičovců nacházelo u samců. Předpokládané vysoké transkripční aktivitě v tomto stádiu (Klásterská 1977) odpovídá přítomnost velkých jadérek vizualizovaných pomocí dusičnanu stříbrného. U všech zkoumaných druhů mělo difúzní stádium podobný průběh. To že byly pozorovány i fáze pachytene a diplotene dokazuje, že difúzní stádium nenahrazovalo ani jednu z těchto fází, nýbrž bylo mezi ně vsunuto.

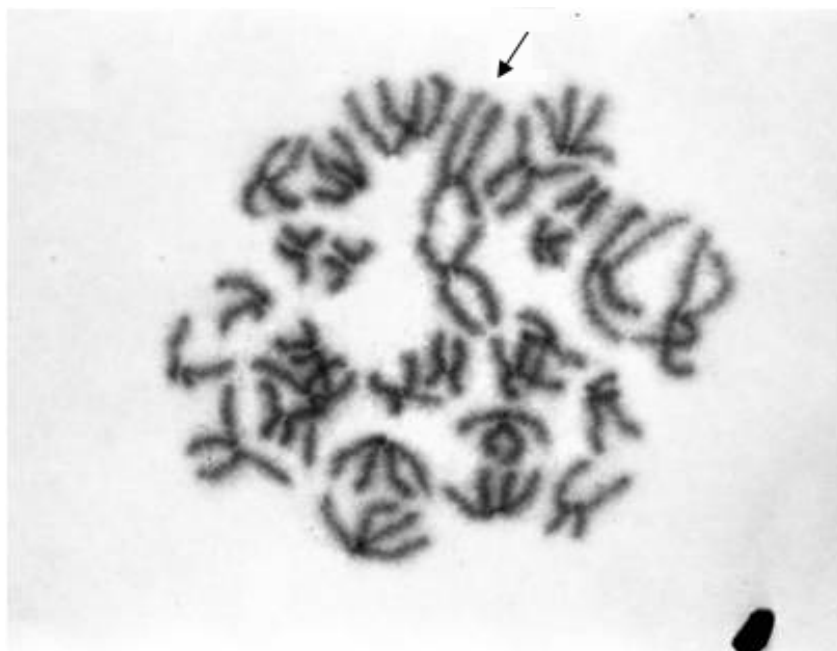
Amblypygidní i uropygidní bičovci tvoří v profázi I převážně bivalenty s jedním chiazmatem. Bivalenty se dvěma chiazmaty převažují jedině u amblypygida *Phrynichus*

dhofarensis a uropygida *Typopeltis guangxiensis*. V některých figurách těchto druhů se vyskytoval také bivalent se třemi chiazmaty, vzácně se vyskytly dva takové bivalenty. Společným znakem těchto druhů je velmi nízký počet chromozomů a dále velké chromozomy. Je pozoruhodné, že na rozdíl od *P. dhofarensis* má příbuzný druh *P. deflersi arabicus* v profázi I převahu bivalentů s jedním chiazmatem, přestože jsou si karyotypy těchto druhů jinak dosti podobné (F. Štáhlavský, osobní sdělení). Na základě porovnání dosavadních výsledků je patrné, že u obou skupin bičovců stoupá počet bivalentů se dvěma chiazmaty s klesajícím diploidním počtem. Tento jev u amblypygidů souvisí s nárůstem počtu dvouramenných chromozomů (u nichž dochází častěji ke tvorbě bivalentů se dvěma chiazmaty) a pravděpodobně také s větší velikostí chromozomů (a tedy větším prostorem pro tvorbu chiazmat). Tomuto trendu se poněkud vymyká druh *Paraphrynus aztecus*, který má i přes nízký diploidní počet a relativně velké dvouramenné chromozomy průměrně pouze dva bivalenty se dvěma chiazmaty na figuru. Naopak u druhu *Phrynichus orientalis* s vyšším diploidním počtem ($2n = 64$) a převahou jednoramenných chromozomů (které se většinou vyznačují nižší frekvencí chiazmat) se vyskytovalo průměrně 11 bivalentů se dvěma chiazmaty; některé figury obsahovaly dokonce jeden nebo dva bivalenty se třemi chiazmaty. Jak již bylo diskutováno výše, je možné, že karyotyp tohoto druhu vznikl sekundárně za přispění pericentrických inverzí a místa přednostního výskytu chiazmat se zachovala i po změně morfologie chromozomů.

5.4 Detekce pohlavních chromozomů

U pavoukovců je velká rozmanitost ve způsobu určení pohlaví. Zatímco u některých řádů nebyly nalezeny morfologicky diferencované pohlavní chromozomy (štíří, štířenky) (Schneider *et al.* 2009a, Král *et al.* 2008), jiné řády se vyznačují složitými systémy

pohlavních chromozomů jako např. pavouci (Král 1994). Vzhledem k blízké příbuznosti pavouků a obou analyzovaných skupin bičovců jsem předpokládal jsem předpokládal diferencované pohlavní chromozomy i u bičovců. U analyzovaných zástupců jsem ale nenalezl žádné morfologicky diferencované pohlavní chromozomy. U amblypygidního bičovce *Phrynichus deflersi arabicus* byl na základě pozorování rozchodu chromozomů v rané anafázi prvního meiotického dělení objeven jeden pár chromozomů, který vykazoval drobné morfologické odlišnosti (Obr. 31). Tento pár byl na základě vyhodnocení většího množství anafází I tvořen metacentrickým a submetacentrickým chromozomem (F. Šťáhlavský, osobní sdělení). Je možné, že se jedná o pohlavní chromozomy X a Y. Pro potvrzení této hypotézy však bude nutné prostudovat další exempláře tohoto druhu. Ve své diplomové práci jsem analyzoval příbuzný druh *P. dhofarensis* se shodným diploidním počtem. Je zajímavé, že se pár č. 3 tohoto druhu rozcházel v anafázi I způsobem, který naznačuje nerovnoměrné párování chromozomů.



Obr. 31: *Phrynichus deflersi arabicus* – rozchod homologických chromozomů v anafázi I; šipka označuje heteromorfní pár chromozomů (foto F. Šťáhlavský).

Při statistickém vyhodnocení tří figur v rané anafázi I se však tento pár nejevil jako heteromorfní. Zvláštní párování chromozomů třetího páru by mohlo být důsledkem krátké pericentrické inverze na jednom chromozomu. Tato přestavba může souviset podobně jako u příbuzného druhu *P. deflersi arabicus* s počáteční morfologickou diferenciací pohlavních chromozomů nebo se tato přestavba pohlavních chromozomů netýká. Pro ověření těchto hypotéz bude ale třeba analyzovat větší počet anafází I, než jsem měl k dispozici a dále větší množství jedinců. Pro ověření přítomnosti pericentrické inverze by bylo vhodné analyzovat párování chromozomů tohoto páru také v pachytene.

