

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Ekologie



**Bc. Marie Altmanová**

**Evoluce karyotypů a určování pohlaví u leguánů (Squamata: Pleurodonta)**

Evolution of karyotype and sex determination in iguanas (Squamata: Pleurodonta)

Diplomová práce

Školitel: doc. Mgr. Lukáš Kratochvíl, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Martina Pokorná, Ph.D.

Praha, 2013



**Prohlášení:**

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

V Praze, 10. 8. 2013



## Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Lukáši Kratochvílovi za umožnění podílet se na tomto zajímavém projektu a za cenné rady a připomínky při psaní diplomové práce. Profesoru Petru Rábovi děkuji za možnost využít perfektně vybavenou Laboratoř genetiky ryb při Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR. Velký dík patří Martině Pokorné za veškerou pomoc s osvojením laboratorních postupů, vyhodnocením získaných výsledků, zejména však za vždy přátelskou a klidnou atmosféru. Michailu Rovatsosovi děkuji za pomoc a seznámení s metodou FISH. Martině Koubové děkuji za kolegiální přístup a vzájemnou podporu při řešení metodicky obdobného projektu. Poděkování za poskytnuté vzorky krve z několika druhů leguánů patří Janu Hříbalovi ze Stanice přírodovědců (Dům dětí a mládeže hl. m. Prahy). A děkuji také všem ostatním, kteří se podíleli na úspěšném splnění toho projektu.

Tento diplomový projekt byl finančně podpořen granty GA UK 591712 „Evoluce pohlavních chromosomů a karyotypů u leguánů (Squamata: Iguanidae *sensu lato*)“ a GA ČR 506/10/0718 „Evoluce pohlavně determinačních mechanismů šupinatých plazů: molekulárně cytogenetický test nezávislého vzniku pohlavních chromosomů“.

## Abstrakt

Šupinatí plazi obecně vykazují nebývalou variabilitu v karyotypu a způsobech určování pohlaví. Z těchto dvou hledisek lze nicméně leguány (Pleurodonta) považovat za poměrně konzervativní skupinu ještěřů. Dosavadní poznatky o této skupině dokládají pouze genotypově určené pohlaví s XY systémem pohlavních chromosomů, avšak u řady cytogeneticky zkoumaných druhů nebyly pohlavní chromosomy odhaleny klasickými metodami, zřejmě z důvodu jejich homomorfie. Významnější variabilita v karyotypu byla pozorována pouze u druhově bohatých rodů *Anolis*, *Liolaemus* a *Sceloporus*. Cílem této diplomové práce bylo prozkoumat genom dostupných druhů hlavních leguáních linií za použití klasických i molekulárně cytogenetických metod, pokusit se odkrýt synapomorfie v karyotypu hlavních monofil leguánů a odhalit pohlavní chromosomy.

Během řešení tématu diplomové práce byl potvrzen již dříve publikovaný popis karyotypu u 13 studovaných druhů a pro dalších osm druhů byl nově stanoven základní popis karyotypu. Chromosomy všech zkoumaných jedinců byly prověřeny použitím metod klasické i molekulární cytogenetiky. Do analýzy bylo zahrnuto 21 druhů pokrývajících celkem osm leguáních čeledí. Většina zkoumaných druhů sdílela pravděpodobný ancestrální karyotyp ( $2n=36$ ) této skupiny. Vyšetřením rozložení heterochromatinu na chromosomech a přítomnosti intersticiálních telomerických sekvencí (ITS) byla odhalena značná variabilita v distribuci signálů. Druhové zacílení studie však neumožnilo vysvětlení zjištěné variability fylogenetickým postavením jednotlivých druhů. Nově byl na základě heterochromatinizace detekován již známý nepárový pohlavní chromosom u pěti druhů leguánů, u čtyř z nich (z rodu *Anolis*) se jednalo o neopohlavní chromosom Y. U čeledi Opluridae byl získán jednotný vzor distribuce heterochromatinu i ITS a je možné zde usuzovat na apomorfii této linie. V karyotypu samce druhů *Oplurus fierinensis* a *O. grandidieri* byl pozorován rozdíl ve velikosti nejmenšího páru mikrochromosomů a jelikož tato heteromorfie nebyla patrná v karyotypu samice, mohlo by se jednat o pohlavní chromosomy.

**Klíčová slova:** cytogenetika, evoluce, heterochromatin, ITS, karyotyp, leguáni, neopohlavní chromosomy, Pleurodonta, pohlavní chromosomy, samčí heterogamie, telomery

## Abstract

Squamate reptiles in general possess an unusual variability in karyotype and sex determining mechanisms. However, in these two aspects, iguanas (Pleurodonta) are considered as a relatively conservative group of lizards. So far only genotypic sex determination with male heterogamety has been detected in this lineage. However, the sex chromosomes have not been revealed in many species by classical cytogenetics, probably due to their homomorphy. Significant variability in karyotype was observed only in the species-rich genera *Anolis*, *Sceloporus* and *Liolaemus*. The aim of this thesis was to investigate the genome of available species from the main iguanid lineages using classical and molecular cytogenetic methods. As well as finding the karyotype characteristics, which may represent synapomorphies of main iguanid lineages, the other aim was to try to identify sex chromosomes.

This study confirmed previously published karyotypes of 13 species and established new descriptions of karyotype for eight species. The chromosomes of all studied specimens were examined by methods of classical and molecular cytogenetics, 21 species covering eight iguanid families were analysed in this thesis. The majority of studied species shared the apparently ancestral karyotype of the group, with diploid chromosome number  $2n=36$ . Examination of the heterochromatin distribution and the presence of interstitial telomeric sequences (ITS) on chromosomes have revealed considerable variability in the distribution of signals. However, the selection of analysed species did not allow an explanation of observed variability by phylogenetic species position. For the first time, the accumulation of heterochromatin in five iguanid species was detected on the previously described sex chromosome Y. Four were neo-sex Y chromosomes in anoles. The members of family Opluridae share a nearly uniform pattern of heterochromatin distribution and ITS which may be a synapomorphy of this lineage. The heteromorphy in the size of the smallest pair of microchromosomes was noticed in the male karyotypes of species *Oplurus fierinensis* and *O. grandidieri*. As this heteromorphy was not apparent in female karyotype, it can therefore implicate sex chromosomes.

**Keywords:** cytogenetics, evolution, heterochromatin, iguanas, ITS, karyotype, male heterogamety, neo-sex chromosomes, Pleurodonta, sex chromosomes, telomeres

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>8</b>
1.1. Evoluce karyotypu plazů .....	8
1.2. Vznik a diferenciacce pohlavních chromosomů u plazů.....	9
1.2.1. Neopohlavní chromosomy .....	12
1.3. Charakteristika skupiny Pleurodonta .....	14
1.3.1. Obecná charakteristika .....	14
1.3.2. Pleurodonta z cytogenetického pohledu .....	16
<b>2. Cíle práce</b> .....	<b>20</b>
<b>3. Materiál a metodika</b> .....	<b>21</b>
3.1. Materiál.....	21
3.2. Příprava chromosomů.....	22
3.2.1. Odběr krevního vzorku .....	22
3.2.2. Kultivace leukocytů .....	23
3.3. Příprava skel a barvení chromosomů.....	24
3.3.1. Konvenční barvení – Giemsovo barvení.....	24
3.3.2. Diferenciální barvení – C-proužkování.....	24
3.3.3. Diferenciální barvení – AgNOR barvení .....	25
3.4. Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace .....	25
3.4.1. Sonda s telomerickou repetitivní sekvencí (TTAGGG) <sub>n</sub> .....	26
3.5. Zpracování a vyhodnocení výsledků .....	28
<b>4. Výsledky</b> .....	<b>31</b>
4.1. Popis karyotypu jednotlivých druhů skupiny Pleurodonta .....	32
4.1.1. <i>Anolis allisoni</i> .....	32
4.1.2. <i>Anolis carolinensis</i> .....	34
4.1.3. <i>Anolis coelestinus</i> .....	37



4.1.4. <i>Anolis cristatellus</i> .....	39
4.1.5. <i>Anolis cybotes</i> .....	41
4.1.6. <i>Anolis distichus</i> .....	43
4.1.7. <i>Anolis equestris</i> .....	45
4.1.8. <i>Anolis garmani</i> .....	48
4.1.9. <i>Anolis gingivinus</i> .....	51
4.1.10. <i>Anolis oculatus</i> .....	53
4.1.11. <i>Basiliscus plumifrons</i> .....	56
4.1.12. <i>Crotaphytus insularis</i> .....	58
4.1.13. <i>Cyclura nubila</i> .....	61
4.1.14. <i>Chalarodon madagascariensis</i> .....	63
4.1.15. <i>Laemanctus longipes</i> .....	66
4.1.16. <i>Leiocephalus carinatus</i> .....	69
4.1.17. <i>Oplurus fierinensis</i> .....	72
4.1.18. <i>Oplurus grandidieri</i> .....	75
4.1.19. <i>Petrosaurus thalassinus</i> .....	77
4.1.20. <i>Sceloporus variabilis</i> .....	80
4.1.21. <i>Uranoscodon superciliosus</i> .....	83
<b>5. Diskuze .....</b>	<b>86</b>
5.1. Evoluce karyotypu skupiny Pleurodonta.....	86
5.1.1. Akumulace heterochromatinu v genomu zkoumaných druhů .....	89
5.1.2. Odhalené aktivní organizátory jadérek u vybraných druhů .....	91
5.1.3. Distribuce telomerických sekvencí .....	92
5.2. Diferenciace pohlavních chromosomů .....	94
<b>6. Závěr.....</b>	<b>97</b>
<b>7. Literatura.....</b>	<b>99</b>
<b>8. Přílohy .....</b>	<b>110</b>



# 1. Úvod

## 1.1. Evoluce karyotypu plazů

Změna v karyotypu bývá jednou z nejnápadnějších změn během speciální události (White 1978). Olmo (2005) poukazuje na přímou souvislost karyotypové evoluce s druhovým zastoupením linie – čím je linie druhově bohatší, tím variabilnější je v karyotypu. Této skutečnosti si povšiml již White (1978), který chromosomální přestavby označuje za jeden z motorů speciace. Variabilita v karyotypu bývá často vysvětlována modelem kanalizace (Bickham & Baker 1979). Tato hypotéza představuje karyotyp (počet a morfologii chromosomů) jako důležitý adaptivní znak, přičemž pro každou linii se specifickou adaptivní zónou lze nalézt optimální karyotyp. V počátečním rychlém stádiu adaptivních změn patrně převládají chromosomální přestavby, které nejsou Robertsonského typu (především inverze). Poté následuje zpomalení evolučního tempa, které lze v karyotypu pozorovat jako přestavby Robertsonského typu (centrické fúze a štěpení), až posléze dojde ke stabilizaci karyotypu v jeho optimální formě. Kritické studie modelu kanalizace však například kromě dosud nepotvrzené adaptivní role chromosomálních představeb, upozorňují na skutečnost, že obvykle nelze rozpoznat, je-li pozorovaný karyotyp již ve své optimální fázi (Sites & Moritz 1987). Platnost modelu kanalizace tak není obecně přijímána.

Ve skupině Sauropsida (ptáci, krokodýli, želvy, hatérie a šupinatí plazi) se jednotlivé linie velmi liší v míře variability v uspořádání genomu. Podle Quymysoho (1994) má počet chromosomů vliv na výskyt rekombinace, která umožňuje větší variabilitu a s ní související větší možnost speciace. Tuto skutečnost může dokládat druhová diversifikovanost ptáků, jejichž karyotyp je tvořen velkým množstvím malých chromosomů (Burt 2002). Na rozdíl od savců, ptáci nicméně vykazují poměrně nízké tempo karyotypové evoluce (Tegelström et al. 1983, Ellegren 2010) a jsou tedy v uspořádání genomu poměrně konzervativní. Tento jev byl považován za unikátní vlastnost ptáků a spekulovalo se o tom, že by se mohlo jednat o evoluční novinku typickou jen pro tuto skupinu (Ellegren 2010). Nicméně konzervativnost mezi makrochromosomy ptáků a želv (Matsuda et al. 2005, Kasai et al. 2012) naznačuje, že tento jev by mohl být rozšířený na mnohem širší evoluční škále. S relativní stabilitou v počtu a morfologii

chromosomů se setkáváme také u krokodýlů (Kasai et al. 2012). Naproti tomu se některé skupiny šupinatých plazů (Squamata) karyotypovou rozmanitostí vyrovnají některým liniím velmi variabilních savců (Ferguson-Smith & Trifonov 2007, Ellegren 2010). Kromě parametru druhové bohatosti patrně závisí rychlost chromosomálních přestaveb i na kompozici genomu. Podle dosavadních znalostí jsou přestavby chromosomů nejčastěji lokalizovány do míst repetitivních sekvencí (Dobigny et al. 2004). Plazi obecně však mají v genomu oproti savcům repetitivních sekvencí poměrně malý podíl (shrnutí v Olmo 2008). Recentně pak bylo zjištěno, že pohlavní chromosom Z a tři páry autosomů z kura domácího (*Gallus gallus*) sdílí značnou syntenii s chromosomy vybraných druhů většiny hlavních linií šupinatých plazů (Pokorná et al. 2011, 2012). K divergenci ptačí linie a šupinatých plazů přitom došlo patrně již před 275 miliony let (Shedlock & Edwards 2009). Přes rozdíly v počtu nebo morfologii chromosomů tedy i šupinatí plazi sdílí značnou stabilitu v uspořádání genomu a celé velké bloky genomu zůstávají i přes značné evoluční divergence prakticky intaktní (Pokorná et al. 2012). Velká evoluční stáze v uspořádání ptačích genomů byla tedy nejspíše zděděna od společného předka a jedná se o společnou vlastnost celé skupiny Sauropsida (Pokorná et al. 2012).

## **1.2. Vznik a diferenciacce pohlavních chromosomů u plazů**

Určení pohlaví je jedním ze základních biologických procesů, které významně ovlivňují vývoj jedince a poměr pohlaví v populaci. U plazů se setkáváme se dvěma základními typy určování pohlaví. Prvním z nich je environmentálně určené pohlaví (ESD; *Environmental sex determination*), kde o pohlaví zygoty rozhoduje vliv vnějšího prostředí. Rozhodujícím faktorem vnějšího prostředí bývá zpravidla teplota (TSD; *Temperature dependent sex determination*), při níž je snůška inkubována (např. Bull 1980). Druhý mechanismus určování pohlaví je genotypově určené pohlaví (GSD, *Genetic sex determination*), kdy je pohlaví určeno prostřednictvím pohlavně specifických genů determinujících pohlaví vázaných na pohlavní chromosomy (Ohno 1967 a další).

Podle obecně uznávané hypotézy se pohlavní chromosomy patrně vyvinuly z autosomálního páru chromosomů vznikem genů determinujících pohlaví (Ohno 1967, Charlesworth 1991). V případě systému samčí heterogamie (XY) byl budoucí pohlavní chromosom Y odlišen vznikem dominantní alely genu determinující samčí pohlaví (např.

gen SRY – *sex-determining region Y* – u savců) od budoucího pohlavního chromosomu X (Charlesworth & Mank 2010). V oblasti chromosomu determinující pohlaví (X i Y) zároveň docházelo k akumulaci dalších pohlavně specifických a pohlavně antagonistických alel. U takto vzniklých počátečních stádií pohlavních chromosomů Y a X bylo nutné zamezit rekombinaci v oblasti genů determinujících pohlaví a předejít tak vzniku pohlavních hybridů či pohlavních revertantů s nižší fitness (Charlesworth 1996). Suprese rekombinace následně prohlubovala diferenciaci nepárového pohlavního chromosomu Y, který zpočátku rekombinoval podstatnou část chromosomu s identickým obsahem, jako měl protější pohlavní chromosom X, ale posléze byla tato oblast účastnicí se crossing-overu minimalizována pouze do tzv. pseudoautosomální oblasti (Herpin & Schartl 2009). Suprese rekombinace bývá zapříčiněna strukturními změnami, mezi které patří např. heterochromatinizace, inverze či delece (King 1993). V této pokročilé fázi diferenciaci většinou poté dochází k rozsáhlé degeneraci nerekombinující oblasti pohlavního chromosomu Y, neboť již není „opravována“ podle vzoru svého protějšku X (Herpin & Schartl 2009). Důsledky chromosomálních změn (např. inverze, delece či markantní amplifikace repetitivních sekvencí) nepárového pohlavního chromosomu se pak mohou projevit výrazným odlišením v morfologii tohoto chromosomu, hovoříme pak o heteromorfii páru pohlavních chromosomů (Ohno 1967). Podobné procesy postihující pohlavní chromosom Y se účastní i diferenciaci pohlavního chromosomu W. Párové pohlavní chromosomy X a Z naopak zůstávají více konzervativní, neboť nesou řadu nepostradatelných genů. Celý mechanismus vzniku pohlavních chromosomů je však mnohem komplexnější záležitostí zahrnující řadu evolučních procesů a výjimek.

S genotypově určeným pohlavím a přítomností diferenciovaných pohlavních chromosomů v genomu souvisí potřeba vyrovnat množství exprimovaných genů lokalizovaných na párovém pohlavním chromosomu u obou pohlaví. Tato kompenzace genové dávky byla nejlépe prostudována u modelových organismů – octomilky, háďátka a myši. U savců je kompenzace dosaženo umlčením jednoho z X chromosomů samice, octomilky naopak zvýší míru transkripce X v genomu samce a u háďátek dochází zhruba k poloviční míře transkripce obou chromosomů X samice (shrnuto v Mank 2009). Znalosti mechanismu kompenzace genové dávky u plazů jsou dosud velmi omezené, zkoumána byla pouze ptačí linie (např. Elegreen 2002, Itoh et al. 2007) – zejména zebřičky (*Taeniopygia guttata*) a kur domácí (*Gallus gallus*). Nicméně i u ptáků jsou znalosti

mechanismu kompenzace genové dávky zatím v počátcích, bylo však zjištěno, že se mechanismus liší od mechanismu zjištěného u výše zmíněných modelových organismů (Itoh et al. 2007). Ukazuje se totiž, že u ptáků ke kompenzaci, tak jak byla popsána výše, nedochází a je možné, že dávka jednotlivých genů je kompenzována individuálně, a to právě na genové úrovni (Elegreen 2002).

Vznik pohlavních chromosomů nezávisle z různých párů autosomů byl několikrát potvrzen u různých linií živočichů. Odlišný původ pohlavních chromosomů byl popsán u ptáků, hadů a savců (Matsubara et al. 2006), ale i na nižší taxonomické úrovni – například v některých liniích šupinatých plazů (Ezaz et al. 2009).