Jiný neobvyklý jev, který by mohl mít vztah k pohlavním chromozomům, jsem pozoroval u druhu *Euphrynichus amonica*. U samce tohoto druhu jsem v difúzním stádiu pozoroval neobvyklý heteropyknotický bivalent. Diferencované pohlavní chromozomy jsou v meióze heterogametického pohlaví často více kondenzovány a heteropyknotické jako např. u pavouků (Král *et al.* 2006). V tomto případě by bylo vhodné prostudovat i meiotické dělení samičky, to jsem ale neměl k dispozici. Pokud by se v samičí meióze nevyskytoval žádný heteropyknotický pár, znamenalo by to že se vyskytuje jen u samce a mohlo by se jednat o pohlavní chromozomy. V této souvislosti je zajímavá přítomnost dvou méně spiralizovaných chromozomů na okraji figury ve spermatogoniálních metafázích samce. Jiným vysvětlením heteropyknotického bivalentu je transkripční suprese jednoho autozomového páru v difúzním stádiu.

Na základě pozorovaných dat se jeví jako velmi nepravděpodobný výskyt značně odvozeného systému pohlavních chromozomů ♂XO/♀XX, který uvádí Milot a Tuzet (1934) u amblypygida *Sarax sarawakensis*. Tomuto údaji neodpovídají ani mé údaje o karyotypu příbuzného druhu *S. brachydactylus*.

Vzhledem k možné existenci morfologicky diferencovaných pohlavních chromozomů u některých amblypygidů s odvozeným, nízkým počtem chromozomů byla provedena detekce pohlavních chromozomů na molekulární úrovni u druhu *Paraphrynus mexicanus*, jehož diploidní počet je v rámci amblypygidů nejmenší. Metoda CGH odhalila u samce tohoto druhu v terminální části jednoho z největších metacentrických párů krátký úsek který je specifický pouze pro samčí pohlaví. Jedná se tedy pravděpodobně o gonozom Y. Metoda CGH tedy ukazuje na výskyt systému ♂XY/♀XX u tohoto druhu. Pokus o detekci molekulárně diferencovaných pohlavních chromozomů byla proveden i u zástupce s vysokým diploidním počtem (*Charon grayi*), v tomto případě ale nebyla žádná pohlavně-specifická oblast nalezena.

Získaná data ukazují na možnou přítomnost systému XY v počátečním stádiu evoluce u zástupců apulvilátní větve amblypygidů (čeledi Phryniidae a Phrynichidae), zatímco u zástupce pulvilátní větve nebyly pohlavní chromozomy detekovány. Přítomnost primitivních pohlavních chromozomů by tedy mohl být společný znak pro apulvilátní amblypygidy. Pro ověření této hypotézy však bude třeba analyzovat větší množství druhů, a to především z pulvilátní větve amblypygidů.

Morfologicky diferencované pohlavní chromozomy nebyly nalezeny ani u analyzovaných zástupců uropygidních bičovců. Kasturi a Parthasarathy (1957) však našli morfologicky diferencované pohlavní chromozomy (systém ♂XY/♀XX) u uropygida *Thelyphonus sepiaris* (podčeď Thelyphoninae). Tito autoři dále uvádí, že karyotyp tohoto druhu je tvořen pouze akrocentrickými chromozomy. U žádného druhu uropygida jsem nenalezl karyotyp tvořený jen akrocentrickými chromozomy podobně jako mí kolegové na dalších druzích. Je pravděpodobné, že autoři dospěli k tomuto výsledku na základě analýzy spermatogoniálních chromozomů, na nichž u uropygidů

většinou není dobře patrná poloha centromery. V rámci naší laboratoře byl nalezen systém pohlavních chromozomů ♂XX/♀XY u příbuzného druhu *T. sp. linganus* (J. Král, osobní sdělení). Je zajímavé, že u rodu *Ginosigma* z téže podčeledi jsem nenalezl morfologicky diferencované pohlavní chromozomy. CGH u uropygida *Typopeltis guangxiensis* (podčeled Typopeltinae), u kterého jsem našel nejnižší diploidní počet v rámci uropygidů neodhalila žádný pohlavně specifický úsek ani u jednoho pohlaví.

6. Souhrn

Amblypygidní a uropygidní bičovci jsou dva reliktní řády pavoukovců o jejichž cytogenetice nejsou dosud téměř žádné údaje. Předkládaná práce je první rozsáhlejší studií o jejich karyotypech.

Pomocí klasických cytogenetických metod byly analyzovány karyotypy a průběh meiózy u 16 druhů amblypygidů a 4 druhů uropygidů. Tyto druhy reprezentují všechny čeledě těchto řádů a v případě amblypygidů většinu rodů. Poměr analyzovaných druhů a druhové diverzity amblypygidů ukazuje, že se tato skupina stává jednou z cytogeneticky nejprozkoumanějších skupin pavoukovců. Metodou stříbření pomocí dusičnanu stříbrného byla analyzována distribuce nukleolárních organizátorů u 4 druhů amblypygidů a dvou druhů uropygidů. U stejného počtu druhů bylo analyzováno množství a distribuce konstitutivního heterochromatinu metodou C-pruhování. U jednoho druhu bylo pro hlubší analýzu konstitutivního heterochromatinu použito fluorescenční pruhování. Metodami FISH byly detekovány nukleolární organizátory u jednoho druhu amblypygida a dále byly tyto metody použity pro na detekci pohlavních chromozomů u dvou druhů amblypygidů a jednoho druhu uropygida.

Analyzovaná data naznačují vysoký rozsah diploidních počtů chromozomů u amblypygidů ($2n=24 - 86$) i uropygidů ($2n=36 - 78$). U analyzovaných druhů nebyly nalezeny morfologicky diferencované pohlavní chromozomy, nebo jejich přítomnost nebyla definitivně potvrzena. Diferenciace chromozomů na molekulární úrovni byla prokázána u amblypygida druhu *P. mexicanus* metodou CGH. Jedná se o systém pohlavních chromozomů XY/XX.

Srovnání karyotypu analyzovaných druhů naznačuje, že během karyotypové evoluce obou řádů docházelo ke snižování počtu chromozomů fúzí. U amblypygidních bičovců byl tento proces doprovázen zvyšováním počtu dvouramenných chromozomů, a to pravděpodobně v důsledku centrických fúzí a pericentrických inverzí. U uropygidních bičovců k podobnému nárůstu počtu dvouramenných chromozomů nedochází.

Oba řády bičovců se vyznačují nízkým obsahem konstitutivního heterochromatinu, jehož bloky se nacházejí převážně v pericentromerických a terminálních oblastech chromozomů. U obou řádů byl nalezen nízký počet NOR (obvykle dva páry u amblypygidů a tři páry u uropygidů), jejichž poloha byla většinou terminální nebo subterminální.

Meióza je u všech analyzovaných druhů chiazmatická, převažují bivalenty s jedním chiazmatem. Pouze u amblypygida *Phrynichus dhofarensis* a uropygida *Typopeltis guangiensis* převažují v profázi I bivalenty se dvěma chiazmaty. U těchto druhů a u amblypygida *Phrynichus orientalis* se někdy vyskytují jeden, vzácně i dva bivalenty se třemi chiazmaty. Meióza všech studovaných amblypygidů a uropygidů zahrnuje v profázi I difúzní stádium. Jedná se o zvláštní etapu mezi pachytene a diplotene charakterizovanou značnou despiralizací bivalentů. Na vysokou transkripční

aktivitou v tomto stádiu ukazují velká jádérka vizualizovaná pomocí dusičnanu stříbrného.

Předpokládané cíle práce byly splněny, získané údaje objasnily základní charakteristiky karyotypu obou řádů. Zároveň přinesly nové otázky, na které je ještě třeba odpovědět. Pro zmapování karyotypové evoluce těchto skupin bude do budoucna zapotřebí podrobněji analyzovat některé klíčové druhy a také ověřit současné hypotézy studiem dalších druhů.

Srovnání karyotypů bičovců a jejich sesterské skupiny pavouků ukazuje, že obě skupiny mají značnou diverzitu diploidních počtů chromozomů. U bičovců i pavouků docházelo v průběhu evoluce ke snižování počtu chromozomů, karyotypy obou skupin mají většinou nízký obsah konstitutivního heterochromatinu a nízký počet NOR. Tyto údaje podporují hypotézy o blízké příbuznosti obou skupin. Zajímavou odlišností bičovců je nepřítomnost morfologicky diferencovaných pohlavních chromozomů u většiny studovaných bičovců, což kontrastuje se složitými systémy pohlavních chromozomů u pavouků.

7. Seznam literatury

- Adams, R.L.P., Knowler, J.T. & Leader, D.P. (1992): The Biochemistry of the Nucleic Acids, 11th edn. Chapman & Hall, London.
- Alexander, A.J. (1962a): Courtship and mating in amblypygids (Pedipalpi, Arachnida). Proc. Zool. Soc. Lond. 138: 379 – 383.
- Alexander, A.J. (1962b): Biology and behavior of *Damon variegatus* Perty of South Africa and *Admetus barbadensis* Pocock of Trinidad, W.I. (Arachnida, Pedipalpi). Zoologica. 47: 25 – 37.
- Ananiev, E.V., Phillips, R.L. & Rines, H.W. (1998b): Complex structure of knob DNA on maize chromosome 9: retrotranspozon invasion into heterochromatin. Genetics 149: 2025 – 2037.

- Araújo, D., Brescovit, A. D., Rheims, C. A. & Cella, D. M. (2005): Chromosomal data of two pholcids (Araneae, Pholcidae): A new diploid number and the first cytogenetical record for the New World clade. *J. Arachnol.* 33: 591 – 596.
- Araújo, D., Rheims C. A., Brescovit A. D. & Cella, D. M. (2008): Extreme degree of chromosome number variability in species of the spider genus *Scytodes* (Araneae, Haplogynae, Scytodidae). *J. Zool. Syst. Evol.* 46: 89 – 95.
- Armas, L.F. de (2000): Parthenogenesis in Amblypygi (Arachnida) *Avicennia* 12/13:133 – 134.
- Bachant, J.B. & Elledge, S.J. (1999): Mitotic treasures in the nucleolus. *Nature* 398: 757 – 758.
- Balíček, P., Žižka, J. & Skalská, H. (1997): Length of human constitutive heterochromatin in relation to chromosomal contraction. *Human Genetics* 38: 189 – 193.
- Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C. & Kouzarides, T. (2001): Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410:120 – 124.
- Beermann, S. (1977): The diminution of heterochromatic chromosomal segments in *Cyclops* (Crustacea, Copepoda). *Chromosoma* 60: 297 – 344.
- Belyaev, N.D., Houben, A., Baranczewski, P. & Schubert, I. (1997): Histone H4 acetylation in plant heterochromatin is altered during the cell cycle. *Chromosoma* 106: 193 – 197.
- Benavente, R. & Wettstein, R. (1980): Ultrastructural characterization of the sex chromosomes during spermatogenesis of spiders having holocentric chromosomes and a long diffuse stage. *Chromosoma* 77: 69 – 81.
- Beridze, T. (1986): *Satellite DNA*. Springer-Verlag, Berlin.
- Bole – Gowda, B.N. (1952): Studies on the chromosomal and sex – determining mechanism of four hunting spiders (Sparassidae). *Proc. Zool. Soc. Bengal* 5: 51 – 70.
- Brown, S.W. (1996): Heterochromatin. *Science* 151: 417 – 425.
- Brown, G.M., Leversha, M., Hulten, M., Ferguson-Smith, M.A., Affara, N.A. & Furlong, R.A. (1998): Genetic analysis of meiotic recombination in humans by use of sperm typing: reduced recombination within a heterozygous paracentric inversion of chromosome 9q32→q34.3. *Am. J. hum. Genet* 62: 1484 – 1492.
- Brum-Zorilla, N. & Postiglioni, A. (1981): Karyological studies on Uruguayan spiders. II. Sex chromosomes in spiders of the genus *Lycosa* (Araneae: Lycosidae). *Genetica* 56: 47 – 53.
- Carnoy, J. B.(1885): La cytodièrese chez les Arthropodes. *La Cellule* 1: 189 – 440.
- Clark, M.S. & Wall, W.J. (1996): *Chromosomes the Complex Code*. Chapman and Hall.