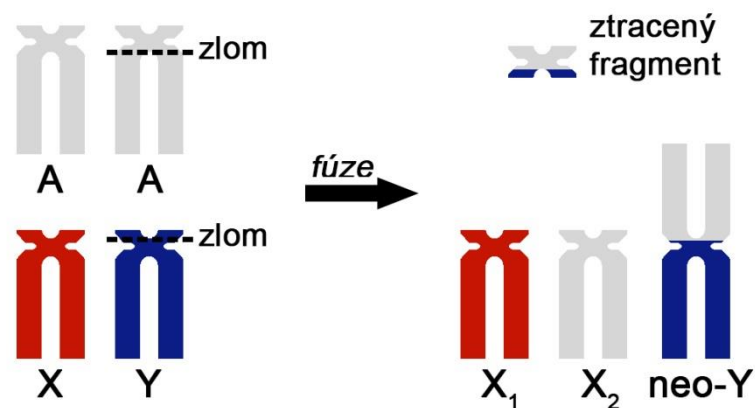
Šupinatí plazi představují skupinu s výjimečnou variabilitou v typech určování pohlaví, vyskytuje se zde ESD (ve formě TSD) i GSD. Z analýzy ancestrálního stavu determinace pohlaví u této skupiny (Pokorná & Kratochvíl 2009) vyplývá, že původním stavem zde bylo patrně ESD a z toho se několikrát vyvinulo GSD s různými typy pohlavních chromosomů. Potenciální přechod v opačném směru je podmíněn ztrátou pohlavních chromosomů či jejich reverzí zpět na autosomy. Organismus by však během toho procesu musel překonat omezení plynoucí ze ztráty pohlavně specifických genů či kompenzace genové dávky. Tento fakt by zřejmě vedl k nižší fitness heterogametického pohlaví (samce s XY či samice se ZW). Na základě těchto úvah a fylogenetické analýzy ancestrálních stavů pohlavně determinačních mechanismů pro jednotlivé skupiny amniotických obratlovců, byla formulována hypotéza nahlížející na pohlavní chromosomy jako na jakousi evoluční past (shrnutí v Pokorná & Kratochvíl 2009).

Jednotlivé linie šupinatých plazů se liší konzervativností ve způsobu determinace pohlaví a případném typu pohlavních chromosomů. Skupinami s velkou variabilitou jsou například gekoni (Gekkota; shrnutí v Gamble 2010) a agamy (Agamidae; Pokorná & Kratochvíl 2009, Ezaz et al. 2009), obě skupiny s ESD i GSD druhy. U gekonů pak byl potvrzen výskyt samčí (XY) i samičí (ZW) heterogamie, u agam pouze typ pohlavních chromosomů ZW. Mezi šupinatými plazy se však vyskytují i konzervativní linie zřejmě s jedním typem pohlavních chromosomů (Lacertidae, Varanidae a hadi se ZW a například Gymnophthalmidae, Pleurodonta, Scincidae a Teidae s XY; Ezaz et al. 2009, Pokorná & Kratochvíl 2009). U druhů, pro které jsou pohlavní chromosomy známy, byly tyto dosud obvykle detekovány na základě odlišnosti v morfologii anebo velikosti v rámci (heteromorfního) páru chromosomů. Řada druhů obojího typu pohlavních chromosomů má

však pohlavní chromosomy metodami klasické cytogenetiky nedetekovatelné (homomorfní). V těchto případech je pak pro jejich identifikaci a případné určení typu nutno přistoupit k použití molekulárních či molekulárně cytogenetických metod.

### 1.2.1. Neopohlavní chromosomy

Kromě základního typu samčí (XY) či samičí (ZW) heterogamie můžeme u některých organismů pozorovat složitější typ pohlavních chromosomů, tzv. neopohlavní chromosomy (z *neo-sex chromosomes*, syn. *multiple sex chromosomes*). Tyto odvozené systémy vznikly přestavbami mezi původními pohlavními chromosomy a autosomy. Zřejmě nejčastěji tuto úlohu sehrála Robertsonská translokace (Charlesworth et al. 2005; viz Obr. 1), při níž dochází k fúzi dvou jednoramenných chromosomů (tzn. telocentrických či akrocentrických) za vzniku metacentrického chromosomu (pozorováno např. u gekončíka *Coleonyx elegans*, Pokorná et al. 2010).



**Obr. 1** Obecný model vzniku neopohlavních chromosomů mechanismem Robertsonské translokace. AA – autosomy, XY – původní pohlavní chromosomy, X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>neo-Y – neopohlavní chromosomy.

Nicméně při vzniku neopohlavních chromosomů mohou být hlavním prvkem i reciproční translokace, štěpení či tandemové fúze (Yonenaga-Yassuda et al. 2005). Vzniklý systém neopohlavních chromosomů tak může obsahovat v případě samčí heterogamie  $X_1X_2Y$  (v případě fúze původního Y chromosomu s autosomem) či  $XY_1Y_2$  (pokud hlavním mechanismem vzniku bylo štěpení původního chromosomu Y) a podobně u samičí heterogamie  $Z_1Z_2W$  a  $ZW_1W_2$  (např. Kitano & Peichel 2012). Druhý chromosom z páru autosomů, který se neúčastnil fúze s původním Y chromosomem, posléze přebírá funkci nového chromosomu  $X_2$  a u samice tvoří systém pohlavních chromosomů  $X_1X_1X_2X_2$ .

Skutečnosti naznačující přítomnost neopohlavních chromosomů v karyotypu a možnosti jak je odhalit, je několik. Prvním markantním znakem je rozdíl v počtu chromosomů diploidní sady mezi pohlavími. Následně bývá nápadně odlišná velikost a morfologie neopohlavního chromosomu vzniklého fúzí od ostatních neopohlavních chromosomů. Zároveň v případě Robertsonské fúze může být tato přestavba detekována na základě vizualizace telomerických sekvencí v centromere nově vzniklého neopohlavního chromosomu, které mohou přetrvat v místě fúze (Slijepcevic 1998). Ne vždy však zůstávají tyto intersticiální telomerické sekvence zachovány, neboť jejich přítomnost v genomu vyžaduje zřejmě inaktivaci jejich telomerické funkce (Slijepcevic 1998). Při meiotickém párování je možno pozorovat trivalenty (např. tvořené chromosomy  $X_1X_2Y$ ) nebo i vícevalenty, pokud se jedná o složitější systém neopohlavních chromosomů.

Výskyt neopohlavních chromosomů v karyotypu plazů byl doposud odhalen pouze u některých želv, hadů a ještěřů (shrnuto v Ezaz et al. 2006). U ještěřů to byli především leguáni (u více než 30 druhů; Pleurodonta) a dále pak u menšího počtu druhů z čeledí Eublepharidae, Gymnophthalmidae, Lacertidae, Pygopodidae a Scincidae (Ezaz et al. 2009, Pokorná et al. 2010).

Neopohlavní chromosomy jsou v současné době jedním z hlavních předmětů studia mechanismů zodpovědných za diferenciaci a degeneraci nepárových pohlavních chromosomů. Jejich poměrně nedávný vznik u některých skupin organismů, tak umožňuje prozkoumat mechanismy diferenciaci nepárového pohlavního chromosomu v počátečním stádiu. Například u octomilky druhu *Drosophila miranda* nesoucí neo-Y vzniklý poměrně recentně (zřejmě teprve před jedním milionem let), Bachtrog et al. (2008) odhalili rychlou a masivní degeneraci tohoto nepárového chromosomu. Za hlavní mechanismy degenerace



byla považována akumulace repetitivních sekvencí a transponovatelných elementů, které se přednostně soustředily do oblasti neo-Y chromosomu homologické k neo-X (Bachtrog et al. 2008).

Z dosavadních znalostí o neopohlavních chromosomech není prozatím jasné, jestli jejich vznik je zapříčiněn predispozicí původního pohlavního chromosomu k fúzi s autosomem nebo zda se jedná o náhodný proces a není ani jasné, zda jejich vznik vždy přináší organismu významnou výhodu. Recentně publikovaná studie Kitana & Peichela (2012) uvádí u ryb možnou souvislost mezi častějším vznikem neopohlavních chromosomů s potřebou vytvořit mezidruhové bariéry v průběhu speciace. Nguyen et al. (2013) odhalili Z-vázané geny autosomálního původu u obaleče *Cydia pomonella* (Tortricidae). Tyto geny, jejichž produkty se účastní detoxifikace sekundárních metabolitů živných rostlin a zvyšují rezistenci vůči insekticidům, tak díky získané dědičnosti přes pohlavní chromosomy zřejmě výrazně zvýšily adaptivní potenciál těchto motýlů a napomohly tak jejich následné radiaci (Nguyen et al. 2013).

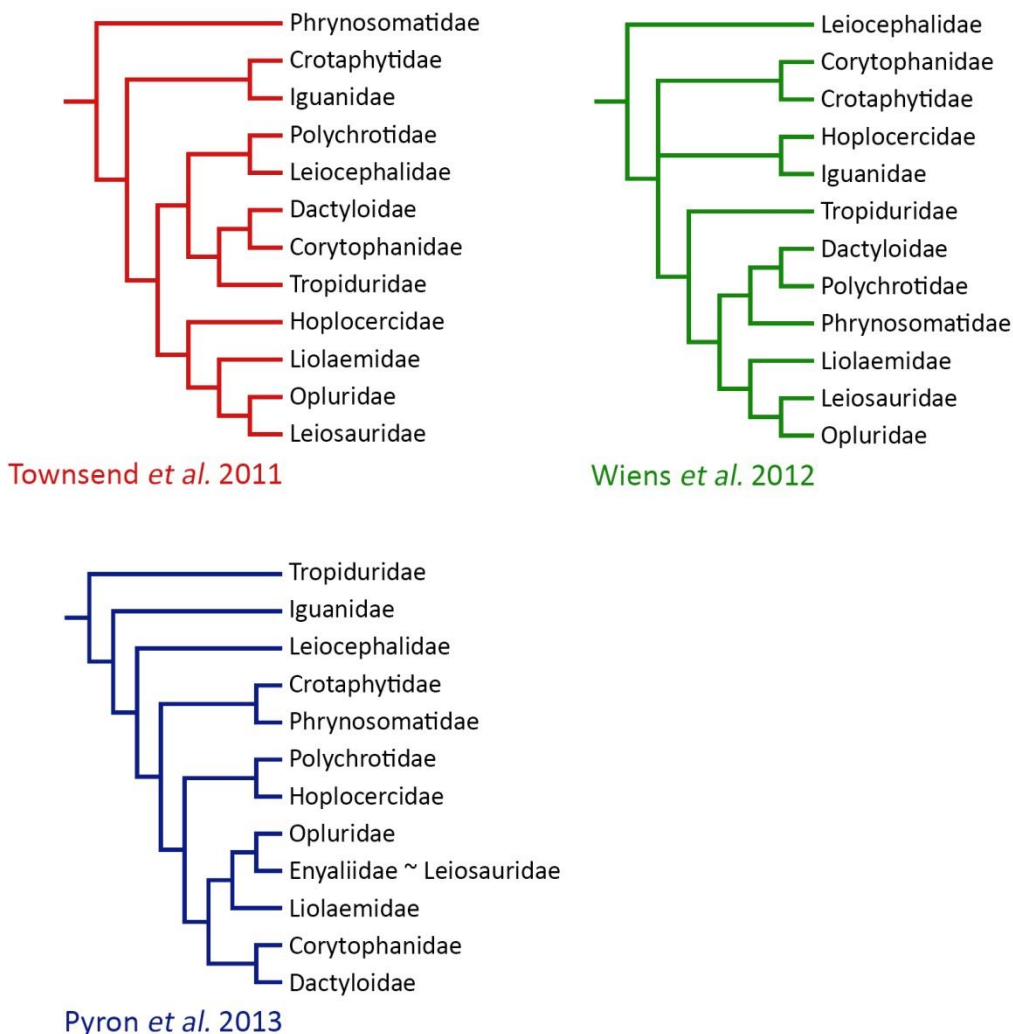
### **1.3. Charakteristika skupiny Pleurodonta**

#### **1.3.1. Obecná charakteristika**

Leguáni (Squamata: Pleurodonta) jsou vysoce diverzifikovanou skupinou čítající více než 1075 druhů (Uetz & Hošek 2013). Rozšíření těchto ještěřů zahrnuje především tropické a subtropické oblasti Nového světa, přičemž výjimku tvoří čeleď Opluridae, jejíž druhy jsou endemické na Madagaskaru, a některé druhy z čeledi Iguanidae *sensu stricto* vyskytující se na Galapágách a několika ostrovech v Tichomoří. Leguáni vynikají výjimečnou morfologickou variabilitou a v závislosti na ekologii daného druhu a obývaném prostředí se liší zejména velikostí, tvarem těla a relativní délkou končetin. V rámci pohlavního dimorfismu mívají samci některých linií, zejména leguáni *sensu stricto* a anolisi, nápadné hřebeny, hrdelní laloky či pestřejší zbarvení (Pough et al. 2004).

Fylogeneze skupiny Pleurodonta je doposud neustálená a rozřešení hlavních linií komplikuje patrně několik období rychlé radiace v evoluci této skupiny (Nicholson et al. 2012, Leaché & Sites 2009 a další). Tradičně je řazena do infrařádu Iguania spolu se dvěma akrodontními liniemi (Agamidae a Chamaeleonidae). Leguáni se od Acrodonta

odštěpili zhruba před 123 miliony let (Townsend et al. 2011) a jejich monofyletický charakter byl několikrát nezávisle podpořen (např. Macey et al. 1997, Okajima & Kumuzawa 2009). Původně byli leguáni členěni do osmi čeledí (např. Schulte & Moreno-Roark 2010). Následně byl však odhalen polyfyletický charakter čeledi Tropiduridae (byla rozdělena na čeledi Liolaemidae, Leiocephalidae a Tropiduridae) a čeledi Polychrotidae, která byla rozdělena na čeledi Leiosauridae, Polychrotidae (pouze rod *Polychrus*) a Dactyloidae (pouze rod *Anolis*). V nejnovějších fylogenetických studiích byla skupina shodně rozdělena do 12 monofyletických čeledí (viz Obr. 2), nicméně názory na jejich příbuznost nebyly dosud sjednoceny (Townsend et al. 2011, Wiens et al. 2012, Pyron et al. 2013).



**Obr. 2** Recentní hypotézy fylogenetické příbuznosti hlavních linií leguánů.

Rod *Anolis* reprezentující čeleď Dactyloidae čítá téměř 400 druhů, což bezmála tvoří polovinu druhového zastoupení celé skupiny Pleurodonta (Uetz & Hošek 2013). Druh *Anolis carolinensis* je prvním plazem (nezahrneme-li ptáky) se známou celogenomovou sekvencí (Alföldi et al. 2011). Tento rod je díky své konvergentní evoluci na Karibských ostrovech i pevnině ideální modelovou skupinou z hlediska studia evoluční ekologie a adaptivní radiace (např. Losos 2009). Můžeme zde nalézt řadu ekomorf s dobře oddělenými nikami, v závislosti na obývaném habitatu se lišících například délkou končetin, celkovou velikostí a morfologií těla (Losos 1990). Z fenotypového hlediska je tak patrná značná rozmanitost mezi jednotlivými druhy anolisů uvnitř fylogenetických linií v rámci rodu. Této rozmanitosti bylo dosaženo například vývojem ekomorf, ale zřejmě také i vlivem pro anolisy typické optické komunikace a s ní souvisejícími odlišnostmi ve fenotypu (např. různobarevná hrdélka). V uspořádání genomu by v rámci takto druhově bohaté linie nebyla překvapivá značná interspecifická variabilita v diploidním počtu a morfologii chromosomů (např. White 1978). Ve skutečnosti je však tato variabilita menší a odpovídá spíše fylogenetickým vztahům uvnitř rodu, kdy jednotlivé linie jsou v počtu diploidních chromosomů spíše konzervativní (viz Přílohy – Kladogram 1). Losos (2009) uvádí, že odlišnosti v optické komunikaci zabraňují velmi účinně mezidruhové hybridizaci. Evoluční tlak na vznik rozrůznění v karyotypu mezi blízce příbuznými druhy anolisů tak nemusel hrát zřejmě významnou roli při speciaci.

### **1.3.2. Pleurodonta z cytogenetického pohledu**

Leguáni jsou z hlediska klasické popisné cytogenetiky, oproti jiným liniím šupinatých plazů, poměrně dobře prozkoumanou skupinou. Karyotyp byl popsán již pro více než 300 druhů (Olmo & Signorino 2005). První leguání karyotyp publikoval Matthey v roce 1931 u druhu *Anolis carolinensis* (Gorman et al. 1967). Nicméně údaje o počtu chromosomů v diploidní sadě některých leguáních druhů můžeme nalézt již v práci Painterera (1921) pojednávající o spermatogenezi plazů. Typický leguání karyotyp je složený z 12 metacentrických makrochromosomů a 24 mikrochromosomů, tedy s 36 chromosomy v diploidní sadě (např. Leaché & Sites 2009). Tento karyotyp byl pozorován na bázi všech hlavních linií leguánů (s výjimkou čeledi Phrynosomatidae a Polychrotidae) a metodou maximální parsimonie byl počet chromosomů  $2n=36$  stanoven jako ancestrální (Altmanová 2011; viz Přílohy – Kladogram 1). Leguáni jsou v karyotypu poměrně

konzervativní na rozdíl od některých linií šupinatých plazů (Olmo & Signorino 2005), zvýšená variabilita v diploidním počtu a morfologii chromosomů byla popsána pouze u druhově bohatých rodů *Anolis* ( $2n=26-48$ ; Gorman 1973), *Liolaemus* ( $2n=28-48$ ; Aiassa et al. 2005) a *Sceloporus* ( $2n=22-40$ ; Leaché & Sites 2009). Nejnižší počet s  $2n=19$  chromosomy byl popsán u samce druhu *Polychrus acutirostris* (Polychrotidae; Bertolotto et al. 2001; samice s  $2n=20$  z důvodu přítomnosti neopohlavních chromosomů), oproti tomu nejvyšší počet v diploidní sadě  $2n=48$  byl objeven u druhu *Anolis monticola* (Dactyloidae; Webster et al. 1972). Základní morfologií leguáních chromosomů je metacentrický typ, v odvozených karyotypech jsou přítomné akrocentrické a subtelocentrické chromosomy. Mezi hlavní mechanismy přestaveb zodpovědných za evoluci karyotypu leguánů patří zejména centrické fúze a také centrická štěpení (např. Hall 1973). Řada odvozených karyotypů se však liší celkovým počtem ramének, což dokazuje přítomnost i jiných typů přestaveb – například pericentrické inverze (Bertolotto 2006). Celé sekvence přestaveb v karyotypu byly podrobně studovány u chromosomálních ras druhů *Sceloporus grammicus* (Phrynosomatidae; Hall 1973, Sites 1983), *Liolaemus monticola* (Liolaemidae; Lamborot 1991, Lamborot & Alvarez-Sarret 1993) a *Anolis grahmi* (Dactyloidae; Blake 1986). V minulosti u společného předka druhů z čeledi Phrynosomatidae patrně došlo k translokaci jednoho páru mikrochromosomů na jiný chromosomy ( $2n=34$ ), a tak jako jediná leguáni čeleď (pomineme-li diskutovanou čeleď Polychrotidae) vykazuje původní karyotyp odlišný od ancestrálního leguániho. Z analýzy ancestrálního stavu diploidního počtu chromosomů (Altmanová 2011; viz Přílohy – Kladoqram 1) je patrný trend ke snižování diploidního počtu ve všech druhově bohatých rodech (s výjimkou několika ojedinělých druhů a nejodvozenější linie rodu *Anolis*, kde došlo v karyotypu ke štěpení).