- Cryderman, D.E., Morris, E.J., Biessmann, H., Elgin, S.C.R. & Wallrath, L.L. (1999): Silencing at *Drosophila* telomeres: nuclear organization and chromatin structure play critical roles. *EMBO Journal* 18: 3724 – 3735.
- CSHL/WUGSC/PEB *Arabidopsis* Sequencing Consortium (2000): The complete sequence of a heterochromatic island from a higher eukaryote. *Cell* 100: 377 – 386.
- Datta, S.N. & Chatterjee, K. (1988): Chromosomes and sex determination in 13 araneid spiders of North-Eastern India. *Genetica* 76: 91 – 99.
- Derenzini, M., Pasquinelli, G., O'Donohue, M., Ploton, D. & Thiry M. (2006): Structural and functional organization of ribosomal genes within the mammalian cell nucleolus. *J. Histochem. Cytochem.* 54: 131 – 145.
- Dimitri, P. & Junakovič, N. (1999): Revising the selfish DNA hypothesis: new evidence on accumulation of transposable element in heterochromatin. *Trends Genet.* 15:123 – 124.
- Dulíková L. (2009): Studium karyotypu u pavouků infrařádu Mygalomorphae (Araneae). Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta UK, Praha.
- Dulíková, L. & Král, J. (2007): Insights into the karyotype evolution of the spider infraorder Mygalomorphae. In: Pinto-da-Rocha R., Machado. G. & Brescovit A.D.(eds): Abstracts, 17th International Congress of Arachnology, Sao Paulo.
- Dundr, M., Misteli, T. & Olson, M.O.J.(2000): The dynamics of postmitotic reassembly of the nucleolus. *J. Cell Biol.* 150: 433 – 446.
- Edström, J. E., Gramp, W. & Scor, N. (1961): The intracellular distribution and heterogeneity of ribonucleic acid in starfish oocytes. *J. Biophys. Biochem.Cytol.* 11: 549 – 557.
- Eisner, T., Meinwald, J., Monro, A. & Ghent, R. (1961): Defense mechanisms of arthropods - I.The composition and function of the spray of the whipscorpion, *Mastigoproctus giganteus* (Lucas) (Arachnida: Pedipalpida). *J. Insect Physiol.* 6: 272 – 298.
- Eissenberg, J.C., Ge, Y-W. & Hartnett, T. (1994): Increased phosphorylation of HP1, a heterochromatin-associated protein of *Drosophila*, is correlated with heterochromatin assembly. *J. Biol. Chem.* 269: 21315 – 21321.
- Eissenberg, J.C. & Elgin, S.C.R. (2000): The HP1 protein family: getting a grip on chromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10: 204 – 210.
- Elgin, S.C.R. (1996): Heterochromatin and gene regulation in *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6: 193 – 202.
- Gerbi, S.A., Borovjagin, A.V. & Lange, T.S. (2003): The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 318 – 325.
- Gillies, C.B. (1975): The synaptonemal complex and chromosome structure. *Ann. Rev. Genet.* 9: 91 – 109.

- Giribet, G., Edgecombe, G.D., Wheeler, W.C. & Babbitt, C., (2002): Phylogeny and systematic position of Opiliones: A combined analysis of chelicerate relationships using morphological and molecular data. *Cladistics* 18: 5 – 70.
- Gorlov, I.P. & Tsurusaki, N. (2000a): Analysis of the phenotypic effects of B chromosomes in a natural population of *Metagagrella tenuipes* (Arachnida: Opiliones). *Heredity* 84: 209 – 217.
- Gorlova, O.Y., Gorlov, I.P., Nevo, E., Logunov, D.V. (1997): Cytogenetic studies on seventeen spider species from Israel. – *Bull. Brit. Arachnol. Soc.* 10: 249–252.
- Graham, D.E. (1978): The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms or large tissue masses. *Anal. Biochem.* 85: 609 – 613.
- Grunstein, M. (1998): Yeast heterochromatin: regulation of its assembly and inheritance by histones. *Cell* 93: 325 – 328.
- Hackman, W. (1948): Chromosomenstudien an Araneen mit besonderer Berücksichtigung der Geschlechtschromosomen. *Acta Zool. Fenica* 54: 1 – 101.
- Harvey, M.S. (2002): The neglected cousins: what do we know about the smaller arachnid orders? *J. Arachnol.* 30: 357 – 372.
- Haupt, J., Höhne, G., Schwarz, H., Chen, B., Zhao, W. & Zhang, Y. (1988): Chinese whip scorpions using 2-ketones in defense secretion (Arachnida: Uropygi). *Journal of Comparative Physiology B* 157: 883 – 885.
- Haupt J., Höhne, G., & Weiske, T. (1993): Acetic acid esters, *n*-hexanol, *n*-octanol, and capronic acid as ingredients in the defense secretion product of whip scorpions. *C. R. XIVE Coll. Europ. Arachnol. Catania, 23D27 aout 1993. Boll. Acc. Gioenia Sci. Nat.* 26: 175 - 180.
- Haupt, J. & Song, D. (1996): Revision of East Asian whip scorpions (Arachnida Uropygi Thelyphonida).I. China and Japan. *Arthropoda Selecta* 5: 43 – 52.
- Hawley, R.S. & Therkauf, W.E. (1993): Requiem for distributive segregation: achiasmate segregation in *Drosophila* females. *Trends Genet.* 9: 310 – 317.
- Heitz E. (1928): Das Heterochromatin der Moose. *I. Jahrb Wiss Bot* 69:762-818, Henking 1891 Untersuchungen über die ersten Entwicklungsvorgänge in den Eiern der Insekten. *Z. Wiss. Zool.* 51: 685-736.
- Hillis, D.M. & Dixon, M.T. (1991): Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* 66: 411 – 453.
- Howell, W.M. & Black, D.A. (1980): Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014.
- Hozák, P., Schofer, C., Sylvester, J. & Wachtler, F. (1993): A study on nucleolar DNA: isolation of DNA from fibrillar components and ultrastructural localization of different DNA probes. *J. Cell Sci.* 104: 1199 – 1205.
- Hsu, T.C. (1975) A possible function of constitutive heterochromatin bodyguard