Většina druhů se známým karyotypem byla vyšetřena pouze klasickými cytogenetickými metodami s poměrně nepříliš častým použitím diferenciálního barvení a odvozenějších cytogenetických metod. V rámci skupiny Pleurodonta byla dosud prozkoumána akumulace heterochromatinu v genomu pouze u některých druhů z čeledi Dactyloidae (pouze u druhu *Anolis grahmi*, Blake 1986), Enyaliidae (Pellegrino et al. 1999, Bertolotto et al. 2002), Liolaemidae (Bertolotto et al. 1996, Hernando 2003) a Tropicuridae (Kasahara et al. 1983, 1987a, 1987b, 1996; Yonenaga-Yassuda et al. 1988, Pellegrino et al. 1994). Heterochromatin byl lokalizován převážně do pericentromerické

oblasti chromosomů. Poměrně lépe je prozkoumaná přítomnost organizátorů jadérka (NOR). Lokalizace NORů v karyotypu je vysoce dědičným znakem (např. Leaché & Sites 2009) a její změna může odhalit přestavby, které nelze detekovat pomocí konvenčního barvení. Výskyt NORů v karyotypu leguánů poměrně dobře prozkoumali Porter et al. (1991, 1994), nicméně ancestrální pozici NORů se nepodařilo jednoznačně určit a poměrně variabilní rozmístění bylo pozorováno i uvnitř čeledi Phrynosomatidae. Konečně distribuci telomerických sekvencí uvnitř genomu leguánů se zatím zabývaly pouze dvě případové studie s celkem pěti zahrnutými druhy náležícími do čeledi Phrynosomatidae (Meyne et al. 1990) a Polychrotidae (Bertolotto et al. 2001), ve kterých byly odhaleny intersticiální signály na makrochromosomech u tří druhů – *Sceloporus olivaceus*, *Cophosaurus texanus* (shodně na posledních třech párech makrochromosomů) a *Polychrus acutirostris* (v pericentromerické oblasti čtyř makrochromosomálních párů).

Ze studie fylogeneze pohlavně determinačních mechanismů šupinatých plazů (Pokorná & Kratochvíl 2009) vyplývá, že leguáni jsou poměrně konzervativní ve způsobu určování pohlaví a typu pohlavních chromosomů (pouze GSD se samčí heterogamií). U mnohých druhů však nebyly pohlavní chromosomy detekovány konvenčním barvením, patrně z důvodu jejich homomorfie. Nicméně, pomocí molekulární metody kvantitativní PCR byla odhalena rozdílná dávka X-vázaných genů mezi pohlavími studovaných druhů (Rovatsos, Altmanová, Pokorná a Kratochvíl, dosud nepublikovaný rukopis) a potvrzena existence sekvenčně dobře diferenciovaných pohlavních chromosomů.

Kromě pohlavních chromosomů XX/XY je pro leguány charakteristická přítomnost odvozeného systému neopohlavních chromosomů  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  vzniklých patrně fúzí původního Y chromosomu s autosomálním párem (Cole et al. 1967). Díky tomuto procesu může být vzniklý neopohlavní chromosom Y dobře rozeznatelný v karyotypu i s použitím pouze konvenčního barvení na základě velikosti a rozdílné morfologie. Tato skutečnost tak již dříve umožnila identifikovat neopohlavní Y chromosom u některých druhů z rodů *Anolis* (např. Gorman 1973), *Liolaemus* (např. Núñez et al. 2003), *Phymaturus* (např. Lamborot & Navarro-Suarez 1984), *Polychrus* (v karyotypu druhu *P. marmoratus* je neo-Y největším a jediným metacentrickým chromosomem mezi akrocentriky; Bertolotto et al. 2001), *Sceloporus* (např. Cole et al. 1967, Hall 1973) a *Tropidurus* (Kasahara et al. 1987b, Kasahara et al. 1996). Distribuce a typ detekovaných pohlavních chromosomů napříč skupinou Pleurodonta jsou zobrazeny na Kladogramu 2 v Přílohách, analýza

současně poukazuje na patrně několikanásobný nezávislý vznik neopohlavních chromosomů.

## 2. Cíle práce

- Získat kvalitní cytogenetické preparáty z vybraných zástupců dostupných čeledí leguánů
- Sestavit karyotypy, nejlépe pro obě pohlaví zkoumaných druhů
- Prozkoumat míru akumulace a distribuce heterochromatinu v genomu napříč studovanými liniemi
- Vyšetřit genomy pomocí molekulárně cytogenetické metody fluorescenční *in situ* hybridizace se specifickou telomerickou sondou
- Pokusit se odhalit pohlavní chromosomy metodou diferenciálního barvení
- Pokusit se najít cytogenetické synapomorfie monofyl v rámci leguánů
- Posoudit dynamiku karyotypové evoluce skupiny

### 3. Materiál a metodika

#### 3.1. Materiál

Do analýzy bylo zahrnuto 40 jedinců z 21 druhů leguánů *sensu lato* (syn. Pleurodonta) pokrývajících celkem osm leguáních čeledí, jmenovitě: *Anolis allisoni*, *A. carolinensis*, *A. coelestinus*, *A. cristatellus*, *A. cybotes*, *A. distichus*, *A. equestris*, *A. garmani*, *A. gingivinus*, *A. oculatus* (Dactyloidae); *Basiliscus plumifrons*, *Laemanctus longipes* (Corytophanidae); *Crotaphytus insularis* (Crotaphytidae); *Cyclura nubila* (Iguanidae s.s.); *Chalarodon madagascariensis*, *Oplurus fierinensis*, *Oplurus grandidieri* (Opluridae); *Leiocephalus carinatus* (Leiocephalidae); *Petrosaurus thalassinus*, *Sceloporus variabilis* (Phrynosomatidae); *Uranoscodon superciliosus* (Tropiduridae). Výběr druhů byl proveden na základě fylogenetického postavení ve skupině Pleurodonta a jejich dostupnosti. Snahou bylo pokrýt všechny hlavní linie této skupiny alespoň jedním druhem, a pokud to bylo možné tak zahrnout obě pohlaví. Větší pozornost je věnována druhově nejpočetnějšímu rodu *Anolis*, u něhož bylo analyzováno celkem 10 druhů. Jedinci byli získáni z legálních importů a od chovatelů. Vzorek krve z jedinců druhu *Laemanctus longipes*, *Basiliscus plumifrons* a *Cyclura nubila* byl pořízen ve spolupráci se Stanicí přírodovědců (Dům dětí a mládeže hl. m. Prahy), kde tyto ještěry chovají.

Všechna zvířata zařazená do této studie byla umístěna v akreditovaných chovech Přírodovědecké fakulty, UK (č. akreditace 24773/2008-10001). Zvířata byla chována v teráriích velikostí a vnitřním vybavením odpovídajícím požadavkům a normám pro chov daného druhu (UV spektrum pro slunění, substrát, úkryty a dekorace odpovídající biotopům). Krmena byla dvakrát týdně *ad libitum*, s pravidelným doplňkem vitamínů a minerálů podávaných spolu s vodou.



**Tab. 1** Přehled studovaných druhů, počty zahrnutých jedinců a hodnocených metafází

Druh	Počet samic	Počet hodnocených metafází	Počet samců	Počet hodnocených metafází
<i>Anolis allisoni</i>	0	0	1	18
<i>Anolis carolinensis</i>	2	10	1	9
<i>Anolis coelestinus</i>	0	0	1	9
<i>Anolis cristatellus</i>	0	0	1	17
<i>Anolis cybotes</i>	0	0	1	12
<i>Anolis distichus</i>	0	0	1	18
<i>Anolis equestris</i>	1	6	1	7
<i>Anolis garmani</i>	1	6	2	9
<i>Anolis gingivinus</i>	0	0	1	12
<i>Anolis oculatus</i>	1	2	1	18
<i>Basiliscus plumifrons</i>	1	5	0	0
<i>Crotaphytus insularis</i>	1	11	1	15
<i>Cyclura nubila</i>	1	4	1	3
<i>Chalarodon madagascariensis</i>	2	6	2	12
<i>Laemanctus longipes</i>	1	14	2	16
<i>Leiocephalus carinatus</i>	2	13	2	7
<i>Oplurus fierinensis</i>	1	15	1	31
<i>Oplurus grandidieri</i>	0	0	1	40
<i>Petrosaurus thalassinus</i>	1	23	1	24
<i>Sceloporus variabilis</i>	1	16	1	18
<i>Uranoscodon superciliosus</i>	1	30	0	0

## 3.2. Příprava chromosomů

U plazů se při získávání chromosomů v drtivé většině případů využívá nativních preparátů z kostní tkáně, gonád a jiných orgánů či kultivace leukocytů a fibroblastů (např. Gorman 1965, Castiglia et al. 2013 a další). V této práci byly chromosomové preparáty získány metodou kultivace leukocytů z odebrané periferní krve (podle Pokorná 2007). Tato metoda byla zvolena, neboť se jedná o metodu nedestruktivního charakteru, s poměrně dobrou výtěžností a kvalitou chromosomů.

### 3.2.1. Odběr krevního vzorku

Vzorek krve byl odebrán pomocí sterilní heparinované inzulinové stříkačky o objemu 1 ml s fixní jehlou. Množství odebrané krve záviselo na velikosti jedince a objem

krve byl v rozmezí 50 až 200  $\mu$ l. Odběr byl proveden z ocasní žíly (*vena caudata*) uložené v blízkosti páteře na ventrální straně ocasu. Místo vpichu bylo lokalizováno do střední části ocasu a bylo předem ošetřeno desinfekcí (Cutasept, BODE).

### 3.2.2. Kultivace leukocytů

Metoda kultivace leukocytů spočívá ve stimulaci mitotického dělení T-lymfocytů pomocí rostlinného lektinu fytohemaglutininu. Jako dostačující inokulum bylo experimentálně zjištěno již 50  $\mu$ l krve. Vzorek krve byl inokulován do 5 ml kompletního kultivačního média ve sterilním prostředí laminárního boxu. Kultivační médium je složeno z 90 ml základního média D-MEM podporujícího růst buněk (Sigma-Aldrich, D5546), ke kterému je přidáno 10 ml fetálního telecího séra (Biochrom, S 0115), 1 ml roztoku penicilinu streptomycinu (Gibco, 15140-122), 3 ml fytohemaglutininu (Gibco, 10576-015), 1 ml 200mM L-glutaminu (Sigma-Aldrich, G7513) a 1 ml roztoku lipopolysacharidu (Sigma-Aldrich, L4005; ředěno 10 mg/1 ml dest. vody). Zkumavky byly následně uloženy v šikmé poloze vhodné pro proliferaci buněk do termostatu vyhřátém na teplotu 30 °C. Po sedmi dnech kultivace byly kultury sklizeny. K synchronizaci a zastavení buněčného dělení leukocytů ve stádiu metafáze bylo použito 35  $\mu$ l kolcemidu (Roche, 10295892001) pro každou kulturu, který se nechal působit tři a půl hodiny v termostatu při 30 °C. Následně byla suspenze zcentrifugována (10 min / 12 000 otáček, při pokojové teplotě). Po odsátí supernatantu byly buňky resuspendovány a hypotonizovány roztokem 0,075M KCl po dobu 30 minut při teplotě 37 °C. Poté následovala příprava (tzv. „předfixace“) suspenze na fixaci, při níž bylo do každé suspenze kápnuto několik kapek fixačního roztoku (methanol a kyselina octová v poměru 3:1). Následovala tři opakování: centrifugace (10 min / 12 000 otáček při 4 °C), odsátí supernatantu, dolití fixačním roztokem do 5 ml, fixace po dobu 20 minut při 4 °C. Poté následovalo závěrečné zcentrifugování a odsátí nebo naředění suspenze pro získání optimální denzity preparátu. Takto připravené preparáty byly kapány na skla a suspenze uloženy při -20 °C pro další použití.

### **3.3. Příprava skel a barvení chromosomů**

Podložní skla byla omyta roztokem denaturovaného ethanolu smíšeného s 31% kyselinou chlorovodíkovou v poměru 24:1. Na suché sklo bylo vždy kápnuto přibližně 15  $\mu$ l suspenze a stejné množství čerstvě připravené fixace.

#### **3.3.1. Konvenční barvení – Giemsovo barvení**

Konvenční barvení umožňuje homogenní vizualizaci chromosomů a je vhodné pro klasifikaci a určení počtu chromosomů. V této studii bylo použito pro přímé obarvení chromosomů, z nichž byl následně sestaven karyotyp. Skla byla barvena v 3% roztoku Giemsy (Merck, 109204) ve fosfátovém pufru (14,28 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  / 600 ml dest. vody a 3,6 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  / 400 ml dest. vody) po dobu 10 min. Poté byla dobře omyta destilovanou vodou a usušena ve vertikální poloze.

#### **3.3.2. Diferenciální barvení – C-proužkování**

Diferenciální barvení neboli proužkování je využíváno k vizualizaci podélných sekvencí proužků na chromosomu díky jejich různé intenzitě zabarvení. Pomocí metody C-proužkování lze odhalit heterochromatinové bloky na chromosomech. Tyto úseky bývají často lokalizovány do oblasti centromery či mohou tvořit podstatnou část nepárového pohlavního chromosomu. V některých případech může být toto diferenční barvení velmi užitečné při párování chromosomů do karyotypu. V této studii bylo C-proužkování primárně využito za účelem odhalit pohlavní chromosomy.

Skla s nakapanou suspenzí se nejprve ponechala 60 minut na topné plotýnce vyhřáté na 60 °C (tzv. „aging“). Následně po vychladnutí skel bylo na chromosomy působeno 0,2 N HCl po dobu 20 minut při pokojové teplotě. Toto působení bylo ukončeno oplachem v destilované vodě. Následně byly chromosomy denaturovány 4,5 minuty v nasyceném roztoku  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  vyhřátém na 45 °C. Přebytky hydroxidu byly z preparátů odmyty oplachem v 0,2N HCl a následovala zpětná renaturace chromosomů při 60 °C v solném prostředí pufru 2x SSC (4,38 g 0,3M NaCl a 2,2 g  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$  v 500 ml dest. vody) po dobu 60 minut. Skla se na závěr opláchla destilovanou vodou a ponechala oschnout ve

vertikální poloze. Chromosomy pak byly obarveny barvicí směsí DAPI (Vector Laboratories, H-1200) a pozorovány fluorescenčním mikroskopem.

Zpočátku bylo ve studii použito pro obarvení chromosomů s aplikovaným C-proužkováním Giemsovo barvivo. Lokalizace heterochromatinu se shodovala jako při použití barviva DAPI, nicméně DAPI poskytovalo silnější signál a proto bylo následně použito u všech vzorků. Pouze u samce druhu *Anolis oculatus* a obou pohlaví druhu *Petrosaurus thalassinus* byly v obrazové dokumentaci použity původní metafáze barvené Giemsou z důvodu lepšího rozložení chromosomů.

### 3.3.3. Diferenciální barvení – AgNOR barvení

Stříbření (AgNOR) je metoda diferenciálního barvení umožňující odhalit oblast aktivních ribosomálních genů tvořící organizátor jádérka (*Nucleolus organizer regions*, NOR). Na přítomnost aktivního NORu může během mikroskopického pozorování upozornit nedokonalé obarvení úseku chromosomu či výskyt sekundární konstrikce, která bývá v této oblasti přítomna (např. Therman-Suomalainen 1949). K samotné vizualizaci je použita impregnace koloidním stříbrem (podle Howell & Black 1980), které se pak jeví jako velmi tmavý signál.

Nejprve byl preparát standardně nakapán na podložní sklíčko a obarven Giemsovým barvivem. Po uschnutí bylo sklíčko umístěno na plotýnku vyhřátou na 60 °C a aplikovány tři kapky želatiny a šest kapek roztoku dusičnanu stříbrného. Takto vzniklá směs byla zakryta krycím sklem, což umožnilo rovnoměrné pokrytí vzorku barvicí směsí. Želatina byla připravena smísením 1 g želatiny (Sigma, G1890) s 0,5 ml 99,7% kyseliny mravenčí v 50 ml dest. vody. K přípravě roztoku dusičnanu stříbrného bylo použito 1 g AgNO<sub>3</sub> a 2 ml dest. vody. Dostatečné obarvení chromosomů signalizovalo cibulové zbarvení preparátu pod krycím sklem. Následovalo odmytí krycího skla a přebytečné barvicí směsi dest. vodou.

## 3.4. Fluorescenční *in situ* hybridizace

Principem hybridizační techniky *in situ* je navázání specifické nukleotidové sekvence (sondy) na komplementární úsek DNA na chromosomu a její následné detekci. Touto

metodou je možné poměrně přesně lokalizovat a identifikovat vybranou sekvenci na chromosomu. Značení sondy lze provést několika způsoby, nejpoužívanější je však značení nukleotidů pomocí fluorochromů (odtud označení fluorescenční *in situ* hybridizace, FISH). Při FISH jsou sondy složeny z nukleotidů se zainkorporovaným fluorochromem signalizujícím v jiné části spektra než vyzařuje fluorochrom použitý k podbarvení chromosomů, což při detekci umožňuje odlišit specifický signál za použití příslušných filtrů na fluorescenčním mikroskopu.

### **3.4.1. Sonda s telomerickou repetitivní sekvencí (TTAGGG)<sub>n</sub>**

V této práci byla použita fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) se značenou telomerickou sondou. Tato sonda byla složena z repetitivních sekvencí oligonukleotidů (TTAGGG)<sub>n</sub> odpovídajícím konzervativním telomerickým sekvencím obratlovců.

Sonda byla připravena pomocí PCR reakce s použitím komerčně dodávaného oligonukleotidu (TTAGGG)<sub>5</sub> a k němu komplementárního (CCCTAA)<sub>5</sub> (Macrogen, Korea; oligonukleotidy byly použity jako primery i templátová DNA) a PCR kitu (Bioline, BIO-21040). Značení bylo provedeno v téže reakci zainkorporováním nukleotidů s navázaným biotinem (Roche, 11093070910). Výsledek reakce byl následně ověřen na 1% agarózové elektroforéze. Poté byla sonda přečištěna od nespecifických oligonukleotidů pomocí kompetitorové DNA z lososích spermií (Fluka, 31149-10G-F) a RNA z kvasinek (Applied Biosystems, AM7/20G). Připravená sonda byla uskladněna při teplotě -20 °C.

Skla byla odmaštěna a zbavena případných nečistot v kyvetě s jarovou vodou, opláchnuta dest. vodou a následně ještě opláchnuta roztokem denaturovaného lihu a kyseliny chlorovodíkové (v poměru 24:1). Následovalo nakapání suspenze a po zaschnutí byly takto připravené preparáty uloženy do inkubátoru o teplotě 37 °C na tzv. „aging“ minimálně na 24 hodin.