- hypothesis. *Genetics, Suppl.*, 79, 137-150.
- Huang, S. (2002): Building an efficient factory: where is pre-rRNA synthesized in the nucleolus?. *J. Cell Biol.* 157: 739 – 741 .
- Charlesworth, B. (1996): The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Curr Biol* 6: 149 – 162.
- Charlesworth, B. & Charlesworth, D. (1978): A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *Am Nat* 112: 975 – 997.
- Christensen, B. (1961): Studies on cyto-taxonomy and reproduction in the Enchytraeidae. *Hereditas* 47: 387 – 450.
- Irick, H. (1994): A new function for heterochromatin. *Chromosoma* 103, 1 – 3.
- Jablonka, E. & Lamb, M.J. (1990): The evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Biol. Rev.* 65: 249 – 276.
- Jeppesen, P., Mitchell, A., Turner, B. & Perry, P. (1992): Antibodies to defined histone epitopes reveal variations in chromatin conformation and underacetylation of centric heterochromatin in human metaphase chromosomes. *Chromosoma* 101: 322 – 332.
- John, B. (1981): Heterochromatin variation in natural populations. *Chromosomes today* 7:128-137.
- John, B. (1988): The biology of heterochromatin . In: *Heterochromatin, Molecular and Structural Aspects* (ed. R.S.Verma), pp. 1-147. Cambridge University Press, Cambridge.
- John, B. (1990): Meiosis. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- John, B., Hewitt, G.M. (1966) A polymorphism for heterochromatic supernumerary segments in *Chorthippus parallelus*. *Chromosoma* 18: 254-271.
- Juberthie, C. (1956): Nombres chromosomiques chez les Sironidae, Troglidae, Ischyropsalidae, Phalangiidae (Opiliones). *C. r. Acad. Sci. Paris* 242: 2860 – 2862.
- Kahn J. & Quart J. (1964): Cytotaxonomy of ticks. *J.micr. Sci.* **105**:123-137
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F., Pinkel, D (1992): Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258: 818 - 821
- Karpen, G.H. (1994): Position-effect variegation and the new biology of heterochromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 281 – 291.
- Kasturi Bai, A.R. & Parthasarathy, M.D. (1957): The chromosomes of *Thelyphonus indicus* Stoliczka. – *Proc. Ind. Aca. Sci. - Section B* 24 (1):19-22.
- Kirchhoff, M., Rose, H., Maahr, J. et al. (2000): High resolution comparative genomic hybridisation analysis reveals imbalances in dyschromosomal patients with normal or apparently balanced conventional karyotypes. *European Journal of Human Genetics* 8: 661 – 668.

- Klásterská, I. (1977): The concept of the prophase of meiosis. *Hereditas* 86: 205 – 210.
- Klingel, H. (1963): Paarungsverhalten bei pedipalpen *Thelyphonus caudatus* L. (Holopeltida, Uropygi), und *Sarax sarawakensis* Simon (Charontidae, Amblypygi). *Verh. Dt. Zool. Ges.* 27: 452 – 459.
- Král, J., Musilová, J., Šťáhlavský, F., Řezáč, M., Akan, Z., Edwards, R.L., Coyle, F.A., Ribera Almeje, C. (2006): Evolution of the karyotype and sex chromosome systems in basal clades of araneomorph spiders (Araneae: Araneomorphae). *Chromosome Res.* 14: 859 – 880.
- Král, J., Kováč, L., Šťáhlavský, F., Lonský, P., Luptáček, P. (2008): The first karyotype study in palpigrades, a primitive order of arachnids (Arachnida: Palpigradi). – *Genetica* 134: 79–87.
- Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. & Jenuwein, T. (2001): Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410: 116 – 120.
- Lee, W.K. & Seo, H.Y. (1995): Soil-inhabiting pseudoscorpions of the genus *Allochthonius* from Korea. *Korean J. Syst. Zool.* 11: 455 – 468.
- Leydig, F. (1852): Anatomische Notizen über Synapta Digital. *Arch. Anat. Physiol. Wiss. Med.*, 507 – 519.
- Levan A.K., Fredga K., Sandberg A.A. (1964): Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201–220.
- Lica, L.M., Narayanswami, S. & Hamkalo, B.A. (1986): Mouse satellite DNA, centromere structure, and sister chromatid pairing. *J.Cell Biol.* 103: 1145 – 1151.
- Lohe, A.R. & Hilliker, A.J. (1995): Return of the H-word (heterochromatin). *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5: 746 – 755.
- Lokwood, A.M.P. (1961): „Ringer“ solutions and some notes on the physiological basis their ionic composition. *Comp. Biochem. Physiol.* 2: 241 – 289.
- Lyon, M.F. (1961): Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.) *Nature* 190: 372 – 373.
- McGregor, H.C. (1993): *An Introduction to Animal Cytogenetics*. Chapman & Hall, London.
- Maddison, W.P. (1982): XXXY sex chromosomes in males of the jumping spider genus *Pellenes* (Araneae: Salticidae). *Chromosoma* 85: 23 – 27.
- McClung, C.E. (1902): The spermatocyte divisions of the Locustidae. *Kans. Univ. Sci. Bull.* 1: 185–231
- Medina, F.J., Cerdido, A. & de Cárcer, G. (2000): The functional organization of the nucleolus in proliferating plant cells. *Eur. J. Histochem.* 44, 117 – 131.

- Miller, O.J., Miller, D.A., Vaithilingam, G., Tantravahi, R. & Croce, C.M. (1976): Expression of human and suppression of mouse nucleolus organizer activity in mouse-human somatic cell hybrids. *Proc. Nat. Acad. Sci. Am.* 73: 4531 – 4535.
- Millot, J. & Tuzet, O. (1934): La spermatogénèse chez les Pédipalpes. *Bull. Biol. Fra. Belg.* 68: 77-83.
- Moses, M.J. (1968): Synaptonemal complex. *Annu. Rev. Genet.* 2: 363 – 412.
- Moss, T. & Stefanovsky, V. Y. (1994): Promotion and regulation of ribosomal transcription in eukaryotes by RNA polymerase I. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 50: 25 – 66.
- Müller, H.J. (1964): The relation of recombination to mutational advance. *Mutat Res.* 1: 2 –9.
- Müller, F., Bernard, V. & Tobler, H. (1996): Chromatin diminution in nematodes. *Bioessays* 18: 133 – 138.
- Nagl, W. & Schmitt, H. P. (1985): Transcription of repetitive DNA in condensed plant chromatin. *Mol. Biol. Rep.* 10: 143 – 146.
- Nakai, Y., Kubota, S., Goto, Y., Ishibashi, T., Davison, W. & Kohno, S.-I. (1995): Chromosome elimination in three Baltic, south Pacific and north-east Pacific hagfish species. *Chromosome Res.* 3: 321 – 330.
- Norton, R.A., Kethley, J.B., Johnston, D.E. & O'Connor, B.M.(1993): Phylogenetic perspectives on genetic systems and reproductive modes of mites. In: Wrensch D, Ebbert M (eds.) *Evolution and Diversity of Sex Ratio in Insects and Mites*. Chapman & Hall, London.
- Ohno, S. (1967): *Chromosomes and Sex Linked Genes*. Springer, New York.
- Oliveira, R.M., Zacaro, A.A., Cella, D.M., Gnaspini, P. & Pinto-da-Rocha, R. (2000): Mitotic and meiotic chromosomes of three harvestmen species, *Goniosoma spelaeum*, *Neosadocus* sp. and *Pseudopachylis* sp. (Arachnida, Opiliones, Laniatores), using standard and silver staining. *Genet. Mol. Biol.* 23: 41.
- Oliveira, R.M., de Jesus, A.C., Brescovit, A.D. & Cella D.M.(2007): Chromosomes of *Crossopriza lyoni* (Blackwall 1867), intraindividual numerical chromosome variation in *Physocyclus globosus* (Taczanowski 1874), and the distribution pattern of NORs (Araneomorphae, Haplogynae, Pholcidae). *J. Arachnol.* 35: 293 – 306.
- Oliver, J.H. (1967): Cytogenetics of acarines. In Wright J.W., Pal R. (eds.): *Genetics of insect vectors of disease*. Elsevier, Amsterdam.
- Oliver, J.H. (1971): Parthenogenesis in mites and ticks (Acari). *Amer. Zoologist* 11: 283 – 299.
- Oliver, J.H. (1977): Cytogenetics of mites and ticks. *Ann. Rev. Ent.* 22: 407 – 429.
- Oliver, J.H. & Nelson, B.C.(1967): Mite chromosomes: an exceptionally small number. *Nature* 214: 809.