Preparáty byly zvlhčeny v roztoku 2x SSC a následně bylo na jeden preparát použito 1 μl enzymu ribonukleázy A (10 mg/ml, Sigma-Aldrich, R-6513) ve 100 μl 2x SSC. Preparát byl následně přikryt kouskem parafilmu odpovídajících rozměrů a funkce enzymu byla podpořena inkubací při 37 °C. Tato aplikace je nezbytná k odstranění RNA, která by mohla navázat aplikovanou sondu a způsobit nespecifické signály při detekci. Enzym byl

následně odmyt třikrát 5 minut v 2x SSC. Dalším krokem byla aplikace pepsinu (Sigma-Aldrich, 15140-122), který štěpí látky peptidového charakteru a jeho použití opět pomáhá odstranit nespecifické pozadí při detekci. Roztok enzymu o objemu pro jedno sklo byl připraven smísením 3  $\mu$ l roztoku pepsinu (0,1 g pepsinu komerčně dodávaného v 1 ml dest. vody), s roztokem 10  $\mu$ l 1 HCl v 1 ml dest. vody. Připravený pepsin byl napipetován v množství 100  $\mu$ l na preparát, přikryt parafilmem a inkubován 10 min ve 37 °C. Skla byla poté omyta třikrát 5 minut ve fosfátovém pufru (PBS, o složení 5 g NaCl, 0,125 g KCl, 0,125 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  a 0,72 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  v 500 ml dest. vody). Následně byla skla inkubována v 1% formaldehydu po dobu 10 minut. Roztok formaldehydu byl připraven smísením 2,7 ml 35% formaldehydu (Sigma-Aldrich, 40052-438-M1000-1), 250  $\mu$ l 1M  $\text{MgCl}_2$ , doplněno PBS do 100 ml a pH ustáleno na hodnotu 7,4. Po pětiminutovém oplachu v PBS následovala dehydratace skel v etanolové řadě (70%, 85%, 96% etanol; vždy 5 minut) a sušení ve vertikální poloze. Následoval klíčový krok – denaturace chromosomového materiálu v 70% formamidu po dobu 3 minut při teplotě 75 °C. Roztok formamidu obsahoval 70 ml 100% formamidu (Sigma-Aldrich, 47671-1L-F), 10 ml 20x SSC a 20 ml dest. vody. Po denuraci byla skla opláchnuta v 2x SSC, dehydratována v etanolové řadě (viz výše) a po oschnutí byla připravena k aplikaci sondy a její hybridizaci s chromosomy.

Sonda byla denaturována 6 minut v termobločku vyhřátém na 75 °C a poté ihned přenesena na led. Po 10 minutách byla lehce zvortexována a na každé sklo bylo nakapáno 10  $\mu$ l sondy a přikryto krycím sklíčkem o rozměrech 24x24 mm. Preparáty se sondou hybridizovaly přes noc ve vlhkém prostředí inkubační komůrky při 37 °C.

Druhý den byla skla inkubována ve 2x SSC (přibližně 3 minuty), při tomto kroku došlo ke zvlhčení skel a následnému uvolnění krycích sklíček, které již nebylo potřeba mechanicky odstranit a nedošlo tak k poškození preparátu. Následně byl odmyt přebytek nenávané sondy v roztoku 50% formamidu (250 ml formamidu, 50 ml 20x SSC, 200 ml dest. vody), třikrát 5 minut, při teplotě 42 °C. Následoval oplach dvakrát 5 minut v 2x SSC a 5 minut v roztoku detergentu 4xT (200 ml 2x SSC, 500  $\mu$ l Tween20 (Sigma, P9416), 800 ml dest. vody). Preparáty pak byly ošetřeny 100  $\mu$ l roztoku blokátoru (Roche, 11096176001; 2,5 g blokátoru, 5 ml 20x SSC, 45 ml dest. vody, pH=6,5), přikryty parafilmem a inkubovány 30 minut ve 37 °C. Blokátor se používá k překrytí celého preparátu lehkou vrstvou a následně aplikovaný fluorochrom se může vázat pouze na místa vystupující nad úroveň hladiny blokátoru, tedy na navázanou sondu. Po rychlém oplachu

v detergentu 4xT byl aplikován fluorescein Avidin D (Vector-Lab, A-2001; rozpuštěno 5 µg v 1 ml blokátoru), 100 µl na preparát, překryt parafilmem a inkubován 30 minut v tmavé komůrce při 37 °C. Přebytek fluorochromu byl odmyt třikrát 5 minut v detergentu 4xT. Následně byly použity protilátky vázající se na fluorescein poskytující další vazebná místa pro tento fluorochrom, čímž dochází k amplifikaci signálu. Protilátky Anti-Avidin D (Vector-Lab, BA-0300) byly aplikovány v množství 100 µl (koncentrace 5 µg/ml v blokátoru) na preparát, skla přikryta parafilmem a inkubována v tmavé komůrce 20 minut při 37 °C. Poté byly nenavázané protilátky odmyty třikrát 5 minut v detergentu 4xT. Proces aplikace fluorochromu, odmyvání a aplikace protilátek byl zopakován a zakončen závěrečnou aplikací fluorochromu, což posloužilo jako dostatečná amplifikace signálu navázané sondy ve specifických oblastech chromosomu. Následovalo dvakrát 5 minut odmytí v detergentu 4xT, oplach 5 minut v PBS a etanolová řada. Po oschnutí skel byly chromosomy podbarveny barvicí směsí DAPI a přikryty krycím sklem o rozměrech 24x50 mm. Preparáty byly analyzovány na fluorescenčním mikroskopu s použitím dvou filtrů – pro DAPI a pro fluorescein.

### **3.5. Zpracování a vyhodnocení výsledků**

Chromosomové preparáty byly prohlíženy na fluorescenčním mikroskopu Provis AX 70 Olympus a několik skel bylo nasnímáno pomocí mikroskopu (AxioImager.Z2, Zeiss) s automatickým vyhledávačem metafází (Metafer-MSearch, MetaSystems). Jednotlivé hodnocené metafáze byly zachyceny kamerou CDD Olympus při použití imerzního 100x objektivu. Snímky byly zpracovány v programu MicroImage. Karyotyp byl sestaven pomocí programu Ikaros a Isis MetaSystems. Snímky metafází s C-proužky byly barevně invertovány v Adobe Photoshop CS6. Signály z telomerické sondy byly převedeny na červenou barvu (ačkoliv fluorescein signalizuje v zeleném spektru), která je lépe okem rozeznatelná od modře vizualizovaných chromosomů. Pro tisk musela být většina karyotypů zvětšena, aby bylo možné zviditelnit i nejmenší mikrochromosomy. Uvedené měřítko je vždy ve správném poměru vůči dodatečnému zvětšení.

Chromosomy byly klasifikovány dle morfologie, umístění centromery a délky ramen chromosomu (podle Levan et al. 1964) na: metacentrické, submetacentrické, subtelomerické a akrocentrické. K popisu karyotypu byl též použit počet chromosomových

ramen NF (*Nombre fondamental*), který může poukazovat na centrické fúze (Matthey, 1945) či disociace. Pro jednoduchost popisu částí chromosomu bylo použito konvenční označení ramének p (pro krátká raménka – orientována nad centromerou) a q (pro dlouhá raménka – orientována pod centromerou).





## 4. Výsledky

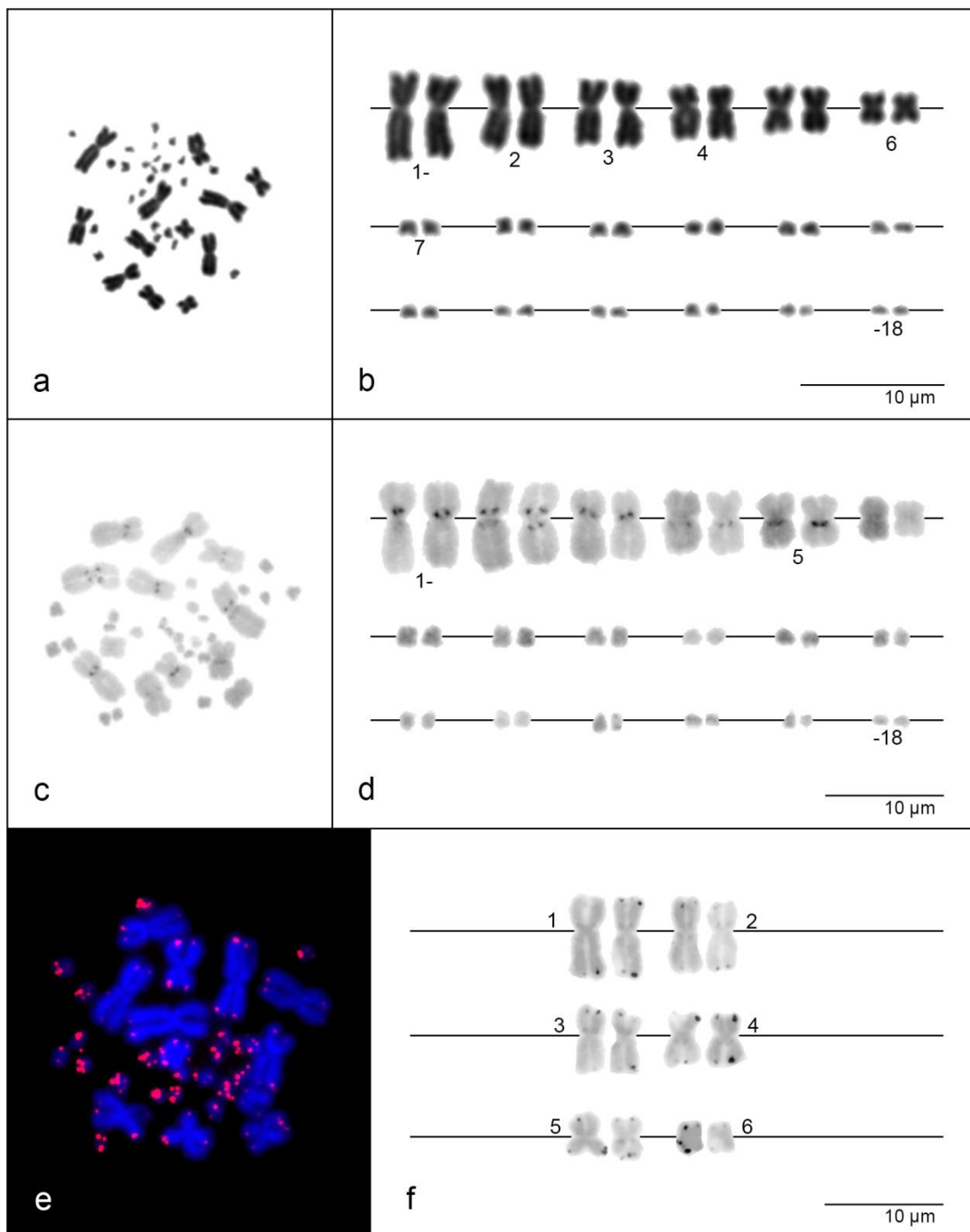
Celkem bylo vyhodnoceno 21 druhů, u dvanácti z nich byla zastoupena obě pohlaví. U osmi druhů, jmenovitě: *Cyclura nubila*, *Crotaphytus insularis*, *Laemanctus longipes*, *Petrosaurus thalassinus*, *Chalarodon madagascariensis*, *Oplurus fierinensis*, *O. grandidieri* a *Basiliscus plumifrons* karyotyp nebyl doposud popsán. U všech zahrnutých jedinců byl sestaven karyotyp a chromosomy byly prověřeny metodou C-proužkování. Metodou FISH se značenou telomerickou sondou byly prozkoumány chromosomy 25 jedinců se snahou vyšetřit vždy alespoň jedno pohlaví daného druhu. Bohužel z důvodu velmi malého počtu metafází v suspenzi se nepodařilo prověřit touto metodou dva druhy: *Basiliscus plumifrons* a *Cyclura nubila*. U čtyř druhů (*Basiliscus plumifrons*, *Petrosaurus thalassinus*, *Sceloporus variabilis* a *Uranoscodon superciliosus*) byl pomocí impregnace stříbrem odhalen organizátor jadérka v oblasti sekundární konstriktce na jednom páru mikrochromosomů.

## **4.1. Popis karyotypu jednotlivých druhů skupiny**

### **Pleurodonta**

#### **4.1.1. *Anolis allisoni***

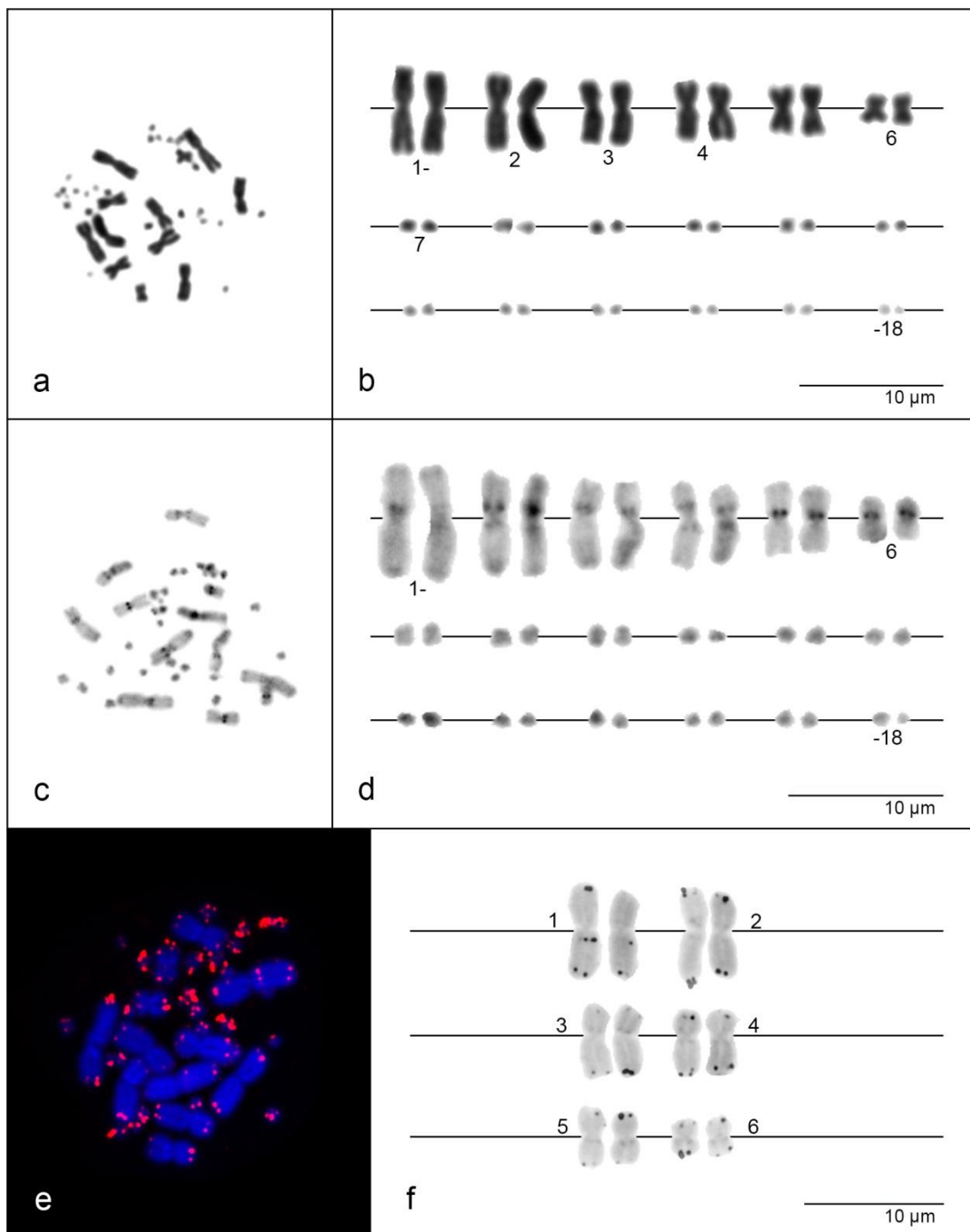
Diploidní počet chromosomů samce druhu *Anolis allisoni* byl  $2n=36$  (Obr. 3). Samčí karyotyp se skládal z šesti párů makrochromosomů postupně snižující se velikosti, z nichž první až čtvrtý pár byl submetacentrický a zbylé dva byly metacentrické, a 12 párů mikrochromosomů (Obr. 3b). Toto zjištění se shodovalo s dřívějším popisem (Gorman & Atkins 1968). Vizualizovaný heterochromatin byl patrný na pěti prvních párech makrochromosomů v oblasti centromery a nebyl rovnoměrně rozložen – na prvním a třetím páru se nacházel nad primární konstrikcí, čtvrtý a pátý pár jej lokalizoval pod primární konstrikci a u druhého páru byl rozložen rovnoměrně okolo primární konstrikce (Obr. 3c,d). Žádný z mikrochromosomů nebyl výrazněji heterochromatinizován. Telomerická sonda neodhalila žádné intersticiální telomerické signály (ITS) a vážala se na chromosomy pouze do oblastí telomer (Obr. 3e,f). U chromosomů nebyla pozorována heteromorfie, která by mohla poukázat na přítomnost pohlavních chromosomů.



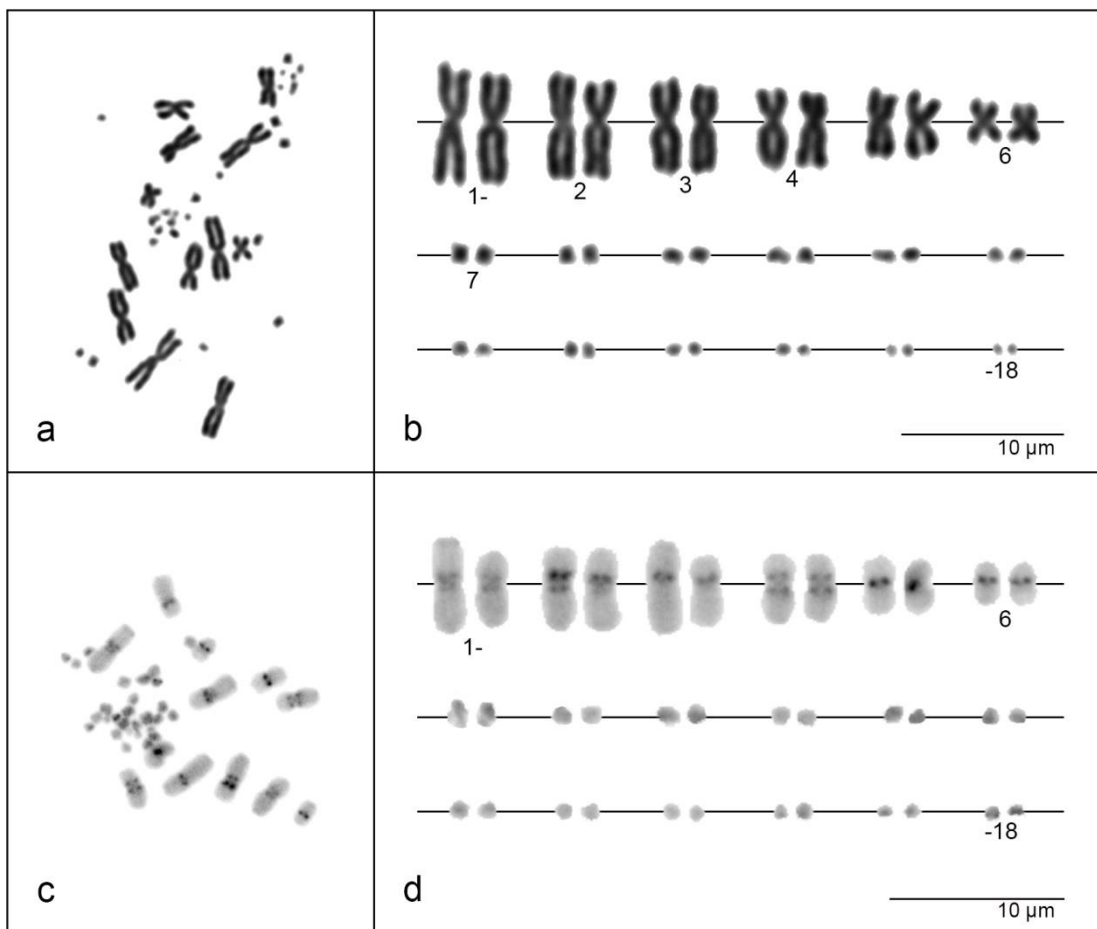
**Obr. 3** Metafáze a karyotypy samce druhu *Anolis allisoni*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (e) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (f).

#### **4.1.2. *Anolis carolinensis***

Diploidní počet chromosomů samice (Obr. 4) i samce (Obr. 5) druhu *Anolis carolinensis* byl  $2n=36$ . Chromosomy byly postupně snižující se velikosti se zřetelně velikostně odlišnými šesti páry makrochromosomů a 12 páry mikrochromosomů (Obr. 4b – samice, Obr. 5b – samec). První čtyři páry makrochromosomů byly submetacentrické zbylé dva byly metacentrické. Tento popis karyotypu odpovídal již dříve popsanému karyotypu tohoto druhu (Painter 1921, Matthey 1931, Gorman 1965). Heterochromatinové bloky byly pozorovány na všech párech makrochromosomů v oblasti centromery, přičemž na druhém a čtvrtém páru byl vizualizovaný heterochromatin umístěn do oblastí nad a pod primární konstrikcí (Obr. 4c,d – samice, Obr. 5c,d – samec). Částečně heterochromatinizované byly i některé mikrochromosomy, avšak bez patrného rozdílu mezi samcem a samicí. Metodu FISH s telomerickou sondou se podařilo aplikovat pouze u samice tohoto druhu, kde byly kromě obvyklého signálu v telomerách také detekovány ITS na prvním páru chromosomů v oblasti pod centromerou (Obr. 4e,f). Použitými metodami se nepodařilo pohlavní chromosomy odhalit.



**Obr. 4** Metafáze a karyotypy samice druhu *Anolis carolinensis*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (e) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (f).

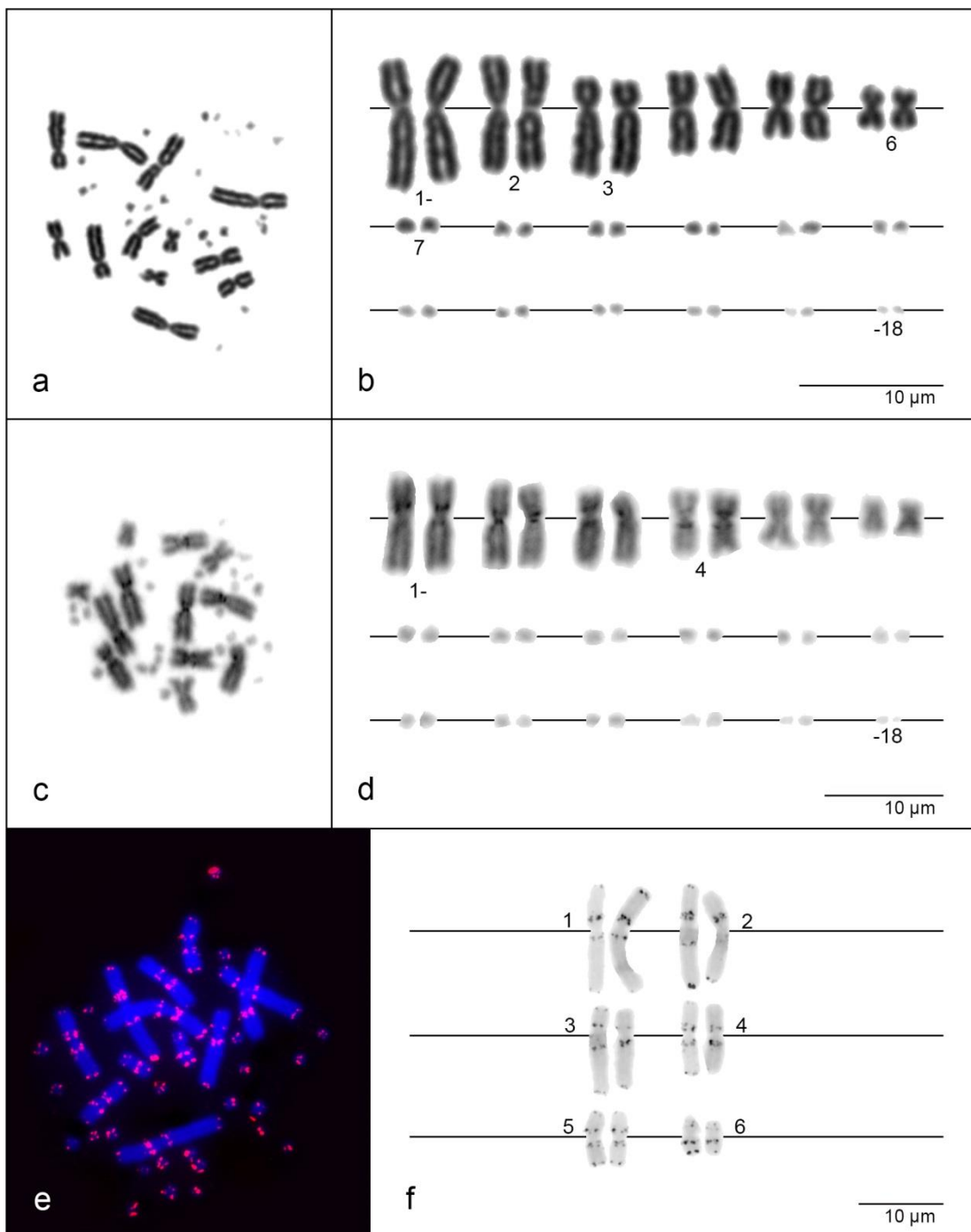


**Obr. 5** Metafáze a karyotypy samce druhu *Anolis carolinensis*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d).

### 4.1.3. *Anolis coelestinus*

Diploidní počet chromosomů byl u samce druhu *Anolis coelestinus*  $2n=36$  (Obr. 6). Samčí karyotyp byl složen z šesti párů postupně se zmenšujících makrochromozomů a 12 párů mikrochromosomů. Popis karyotypu se shodoval s dřívějším popisem (Gorman et al. 1967). První a třetí pár byl výrazně submetacentrický, druhý pár byl morfologicky na pomezí submetacentrického a metacentrického chromosomu, ostatní makrochromosomy byly metacentrické (Obr. 6b). Heterochromatinizace byla nápadná u prvních čtyř párů chromosomů v centromerické oblasti, naopak u mikrochromosomů nebyl patrný žádný vizualizovaný heterochromatin (Obr. 6c,d). Telomerická sonda odhalila dva bloky ITS obklopující centromeru na každém makrochromosomu, současně byl signál přítomen v oblastech telomer. Na základě použitých metod nebylo možné odhalit pohlavní chromosomy.

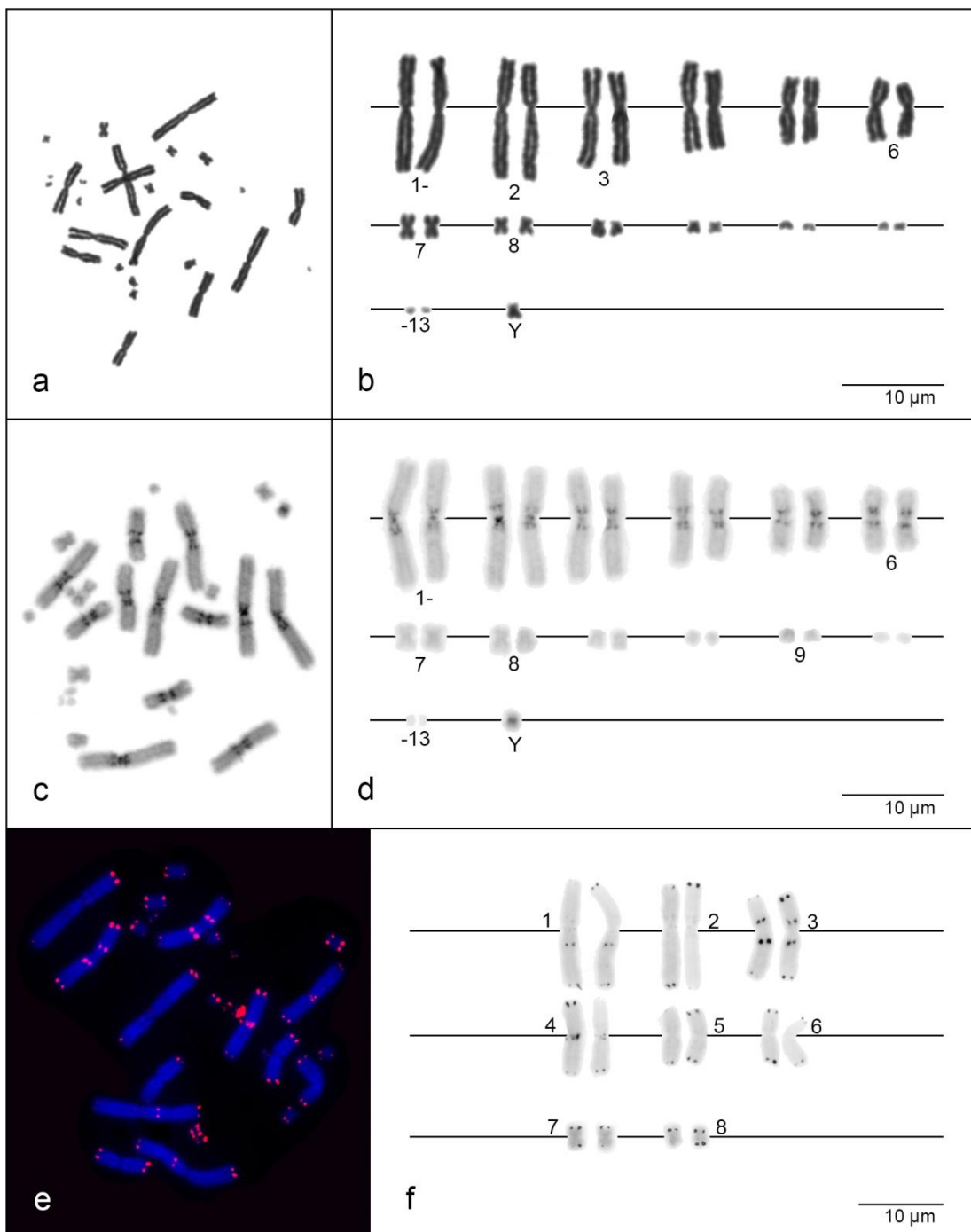




**Obr. 6** Metafáze a karyotypy samce druhu *Anolis coelestinus*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (e) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (f).

#### **4.1.4. *Anolis cristatellus***

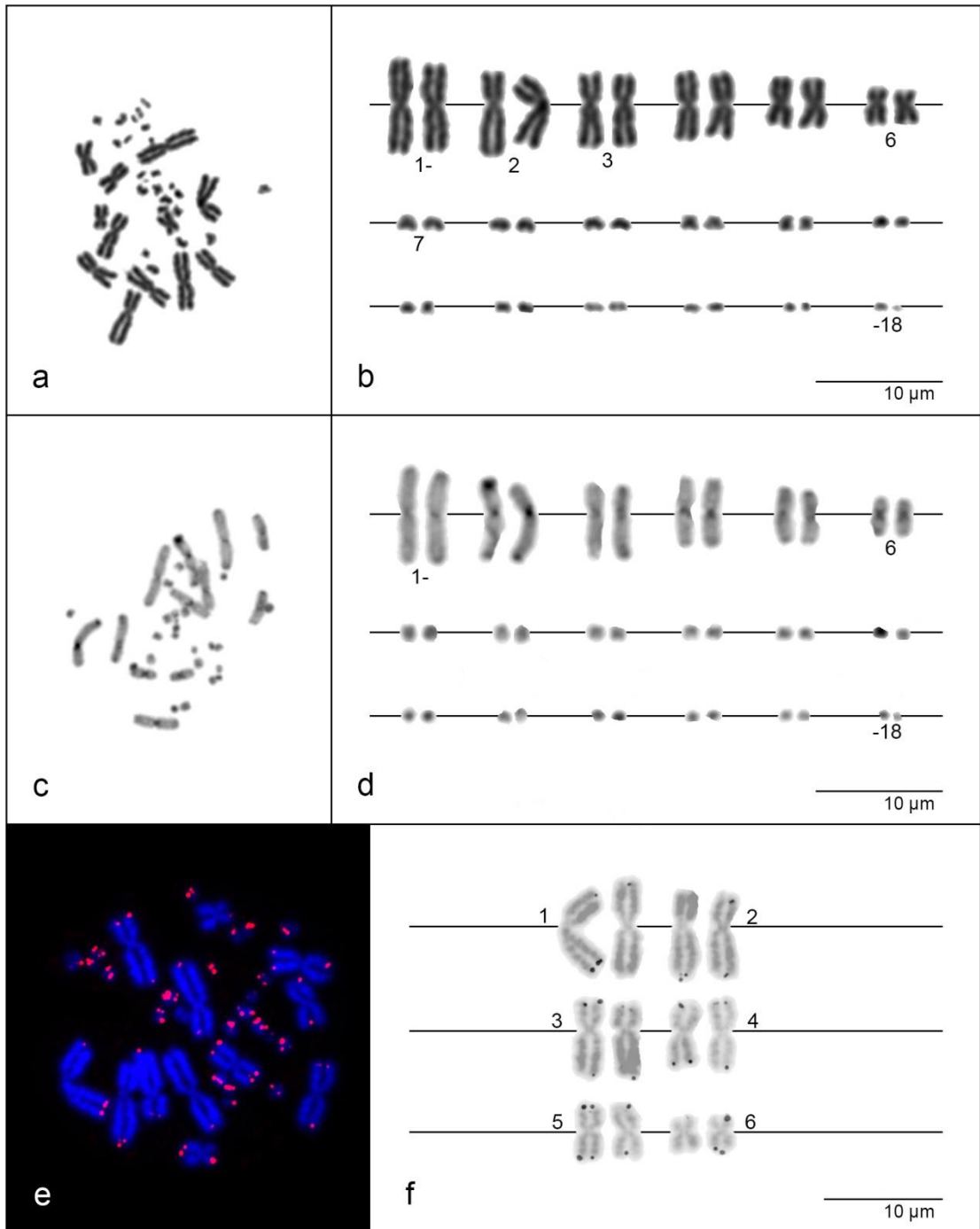
Diploidní počet chromosomů byl u samce druhu *Anolis cristatellus*  $2n=27$  (Obr. 7). Z šesti makrochromosomů postupně se zmenšující velikosti byl druhý a třetí pár submetacentrický. Sedmý a osmý pár byl metacentrický a zřetelně větší než ostatní mikrochromosomy, proto byl řazen mezi makrochromosomy (taktéž v Olmo & Signorino 2005). Ze zbývajících 11 mikrochromosomů postupně se snižující velikosti byl jeden metacentrický mikrochromosom nepárový. C-proužkování odhalilo heterochromatin ve všech centromerách makrochromosomů a nápadný blok heterochromatinu v centromere zmíněného nepárového mikrochromosomu (Obr. 7c,d). Tento mikrochromosom byl označen jako neopohlavní chromosom Y. Samčí karyotyp již dříve popsali Gorman et al. (1968) a na základě figur z meiotického dělení odhalili trivalent dokazující přítomnost neopohlavních chromosomů. Nedokázali však z trojice rozlišit chromosomy  $X_1$ ,  $X_2$  a Y pouze na základě použitého Giemsova barvení. V této práci se použitím metody C-proužkování podařilo popsat neopohlavní chromosom Y ale neopohlavní chromosomy  $X_1$  a  $X_2$  zůstaly pro klasifikaci nadále nerozlišitelné. Intersticiální telomerické sekvence byly odhaleny jedním proužkem signálu pod centromerou na prvním páru, v centromere čtvrtého páru a dvěma proužky signálů obklopujících centromeru třetího páru chromosomů (Obr 7e,f).



**Obr. 7** Metafáze a karyotypy samce druhu *Anolis cristatellus*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (e) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (f).

#### **4.1.5. *Anolis cybotes***

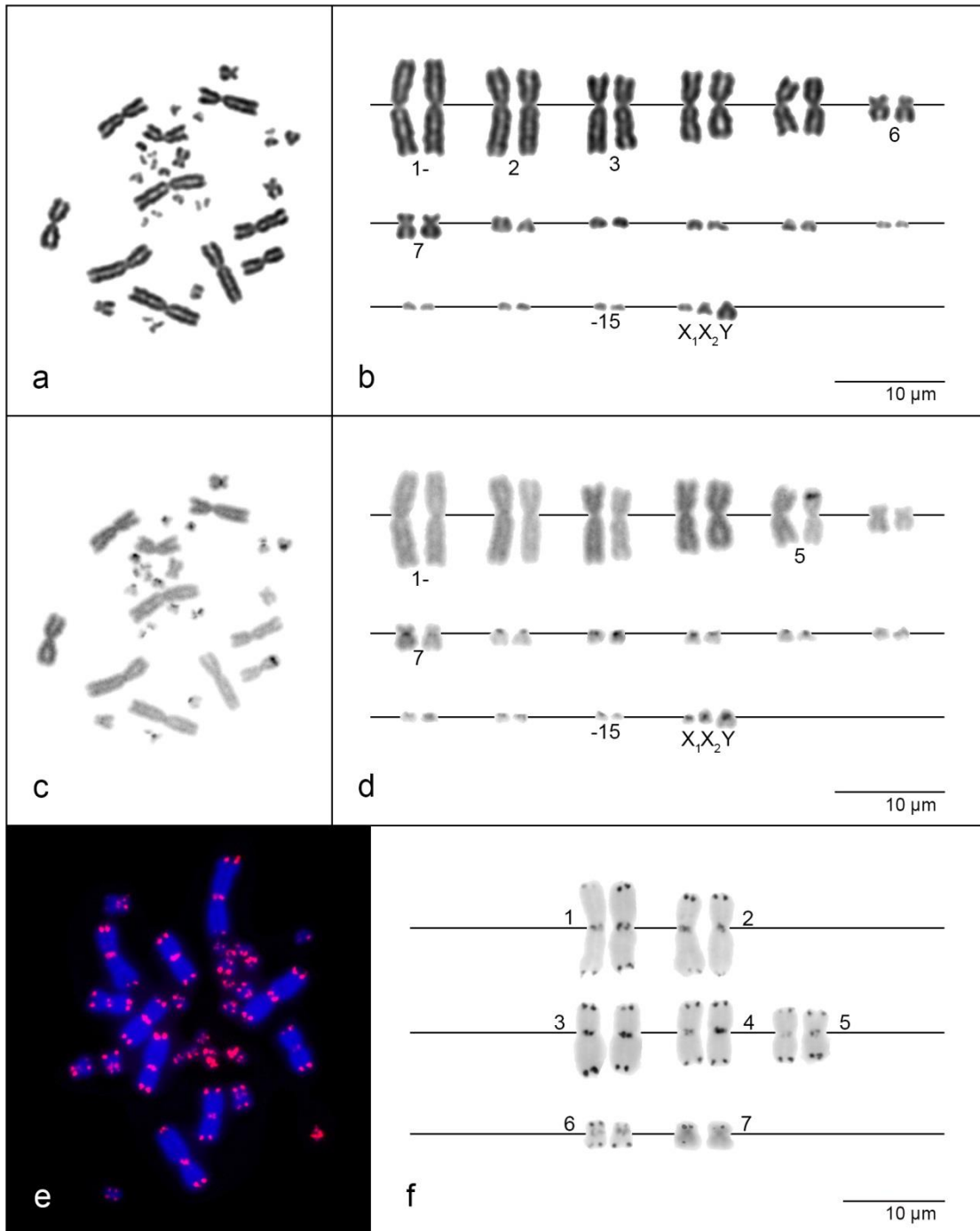
Diploidní počet chromosomů byl u samce druhu *Anolis cybotes*  $2n=36$  (Obr. 8). Karyotyp byl složen ze šesti párů makrochromosomů a 12 párů mikrochromosomů. Tento popis karyotypu se shodoval s již dříve publikovaným karyotypem (Gorman & Atkins 1966). Makrochromosomy byly postupně snižující se velikosti a kromě druhého a třetího submetacentrického páru byly metacentrické (Obr. 8b). C-proužkování odhalilo slabě heterochromatinizované oblasti centromer a konce ramének všech makrochromosomů (Obr. 8c,d). Jeden makrochromosom z druhého páru nesl silný signál na distální části p raménka, který byl však způsoben překryvem s mikrochromosomem. U mikrochromosomů byl heterochromatin také odhalen, nevytvářel však nijak nápadný vzor. Telomerická sonda se vážala pouze do oblastí telomer a neprokázala žádné intersticiální telomerické signály (Obr 8e,f). Na základě použitých metod se nepodařilo odhalit pohlavní chromosomy.