- Olson, M. O. J., Dundr, M. & Szebeni A. (2000): The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol.* 10: 189 – 196.
- Pardue, M.L., Gall, J.G. (1970): Chromosomal Localization of Mouse Satellite DNA. *Science* 168: 1356 – 1358.
- Pederson, T. (1998): The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res.* 26: 3871 – 3876.
- Pederson, T. & Politz, J. C. (2000): The nucleolus and the four ribonucleoproteins of translation. *J. Cell Biol.* 148: 1091 – 1095.
- Perry, J., Slater, H.R., Choo, K.H.A. (2004): Centric fission – simple and complex mechanisms. *Chromosome Res* 12: 627 – 640.
- Perry, R. P. (1962): The cellular sites of synthesis of ribosomal and 4S RNA. *Proc. Natn. Acad. Sci. USA* 48: 2179 – 2186.
- Perry, R. P., Hell A. & Errera, M. (1961): The role of the nucleolus in ribonucleic acid and protein synthesis. I. Incorporation of cytidine into normal and nucleolar inactivated HeLa cells. *Biochem. Biophys. Acta* 49: 47 – 57.
- Petrunkévitch, A. (1955): Arachnida. In Moore, R.C. (Ed.), *Treatise on invertebrate Paleontology*. University of Kansas Press, Lawrence, Kansas.
- Platnick, N.I. (2010): The world spider catalogue, version 11.0. American Museum of Natural History. Přístupno na <http://research.amnh.org/iz/spiders/catalog/>
- Raška, I. (2003): Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Trends Cell Bio.* 13: 517 – 525.
- Rayor, L.S. & Taylor, L.A. (2006) : Social behavior in amblypygids, and a reassessment of arachnid social patterns. *J. Arachnol.* 34: 399 – 421.
- Reuter, G. & Spierer, P. (1992): Position effect variegation and chromatin proteins. *Bioessays* 14, 605 – 612.
- Rodríguez-Gil, S.G. , Mola, L.M., Papeschi, A.G. & Scioscia, C.L. (2002): Cytogenetic heterogeneity in common haplogyne spiders from Argentina. *J. Arachnol.* 30: 47 – 56.
- Rodríguez-Gil, S.G. (2007): Cytogenetics in three species of *Polybetes* Simon 1897 from Argentina (Araneae, Sparassidae) I. Karyotype and chromosome banding pattern. *J. Arachnol.* 35: 227 – 237.
- Rowell, D. M. (1985): Complex sex-linked fusion heterozygosity in the Australian spider *Delena cancerides* (Araneae: Sparassidae). *Chromosoma* 93: 169 – 177.
- Rowell, D. M. (1991b): Chromosomal fusion and meiotic behaviour in *Delena cancerides* (Araneae: Sparassidae). II. Chiasma position and its implications for speciation. *Genome* 34: 567 – 573.
- Rowland, J. M., Cooke J. A. L., (1973): Systematics of the arachnid order Uropygida (=Thelyphonida). *J. of Arachnol.* 1:55–71.

- Řezáč, M., Král, J., Musilová, J., Pekár, S. (2006): Unusual karyotype diversity in the European spiders of the genus *Atypus* (Araneae: Atypidae). *Hereditas* 143: 123 – 129.
- Scudder, S. H. (1884): A contribution to our knowledge of Palaeozoic Arachnida. *Proc. Am. Acad. Arts Sci.* 20: 15 – 22.
- Selden, P.A., Shear, W.A. & Bonamo, P.M. (1991): A spider and other arachnids from the Devonian of New York, and reinterpretations of Devonian Araneae. *Palaeontology* 34: 241 – 281.
- Sember A. (2007): Studium karyotypu u vybraných bičovců řádu Amblypygi (Arachnida)
Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta UK, Praha.
- Serrano, J. (1981): Male achiasmatic meiosis in Caraboidea (Coleoptera: Adephaga). *Genetica* 57: 131 – 137.
- Shanahan, C.M. (1986): Cytogenetic studies on Australian scorpions. *Chromosoma* 86: 27 – 47.
- Shanahan, C.M. (1989a): Cytogenetics of Australian scorpions I: Interchange polymorphism in the family Buthidae. *Genome* 32: 882 – 889.
- Shanahan, C.M. (1989b): Cytogenetics of Australian scorpions. II. Chromosome polymorphism in species of *Urodacus* (family Scorpionidae). *Genome* 32: 890 – 900.
- Shanahan, C.M., Hayman, D.L. (1990): Synaptonemal complex formation in male scorpions exhibiting achiasmatic meiosis and structural heterozygosity. *Genome* 33: 914 – 927.
- Sharma, G.P., Gupta, B.L., Parshad, R. (1959): Cytological studies on the Indian spiders. III. An analysis of the chromosomes in the male germ cells of the spider *Crossopriza lyoni* (Blackwall), Fam. Pholcidae. *Research Bull. of the Panjab Univ.* 10: 49 – 53.
- Shaw 1970, SHAW, D. ID. 1970. The supernumerary segment system of *Stethophyma*. I. Structural basis. *Chromosoma*, 30, 326-343.
- Shaw 1971 SHAW, D. ID. 1971. The supernumerary segment system of *Stethophyma* II. Heterochromatin polymorphism and chiasma variation. *Chromosoma* 34: 19-39
- Schultz, J.W. (1990): Evolutionary morphology and phylogeny of Arachnida. *Cladistics* 6: 1 – 38.
- Scharff, N. & Enghoff, H. (2005): Arachnida . Zoological Museum, University of Copenhagen.
- Scheer, U., Thiry, M., Goessens, G. (1993): Structure, function and assembly of the nucleolus. *Trends Cell Biol.* 3: 236 – 241.
- Scheer, U. & Hock, R., (1999): Structure and function of the nucleolus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:385-390
- Schneider, M.C., Zacaro, A.A., Pinto-da-Rocha, R., Candido, D.M. & Cella, D.M. (2009a): A comparative cytogenetic analysis of 2 Bothriuridae species and overview of the chromosome data of Scorpiones. *J. Hered.* 100: 545 – 555.