**Obr. 8** Metafáze a karyotypy samce druhu *Anolis cybotes*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (e) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (f).

#### 4.1.6. *Anolis distichus*

Diploidní počet chromosomů byl u samce druhu *Anolis distichus*  $2n=33$  (Obr. 9) (publikován již v Gorman & Atkins 1969). Sedm párů makrochromosomů bylo postupně snižující se velikosti s nápadně menším šestým a sedmým párem (Obr. 9b). Druhý, třetí, šestý a sedmý pár byl submetacentrický oproti ostatním makrochromosomům, které byly metacentrické. Osm párů mikrochromosomů bylo postupně snižující se velikosti. Zbývající tři mikrochromosomy byly označeny za neopohlavní chromosomy  $X_1$ ,  $X_2$  a Y. Gorman & Atkins (1969) popsali neopohlavní chromosom Y jako submetacentrický, což se v této práci nepotvrdilo, neboť na všech hodnocených metafázích byl vyhodnocen jako největší akrocentrický chromosom v karyotypu. Neopohlavní chromosomy  $X_1$  a  $X_2$  byly vyhodnoceny jako heteromorfní akrocentrické mikrochromosomy, což se shodovalo s publikovaným karyotypem. Metoda C-proužkování vizualizovala heterochromatin lokalizovaný do centromer všech mikrochromosomů a sedmého páru makrochromosomů (Obr. 9d). Na Y neopohlavním chromosomu byl patrný větší blok heterochromatinu v oblasti centromery. Markantní heterochromatinový blok byl detekován na p raménku jednoho chromosomu z pátého páru. Tento znak byl přítomný na všech hodnocených metafázích s aplikovaným C-proužkováním. Při metodě FISH s telomerickou sondou byl zachycen signál ITS v centromerách všech makrochromosomů (Obr. 9e,f).

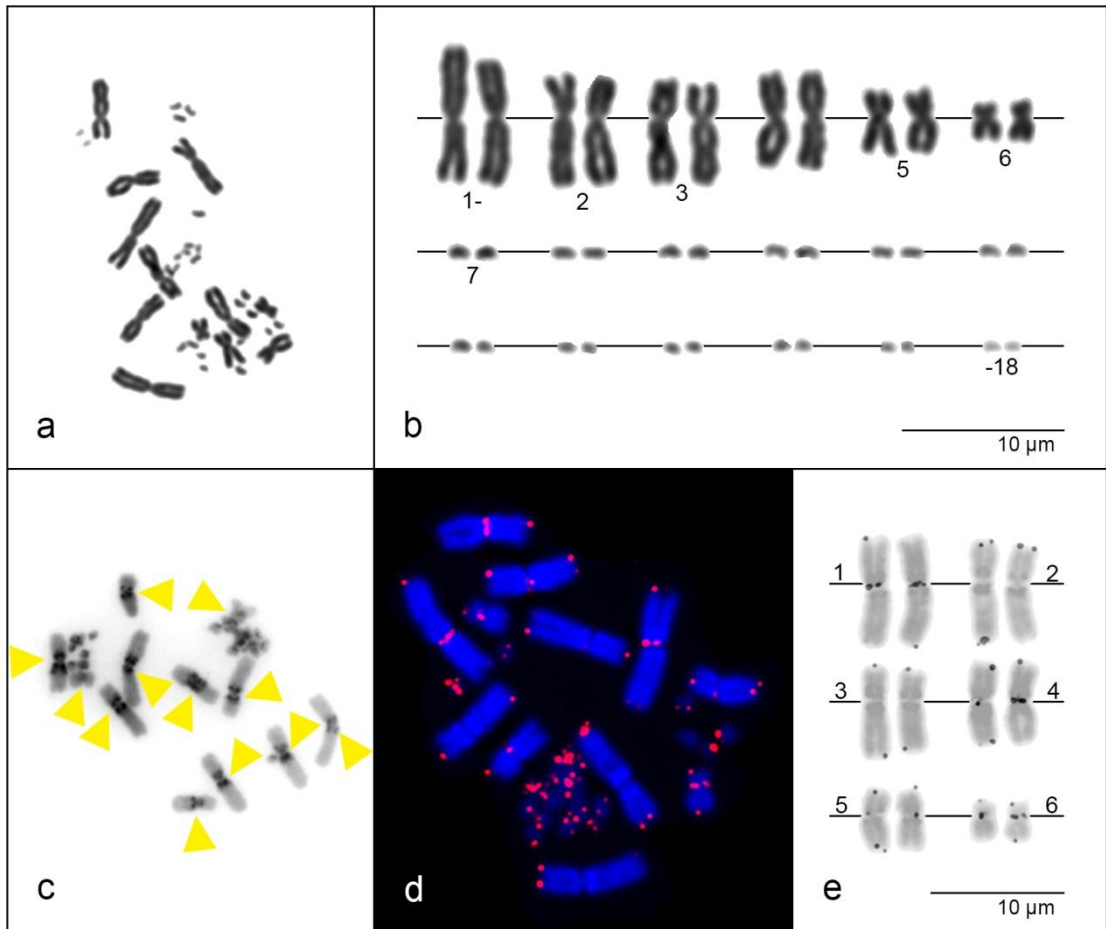


**Obr. 9** Metafáze a karyotypy samce druhu *Anolis distichus*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (e) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (f).

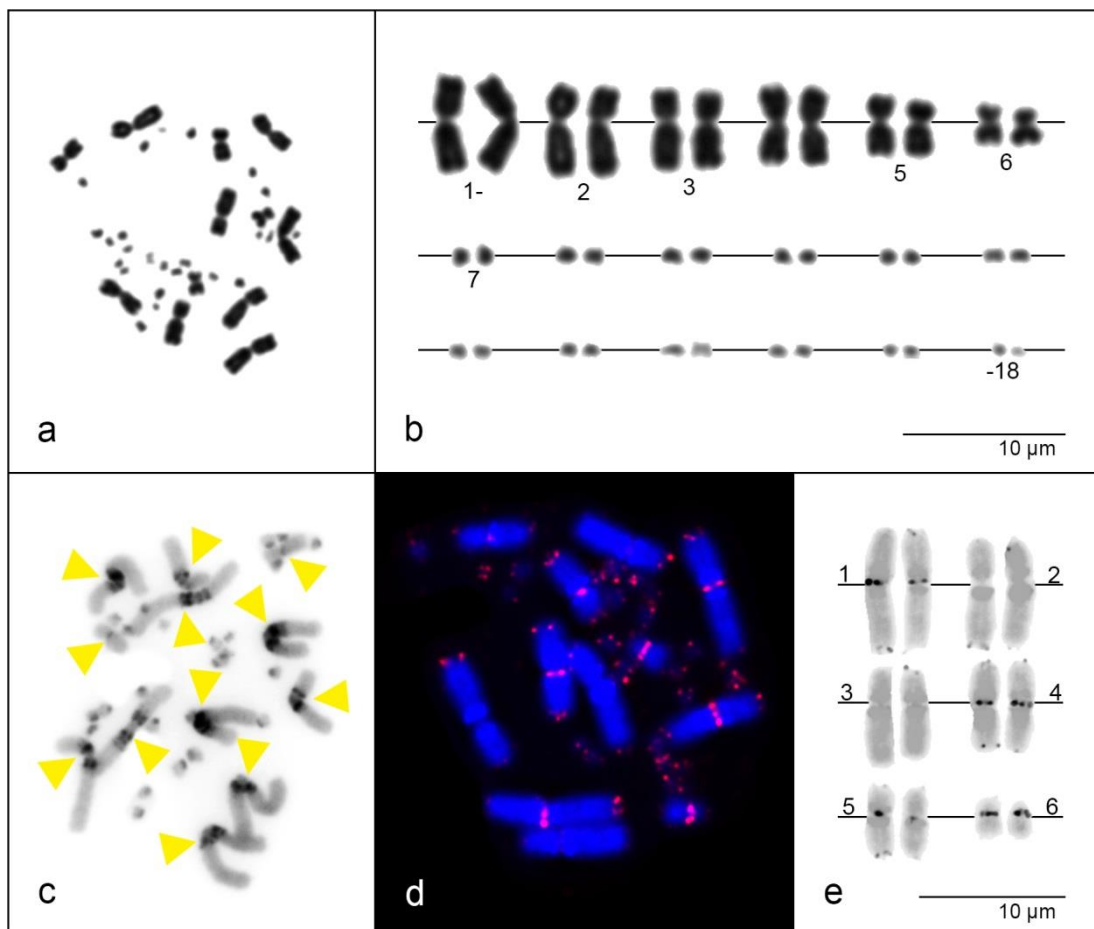
#### **4.1.7. *Anolis equestris***

Diploidní počet chromosomů byl u samice (Obr. 10) a samce (Obr. 11) druhu *Anolis equestris* shodně  $2n=36$ . V karyotypu bylo přítomno šest párů makrochromosomů a 12 párů mikrochromosomů (zápis karyotypu shodný s Gorman et al. 1967 a De Smet 1981). Chromosomy byly postupně klesající velikosti s nápadným rozdílem mezi šestým a sedmým párem. Druhý, třetí a pátý pár makrochromosomů byl submetacentrický oproti ostatním metacentrickým. Bohužel, při metodě C-proužkování nebylo dosaženo natolik kvalitního rozložení chromosomů v metafázi, aby bylo možné odlišit všechny mikrochromosomy a sestavit karyotyp, a proto byly předloženy pouze snímky metafází. Bloky heterochromatinu tvořící celé sekvence proužků byly lokalizovány na makrochromosomech v centromerách (Obr. 10c – samice, Obr. 11c – samec; heterochromatin značen šipkou). Heterochromatin je také patrný v centromerách mikrochromosomů. Signály ITS byly detekovány na prvním, čtvrtém, pátém a šestém páru makrochromosomů v centromere (Obr. 10d,e – samice, Obr. 11d,e – samec). Použité metody nezachytily rozdíl v karyotypu samce a samice.





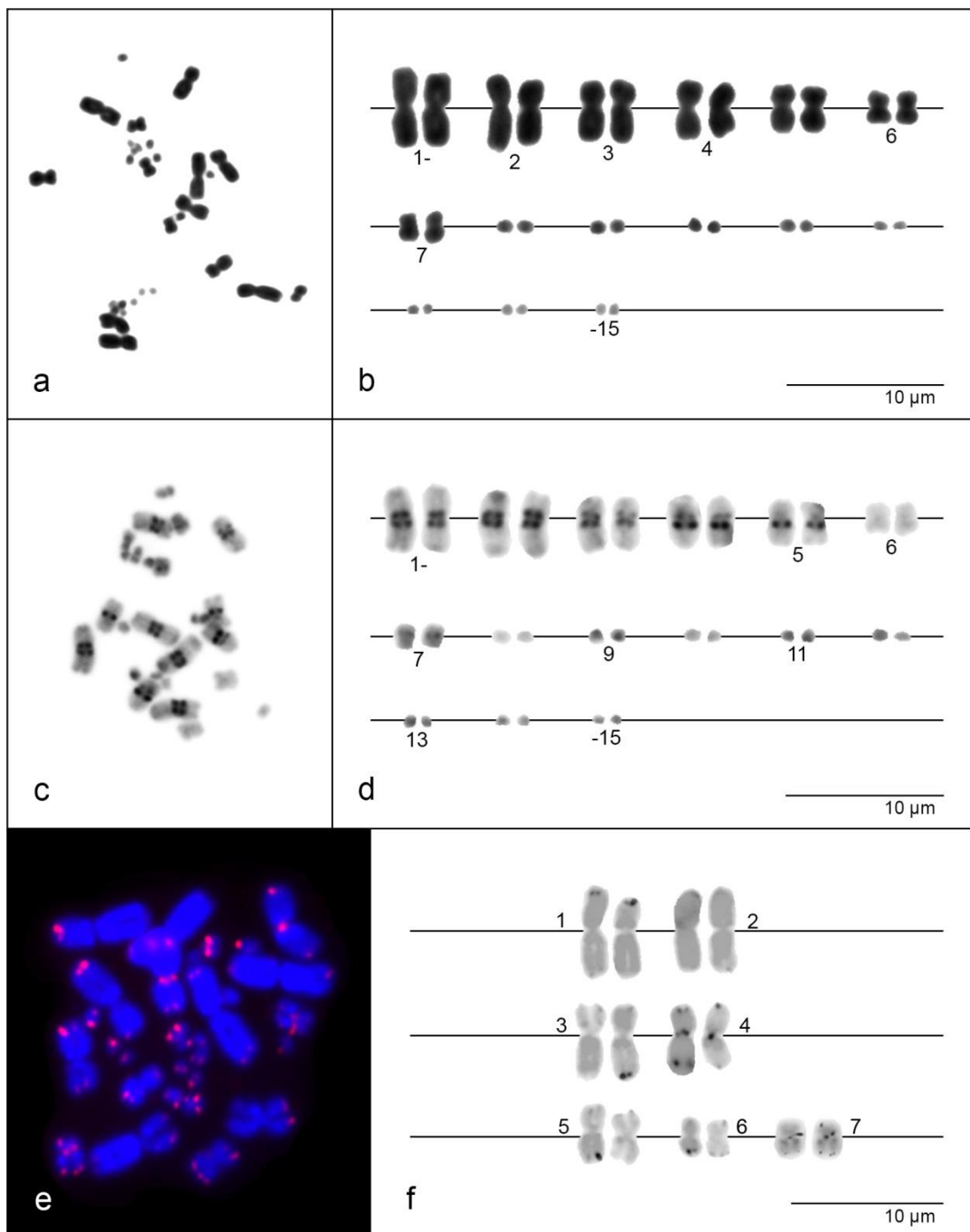
**Obr. 10** Metafáze a karyotyp samice druhu *Anolis equestris*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze se šipkami označenými bloky heterochromatinu na makrochromosomech (c); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (d) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (e).



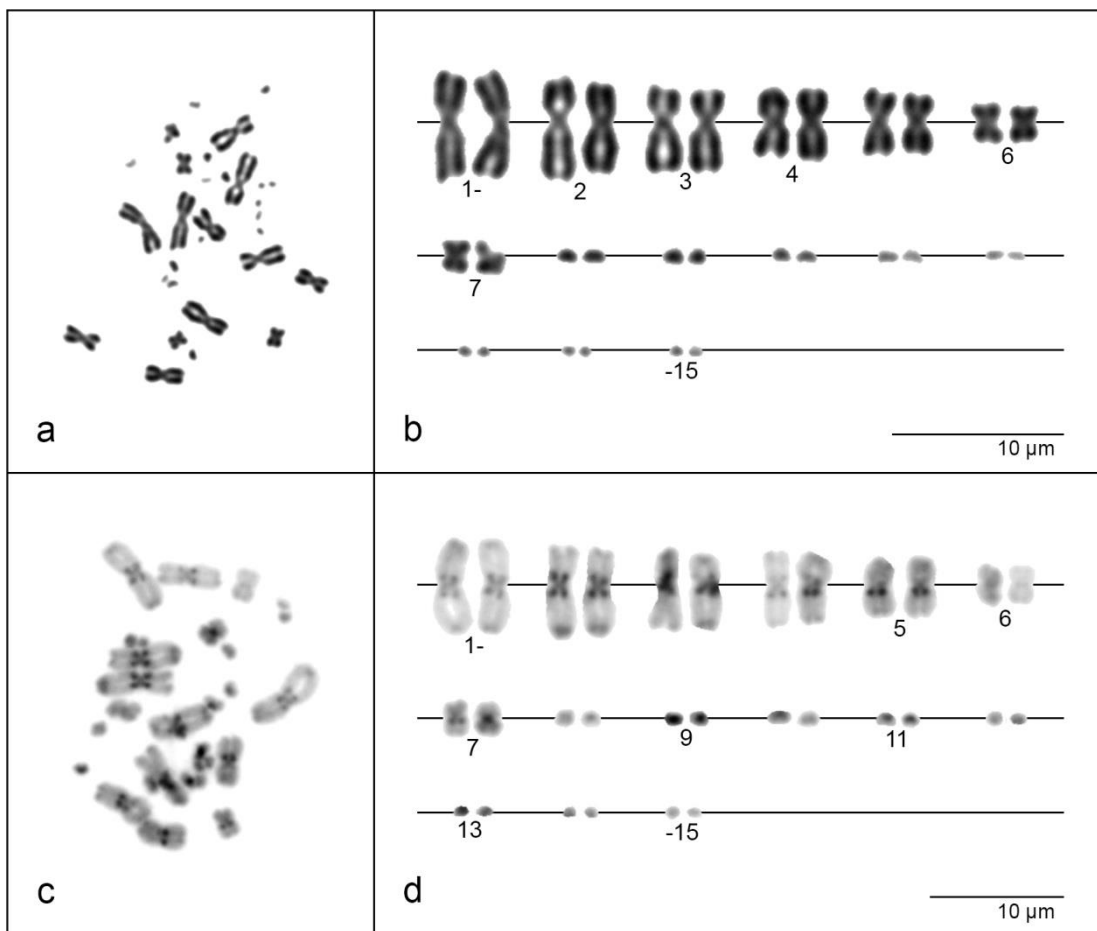
**Obr. 11** Metafáze a karyotyp samce druhu *Anolis equestris*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze se šipkami označenými bloky heterochromatinu na makrochromosomech (c); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (d) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (e).

#### **4.1.8. *Anolis garmani***

Diploidní počet chromosomů byl u samice (Obr. 12) a samce (Obr. 13) druhu *Anolis garmani* shodně  $2n=30$ . Karyotyp obou pohlaví byl tvořen chromosomy postupně klesající velikosti s nápadným rozdílem mezi sedmým a osmým párem (Obr. 12b – samice, Obr. 13b – samec). Druhý, třetí a čtvrtý pár byl submetacentrický, ostatní makrochromosomy byly metacentrické. Popis karyotypu souhlasil s dříve publikovaným karyotypem tohoto druhu (Gorman & Atkins 1968). C-proužkování detekovalo heterochromatin v oblasti centromery všech makrochromosomů s výjimkou šestého páru (Obr. 12d – samice, Obr. 13d – samec). Zároveň byla patrná silnější heterochromatinizace devátého, jedenáctého a třináctého páru chromosomů u obou pohlaví. U samice byl genom vyšetřen telomerickou sondou, která odhalila ITS v centromeře čtvrtého a sedmého páru chromosomů (Obr. 12e,f). Použitím klasického barvení a C-proužkování nebyl odhalen rozdíl v karyotypu samce a samice.



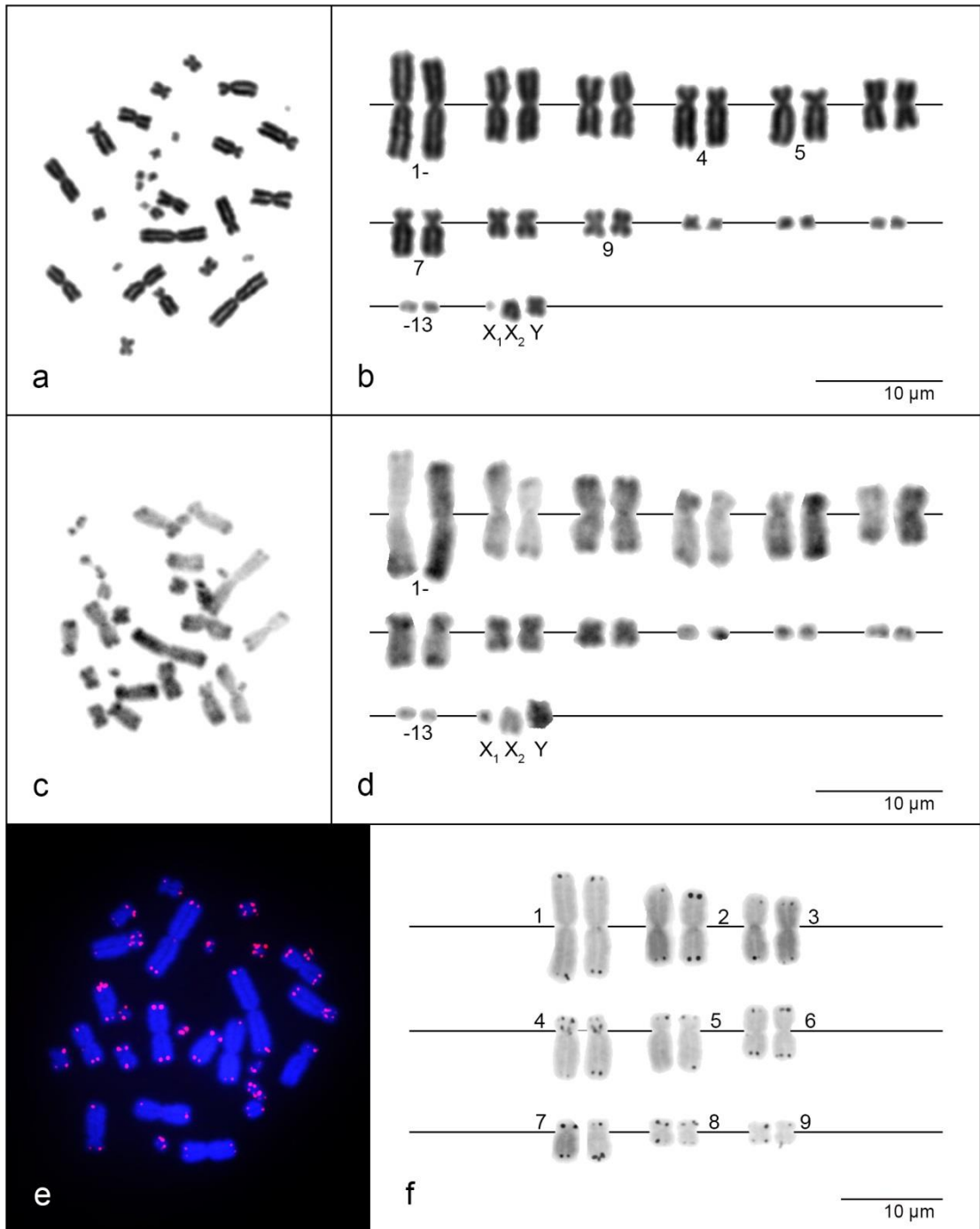
**Obr. 12** Metafáze a karyotypy samice druhu *Anolis garmani*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (e) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (f).



**Obr. 13** Metafáze a karyotypy samce druhu *Anolis garmani*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d).

#### 4.1.9. *Anolis gingivinus*

Diploidní počet chromosomů byl u samce druhu *Anolis gingivinus*  $2n=29$ . Karyotyp byl složen z 10 párů makrochromosomů, čtyř párů mikrochromosomů a neopohlavních chromosomů  $X_1$ ,  $X_2$  a Y (Obr. 14b). Popis karyotypu se shodoval s dříve publikovaným karyotypem tohoto druhu (Gorman & Atkins 1966). Chromosomy byly postupně snižující se velikosti s výraznou změnou ve velikosti mezi prvním / druhým, sedmým / osmým a desátým / jedenáctým párem chromosomů. Čtvrtý, pátý a sedmý pár makrochromosomů byl subtelocentrický, ostatní makrochromosomy byly metacentrické. U neopohlavních chromosomů byla nápadná heteromorfie, Y chromosom byl tvořen metacentrickým mikrochromosomem a neopohlavní chromosom  $X_1$  se lišil od  $X_2$  velikostí. Heterochromatinizované byly zejména koncové oblasti ramének a neopohlavní chromosom Y (Obr. 14c,d). Silný signál potvrzující výskyt ITS byl detekován na čtvrtém páru v centromerické oblasti (Obr. 14e,f). Velmi slabé signály ITS bylo možné pozorovat i v centromerách prvních tří párů makrochromosomů. Ty byly zřejmě způsobeny menším počtem telomerických repetit v těchto oblastech – lze tak usuzovat podle stejné lokalizace u blízce příbuzného druhu *A. oculatus*.

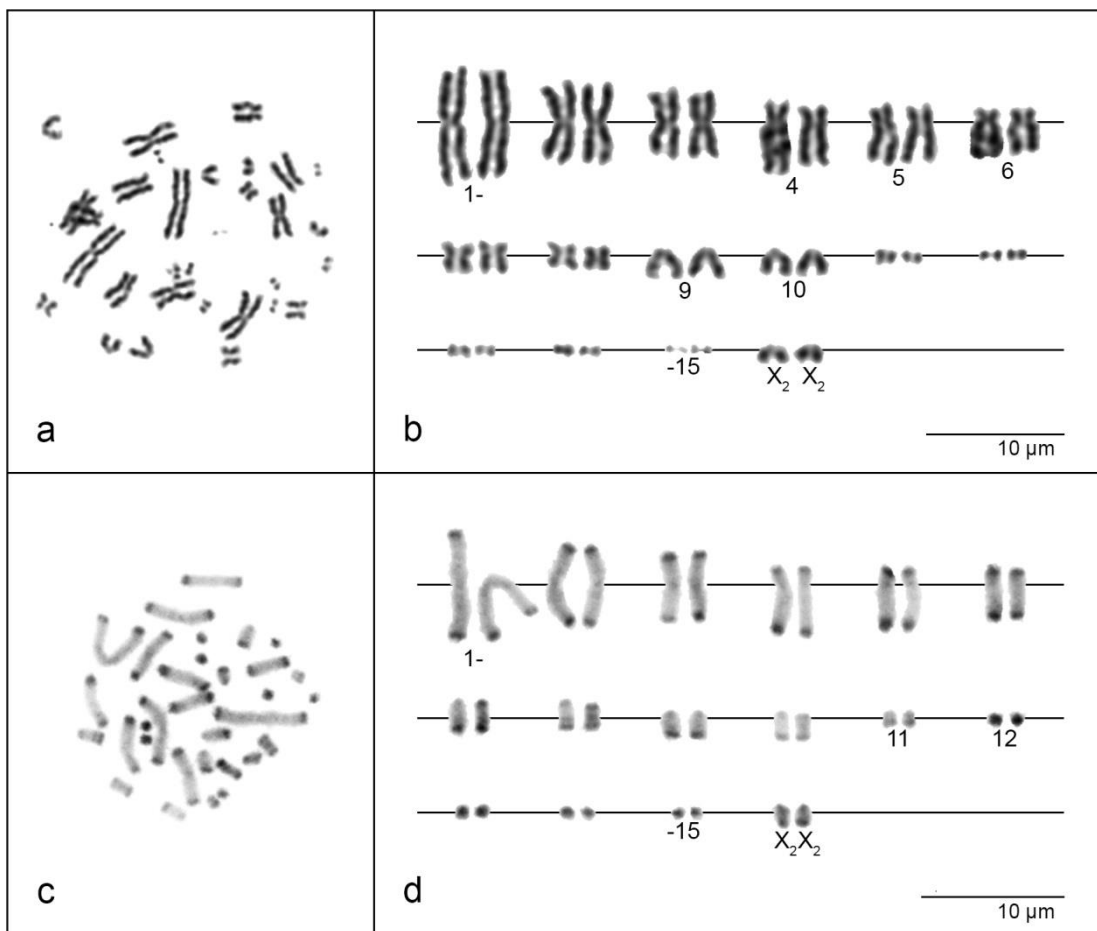


**Obr. 12** Metafáze a karyotypy samce druhu *Anolis gingivinus*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (e) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (f).

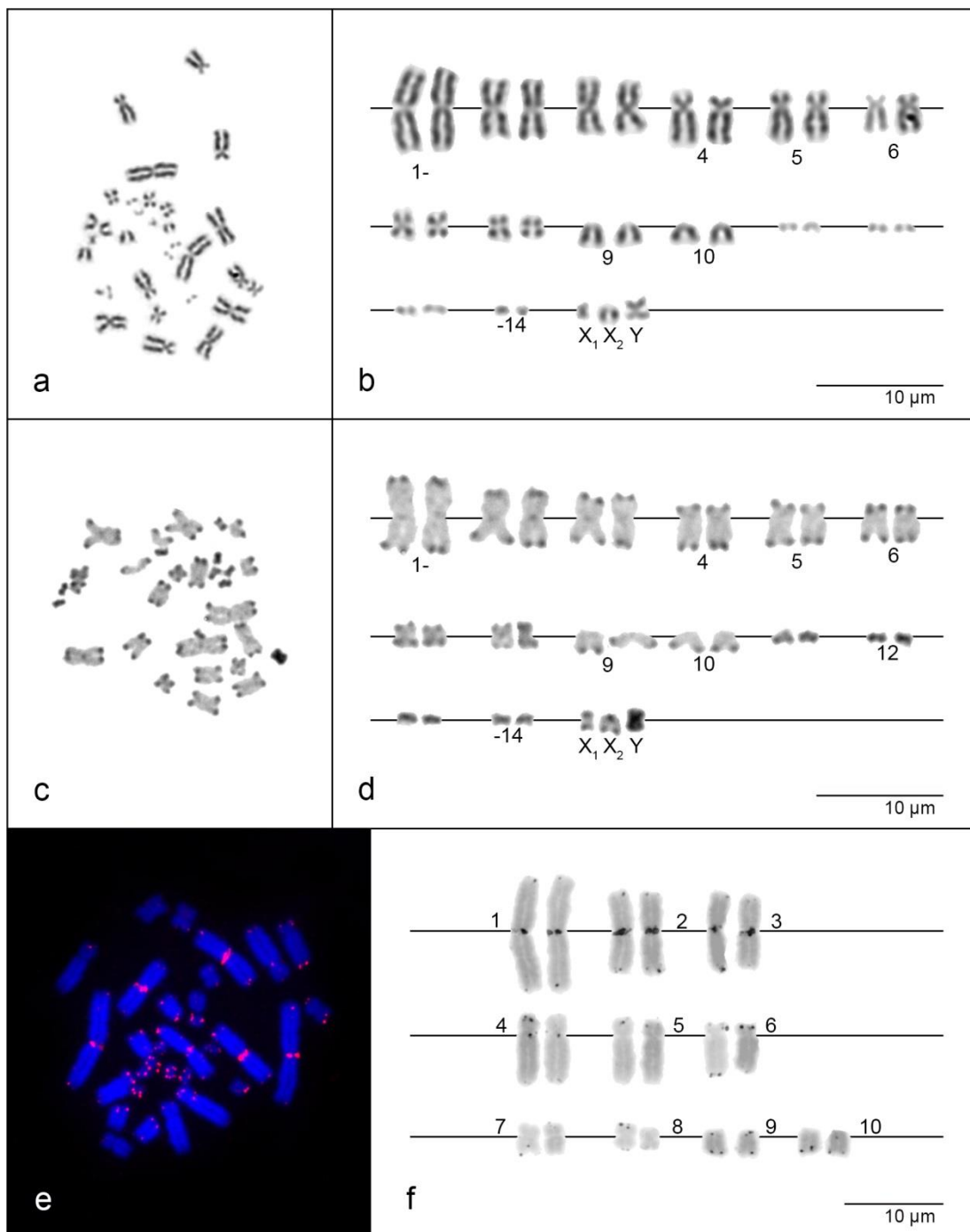
#### 4.1.10. *Anolis oculatus*

Diploidní počet chromosomů samice  $2n=32$  (Obr. 15) a samce  $2n=31$  (Obr. 16) u druhu *Anolis oculatus* se lišil důsledkem přítomnosti neopohlavních chromosomů. Karyotypy obou pohlaví se shodovaly v počtu a morfologii makrochromosomů, které se postupně zmenšovaly ve velikosti s nápadným skokem mezi šestým a sedmým párem. První tři páry chromosomů byly metacentrické, poté následovaly tři páry subtelocentrické, dva páry metacentrických a dva páry akrocentrických makrochromosomů. Čtyři páry mikrochromosomů byly zřejmě akrocentrické a shodné pro obě pohlaví. V samičím karyotypu byly navíc přítomny dva páry akrocentrických neopohlavních chromosomů  $X_1X_1X_2X_2$  (Obr. 15b), někdy klasifikovaných jako makrochromosomy (Olmo & Signorino 2005). Bohužel, pohlavní chromosomy  $X_1$  se nepodařilo v této práci jednoznačně určit, z důvodu nedostatečného počtu hodnocených metafází u samice. Podle již dříve publikovaného karyotypu tohoto druhu by měly být metacentrické (Gorman & Atkins 1967). Tomu nejvíce odpovídal jedenáctý pár (Obr. 15d). Samčí karyotyp obsahoval dva heteromorfní chromosomy  $X_1$  a  $X_2$  a jeden nepárový metacentrický chromosom interpretovaný jako neopohlavní chromosom Y (Obr. 16b). Tento metacentrik byl přibližně stejné velikosti jako sedmý a osmý pár makrochromosomů. C-proužkování odhalilo bloky heterochromatinu lokalizované na konce ramének všech makrochromosomů (Obr. 15c,d – samice, Obr. 16c,d – samec). Dvanáctý pár mikrochromosomů byl heterochromatinizovaný u obou pohlaví. V metafázi samce je dobře patrný heterochromatinizovaný pohlavní chromosom Y. Metodou FISH s telomerickou sondou byl prověřen pouze genom samce a ITS byly detekovány v centromeře prvních čtyř párů makrochromosomů (Obr. 16e,f).





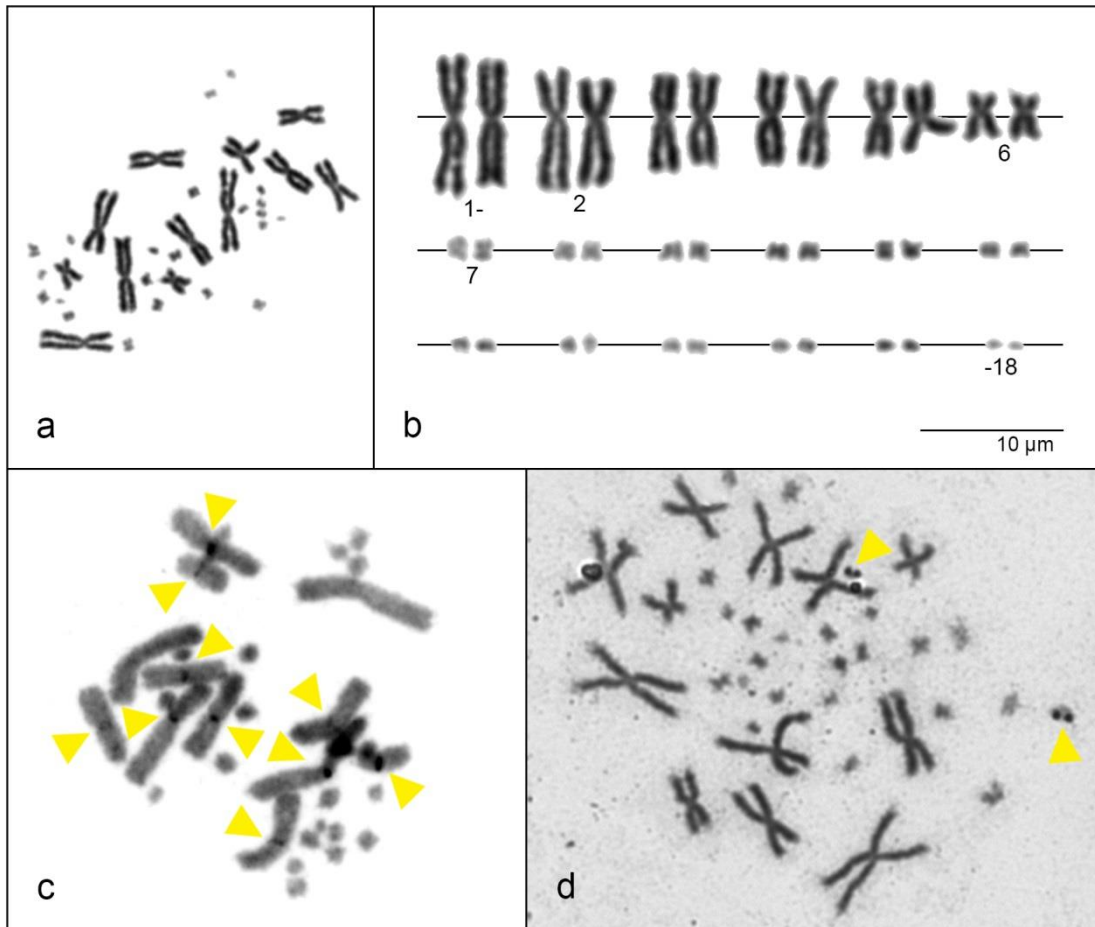
**Obr. 15** Metafáze a karyotypy samice druhu *Anolis oculatus*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d).