- Schneider, M.C., Zacaro, A.A., Pinto-da-Rocha, R., Candido, D.M. & Cella, D.M. (2009b): Complex meiotic configuration of the holocentric chromosomes: the intriguing case of the scorpion *Tityus bahiensis*. *Chromosome Res.* 17: 883 – 898.
- Schneider, M.C., Zacaro, A.A., Oliveira, R.M., Gnaspini, P. & Cella, M.D. (2009c): Conventional and ultrastructural analyses of the chromosomes of *Discocyrtus pectinifemur* (Opiliones, Laniatores, Gonyleptidae). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 47(2): 203 – 207.
- Schneider, M.C., Cella, D.M. (2010): Karyotype Conservation in 2 Populations of the Parthenogenetic Scorpion *Tityus serrulatus* (Buthidae): rDNA and Its Associated Heterochromatin Are Concentrated on Only One Chromosome. *J. Hered.* 2010:101(4):491–496
- Schwarzacher, T., Leitch, A.R., Bennett, M.D., Heslop-Harrison, J.S. (1989): In situ localization of parental genomes in a wide hybrid. *Ann. Bot.* 64: 315 – 324.
- Swarzacher, H.G., Wachtler, F. (1993): The nucleolus. *Anat. Embryol.* 188: 515 – 536.
- Sola, L., Rossi, A.R., Iaselli, V., Rasch, E.M. & Monaco, P.J. (1992): Cytogenetics of bisexual/unisexual species of *Poecilia*. II. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Poecilia mexicana mexicana* by C-banding and DAPI, quinacrine, chromomycin A₃, and silver staining. *Cytogenet. Cell Genet.* 60: 229 – 235.
- Sperling, K., Kalscheuer, V., Neitzel, H. (1987): Transcriptional activity of constitutive heterochromatin in the mammal *Microtus agrestis* (Rodentia, Cricetidae). *Exp. Cell Res.* 173, 463 – 472.
- Stack, S. & Anderson, L. K. (2001): A model for chromosome structure during the mitotic and meiotic cell cycles (Review). *Chromosome Res.* 9: 175 – 198.
- Suja, J.A., De La Torre, J., Giménez-Abián, J.F., García De La Vega, C. & Rufas, J.S. (1990): Meiotic chromosome structure. Kinetochores and chromatid cores in standard and B chromosomes of *Arcyptera fusca* (Orthoptera) revealed by silver staining. *Genome* 34: 19 – 27.
- Sumner, A.T. (1972): A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* 75: 304 – 306.
- Sumner, A.T. (1990): Chromosome banding. Unwin hyman, London.
- Sumner, A.T. (1991): Scanning electron microscopy of mammalian chromosomes from prophase to interphase. *Chromosoma* 100, 410 – 418.
- Sumner, A.T. (1996): The distribution of topoisomerase II on mammalian chromosomes. *Chromosome Res.* 4, 5 – 14.
- Sumner, A.T. (2003): Chromosomes: organization and function. Blackwell Science, Oxford.
- Suzuki, S. (1954): Cytological studies in spiders III. Studies on the chromosomes of fifty-seven species of spiders belonging to seventeen families, with general considerations on chromosomal evolution. *J. Sci. Hiroshima Univ.* 15: 23 – 136.

- Šťáhlavský, F. (2006): Úvod do studia karyotypové evoluce štírků (Arachnida: Pseudoscorpiones). Disertační práce. Přírodovědecká Fakulta Univerzity Karlovy, Praha
- Šťáhlavský, F. & Král, J. (2004): Karyotype analysis and achiasmatic meiosis in pseudoscorpions of the family Chthoniidae (Arachnida: Pseudoscorpiones). *Hereditas* 52:1 – 12.
- Šťáhlavský, F., Hendrickx, H. & Král, J. (2005): Karyotype study on pseudoscorpions of the genus *Lasiochernes* (Pseudoscorpiones: Chernetidae). *Folia Biol., Kraków* 53: 69 – 74.
- Šťáhlavský, F., Král, J., Harvey, M.S. & Haddad, C.R. (2006): A karyotype study on the pseudoscorpion families Geogarypidae, Garypinidae and Olpiidae (Arachnida: Pseudoscorpiones). *Eur. J. Entomol.* 103:277-289
- Thiry, M. & Lafontaine, D. L. J. (2005): Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol.* 15: 194 – 199.
- Traut, W. (1976): Pachytene mapping in the female silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera). *Chromosoma* 108: 173 – 180.
- Traut, W., Sahara, K., Otto, T.D. & Marec, F. (1999): Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma* 108: 173 – 180.
- Traut W., Eickhoff, U., Schorch J.C. (2001): Identification and analysis of sex chromosomes by comparative genomic hybridization (CGH). *Methods Cell Sci.* 23: 155–161
- Troiano G. (1990): Karyotype and male meiosis of four species of *Roncus* (Pseudoscorpionida: Neobisiidae). *Boll. Zool.* 57:1-9
- Troiano G. (1997): Further studies on caryology of the pseudoscorpions of the gen. *Roncus*: the karyotype of *Roncus gestroi* and *Roncus belluati*. *Caryologia* 50:271-279
- Tsurusaki, N. (1982a): Chromosomes of the Japanese gagrellid, *Paraumbogrella huzitai* Suzuki (Gagrellidae, Opiliones, Arachnida). *Bul. Br. Arachnol. Soc.* 5: 397 – 398.
- Tsurusaki, N. (1985a): Geographic variation of chromosomes and external morphology in the *montanum*-subgroup of the *Leiobunum curvipalpe*-group (Arachnida, Opiliones, Phalangiidae) with special reference to its presumable proces sof riation. *Zool. Sci.* 2:767-783
- Tsurusaki, N. (1985b): Taxonomic revision of the *Leiobunum curvipalpe*-group (Arachnida, Opiliones, Phalangiidae) I. *Hikocola*-, *hiasai*-, *kohyai*-, and *platypenis*-subgroups. *J. Sci. Hiroshima Univ.* 24:1-42
- Tsurusaki, N. (1986b): Chromosomes of harvestmen (Opiliones, Arachnida): A review of ongoing research and method of chromosome observation. *Seibutsu Kyoza* 21: 33 – 49.

- Tsurusaki, N. (1989): Geographic variation of chromosomes in *Sabacon makinoi* Suzuki (Arachnida, Opiliones, Phalangiidae). III. *Leiobunum curvipalpe* subgroup. *Japan. J. Entomol.* 58: 761 – 780.
- Tsurusaki, N. (1993): Geographic variation of the number of B-chromosomes in *Metagagrella tenuipes* (Opiliones, Phalangiidae, Gagrellinae). *Mem. Queensland Mus.* 33: 659 – 665.
- Tsurusaki, N. (2007): Cytogenetics. In: Pinto-da-Rocha, R., Machado, G. & Giribet, G. (eds.): *Harvestmen – the biology of Opiliones*, Harvard University Press, Cambridge, USA.
- Tsurusaki, N. & Cokendolpher, J.C. (1990): Chromosomes of sixteen species of harvestmen (Arachnida, Opiliones, Caddidae and Phalangiidae). *J. Arachnol.* 18: 151 – 166.
- Tsurusaki, N. & Holmberg, R.G. (1986): Chromosomes of *Leiobunum japonicum japonicum* and *Leiobunum paessleri* (Arachnida, Opiliones). *J. Arachnol.* 14:123-125
- Tsurusaki, N. & Shimada, T. (2004): Geographic and seasonal variations of the number of B chromosomes and external morphology in *Psathyropus tenuipes* (Arachnida: Opiliones). *Cytogenet. Genome Res.* 106: 365 – 375.
- Turner, B.M., Birley, A.J. & Lavender, J. (1992): Histone H4 isoforms acetylated at specific lysine residues define individual chromosomes and chromatin domains in *Drosophila* polytene nuclei. *Cell* 69: 375 – 384.
- Utsumi, S., Takehisa, S. (1974): Heterochromatin differentiation in *Trillium kamtschaticum* by ammoniacal silver reaction. *Exp. Cell Res.* 86: 398 – 401.
- Varley, J.M., Macgregor, H.C., Nardi, I., Andrews, C. & Erba, H.P. (1980): Cytological evidence of transcription of highly repeated DNA sequences during the lampbrush stage in *Triturus cristatus carnifex*. *Chromosoma* 80, 289 – 307.
- Visintin, R. & Amon, A. (2000): The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 372 – 377.
- Vítková, M., Král, J., Traut, W., Zrzavý, J., Marec, F. (2005): The evolutionary origin of insect telomeric repeats, (TTAGG)_n. *Chromosome Res.* 13: 145–156, 2005.
- Wachtler, F. & Stahl, A. (1993): The nucleolus: a structural and functional interpretation. *Micron* 24: 473 – 505.
- Wakimoto, B.T. (1998): Beyond the nucleosome: epigenetic aspect of position-effect variegation in *Drosophila*. *Cell* 93: 321 – 324.
- Wallrath, L.L. (1998): Unfolding the mysteries of heterochromatin. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8: 147 – 153.
- Wang, S., Zhao, M. & Li, T. (2003): Complete sequence of the 10.3 kb silkworm *Attacus ricini* rDNA repeat, determination of the transcriptional initiation site and functional analysis of the intergenic spacer. *DNA Sequence* 14: 95 – 101.

- Warren, E. (1939): The genital system of *Hypoctonus formosus* (Butler). *Ann. Natal. Mus.* 9 (2): 307-344.
- Weiler, K.S., Wakimoto, B.T. (1995): Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* 29: 577 – 605.
- Weiss, M.M., Kuipers, E.J., Meuwissen, S.G., Diest P.J. van, Meijer G.A. (2003): Comparative genomic hybridisation as a supportive tool in diagnostic pathology. *J. Clin. Pathol.* 56: 522 – 527
- Westergaard, M. & Wettstein, D. von (1972): The synaptonemal complex. *Annu. Rev. Genet.* 6: 71 – 110.
- Wettstein, R. & Sotelo, J.R. (1971): The molecular architecture of synaptonemal complex. *Adv. Cell Mol. Biol.* 1: 109 – 152.
- Weygoldt, P. (1996a): The relationships of the southeast African whip spiders *Hemiphrynus machadoi* Fage, 1951 and *Phrynichus scullyi* Purcell, 1901: introduction of the new generic names *Xerophrynus* and *Phrynichodamon* (Chelicerata: Amblypygi). *Zool. Anz.* 235:117 – 130.
- Weygoldt, P. (1996b): Evolutionary morphology of whip spiders: towards a phylogenetic system (Chelicerata, Arachnida, Amblypygi). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 34:185 – 202.
- Weygoldt, P. (1999b): Spermatophores and the evolution of female genitalia in whip spiders (Chelicerata, Amblypygi). *J. Arachnol.* 27: 103 – 116.
- Weygoldt, P. (2000): Whip Spiders (Chelicerata: Amblypygi): Their biology, morphology, and systematics. Apollo Books, Stenstrup, Denmark.
- Weygoldt, P. & Paulus, H.F. (1979a): Untersuchungen zur Morphologie, Taxonomie und Phylogenie der Chelicerata. I. Morphologische Untersuchungen. *J. Zool. Syst. Evol. Forsch.* 17: 85 – 116.
- Weygoldt, P. & Paulus, H.F. (1979b): Untersuchungen zur Morphologie, Taxonomie und Phylogenie der Chelicerata. II. Cladogramme und die Entfaltung der Chelicerata. *J. Zool. Syst. Evol. Forsch.* 17: 177 – 200.
- Weygoldt, P. (1969). Citováno podle Weygoldt, P. (1999b): Spermatophores and the evolution of female genitalia in whip spiders (Chelicerata, Amblypygi). *J. Arachnol.* 27:103–116
- Wheeler, W.C. & Hayashi, C.Y. (1998): The phylogeny of the extant chelicerate orders. *Cladistics* 14:173 – 192.
- White 1954, WHITE, M. J. D. 1954. *Animal Cytology and Evolution*, 2nd edition. Cambridge University Press.
- White, M.D.J.(1973): *Animal Cytology and Evolution*, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge.
- Wilson, E.B. (1905). The chromosomes in relation to determination of sex in insects. *Science* 22, 500–502.
- Wilson, E.B., (1925): *The Cell in Development and Heredity*. 3 ed. - *MacMillan, New York*.