**Obr. 16** Metafáze a karyotypy samce druhu *Anolis oculatus*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny Giemsou – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (e) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (f).

#### **4.1.11. *Basiliscus plumifrons***

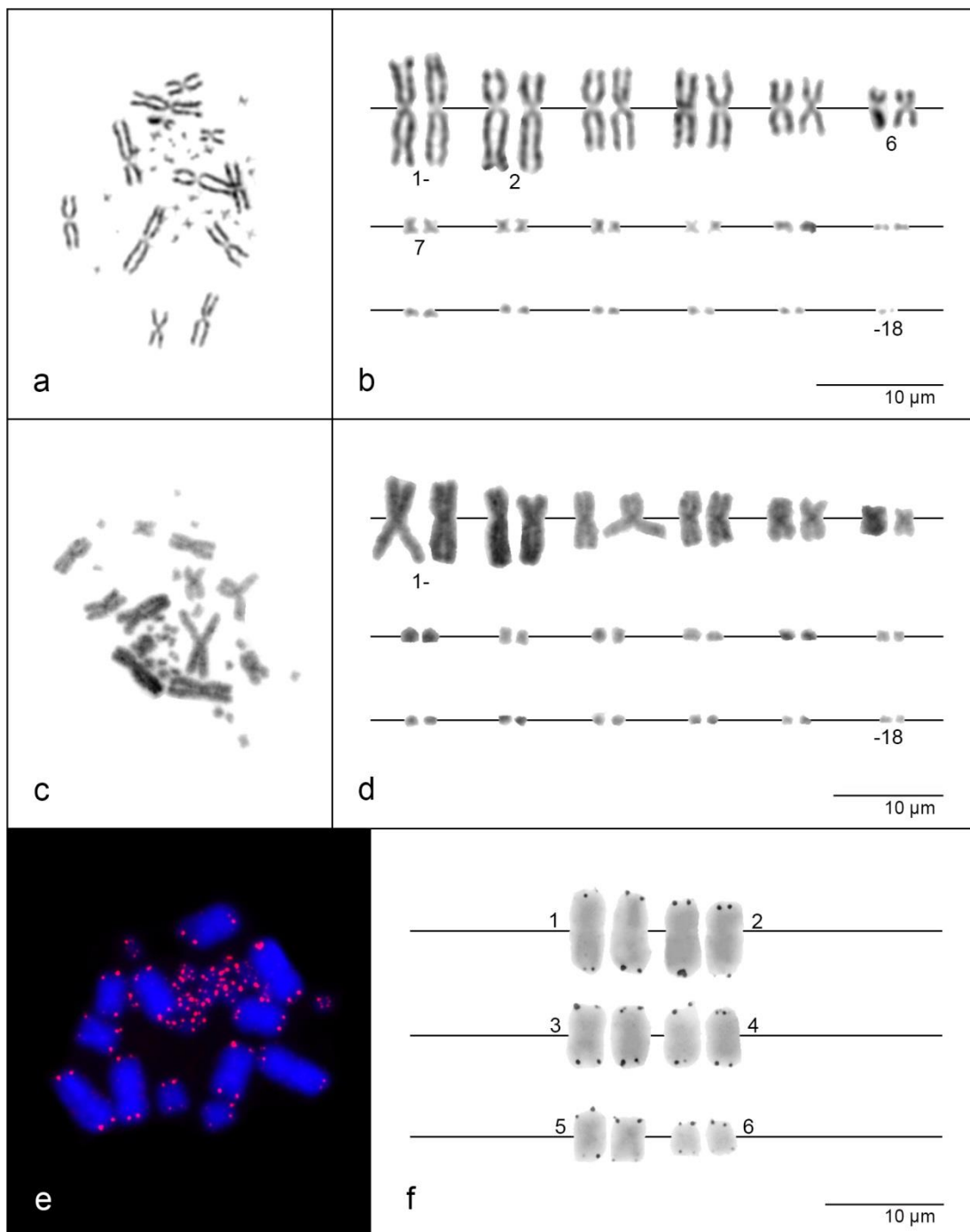
Diploidní počet chromosomů byl u samice druhu *Basiliscus plumifrons*  $2n=36$  (Obr. 17). Počtem a morfologií chromosomů se jednalo o nejčastější karyotyp leguánů. Šest párů makrochromosomů postupně snižující se velikosti bylo metacentrických s výjimkou druhého a šestého submetacentrického páru (Obr. 17b). Karyotyp tohoto druhu nebyl doposud publikován. Preparát obsahoval hodnotitelné metafáze ve velmi malém počtu a při aplikaci metody C-proužkování se nepodařilo nalézt metafázi dostatečně kvalitní k sestavení karyotypu. Z tohoto důvodu je na obr. 17c pouze snímek metafáze s označenými bloky heterochromatinu na makrochromosomech. Z obrázku je patrná přítomnost heterochromatinu v centromerách všech makrochromosomů kromě prvního páru. Při prohlížení chromosomů barvených Gimsou byla pozorována hůře barvená oblast, pravděpodobně sekundární konstriktce, na obou mikrochromosomech sedmého páru. Na základě tohoto zjištění byl předpokládán výskyt organizátorů jadérka na tomto páru chromosomů. Nicméně metodou impregnace stříbrem (AgNOR) byly odhaleny organizátory jadérka na jednom ze zřejmě akrocentrických párů mikrochromosomů (Obr. 17d).



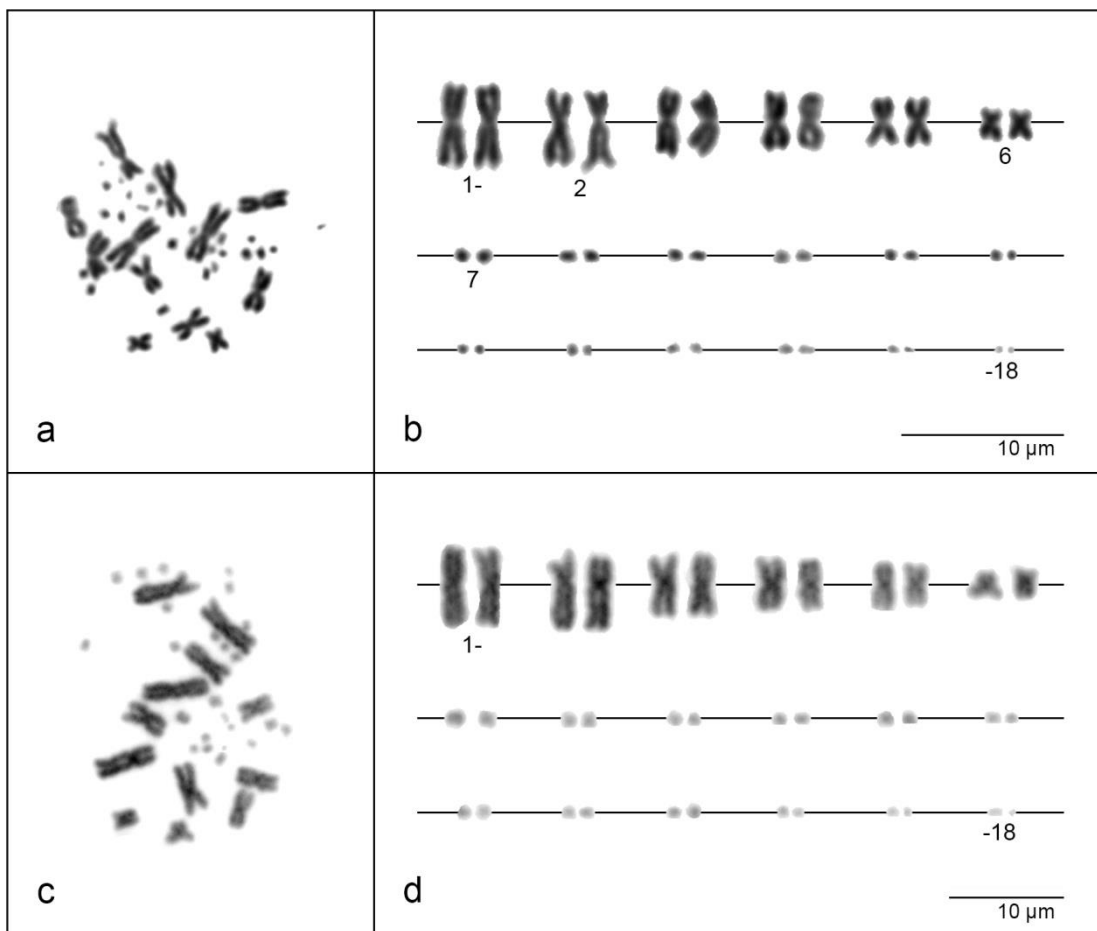
**Obr. 17** Metafáze a karyotypy samice druhu *Basiliscus plumifrons*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – šipky značí heterochromatin na makrochromosomech (c); organizátory jadérek na jednom páru mikrochromosomů, odhaleno diferenciálním barvením AgNOR, chromosomy barveny Giemsou (d).

#### **4.1.12. *Crotaphytus insularis***

Diploidní počet chromosomů byl shodně pro samici (Obr. 18) i samce (Obr. 19) druhu *Crotaphytus insularis*  $2n=36$ . Karyotyp byl typicky leguání s šesti páry makrochromosomů a 12 páry mikrochromosomů. Makrochromosomy byly postupně zmenšující se velikosti a všechny metacentrické kromě druhého submetacentrického páru. Karyotyp tohoto druhu nebyl do této doby publikován. C-proužkování neodhalilo žádné výrazně heterochromatinizované oblasti, pouze velmi slabý proužek byl patrný na makrochromosomech v oblasti centromer (Obr. 18c,d – samice, Obr. 19c,d – samec). Použitými metodami nebyl odhalen rozdíl v karyotypu samce a samice. Genom samice tohoto druhu byl prověřen metodou FISH se specifickou telomerickou sondou (Obr. 18e,f). Sonda hybridizovala pouze do oblastí telomer a nebyly detekovány žádné ITS.



**Obr. 18** Metafáze a karyotypy samice druhu *Crotaphytus insularis*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (e) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (f).

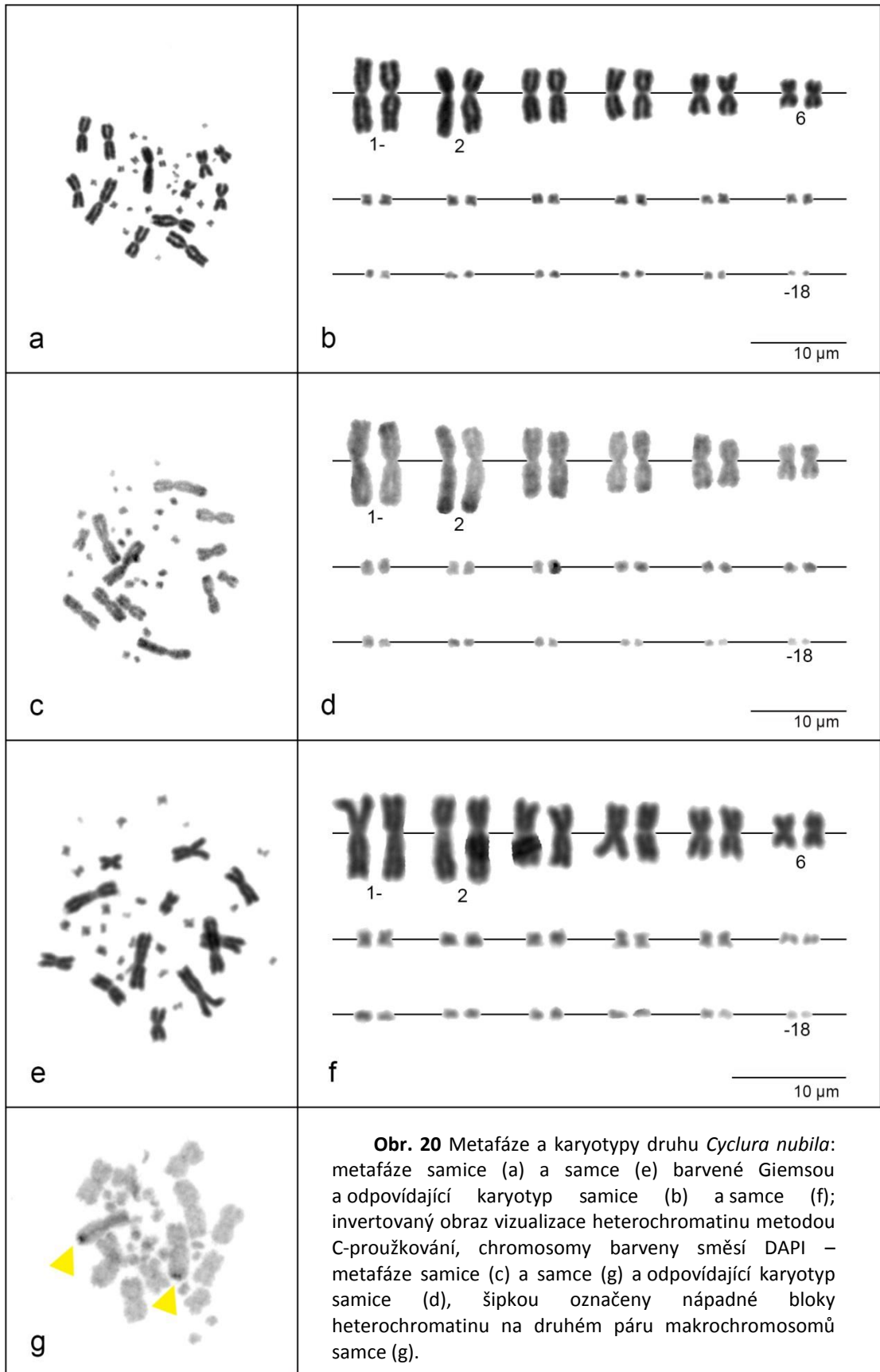


**Obr. 19** Metafáze a karyotypy samce druhu *Crotaphytus insularis*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d).

#### **4.1.13. *Cyclura nubila***

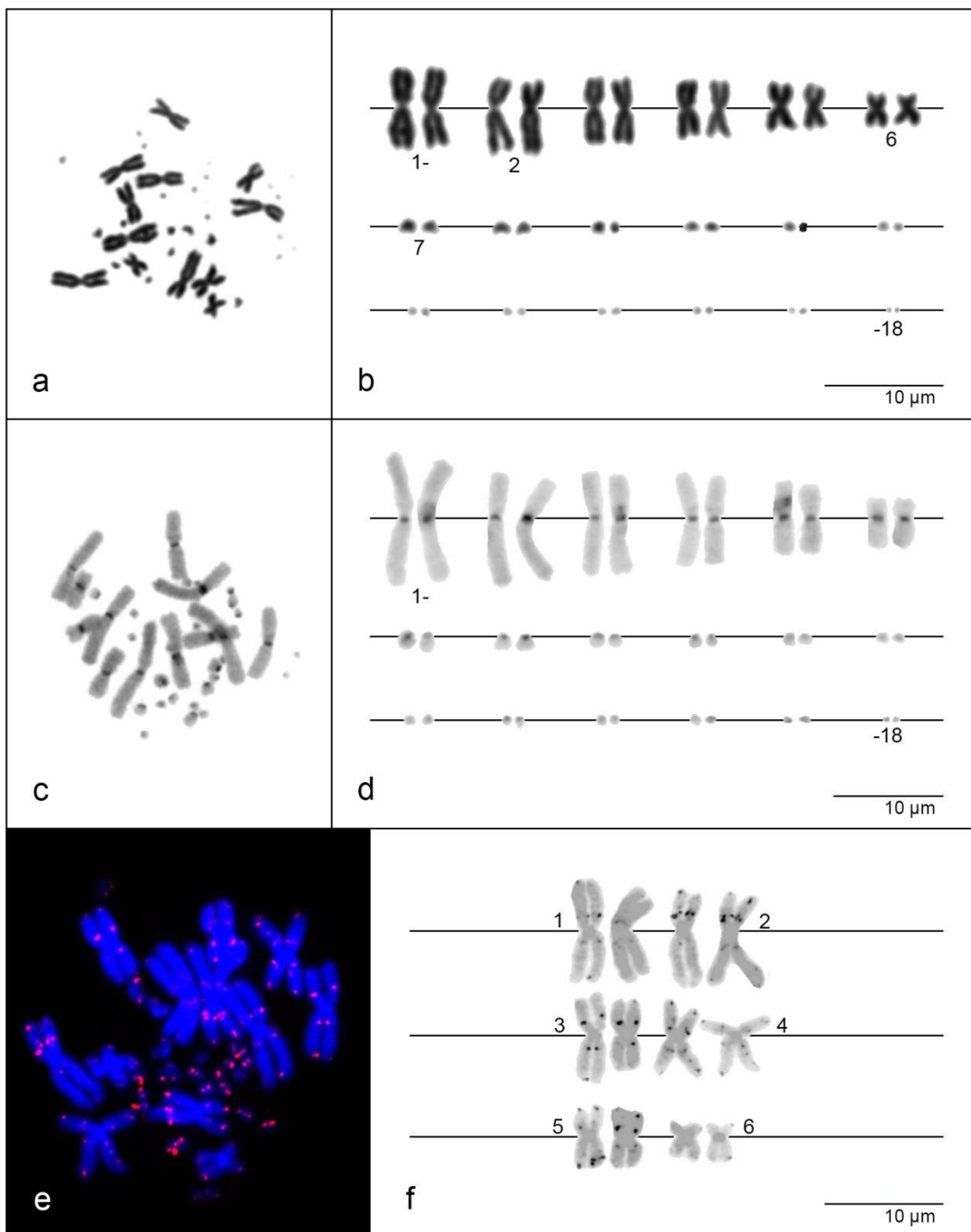
Diploidní počet chromosomů samice (Obr. 20 a,b,c,d) i samce (Obr. 20 e,f,g) druhu *Cyclura nubila* byl shodně  $2n=36$ . Jednalo se o nejrozšířenější karyotyp mezi leguány s šesti páry makrochromosomů a 12 páry mikrochromosomů. Chromosomy byly postupně se snižující velikosti s ostrým přechodem mezi šestým a sedmým párem. Všechny makrochromosomy byly metacentrické s výjimkou druhého páru, který byl submetacentrický. Karyotyp tohoto druhu nebyl doposud známý. Bohužel v preparátech bylo obsaženo velmi málo hodnotitelných metafází, což na spolehlivé určení karyotypu stačilo, ale na hodnocení metodou C-proužkování nebyly nalezeny metafáze s dostatečně kvalitním rozložením chromosomů k sestavení karyotypu (především u samce). Výskyt heterochromatinu na druhém páru makrochromosomů v distální oblasti q raménka je doložen u obou pohlaví – u samice s karyotypem (Obr. 20c,d), u samce snímkem metafáze (Obr. 20g). Na základě použitých metod nebyl nalezen rozdíl v karyotypech mezi pohlavími.



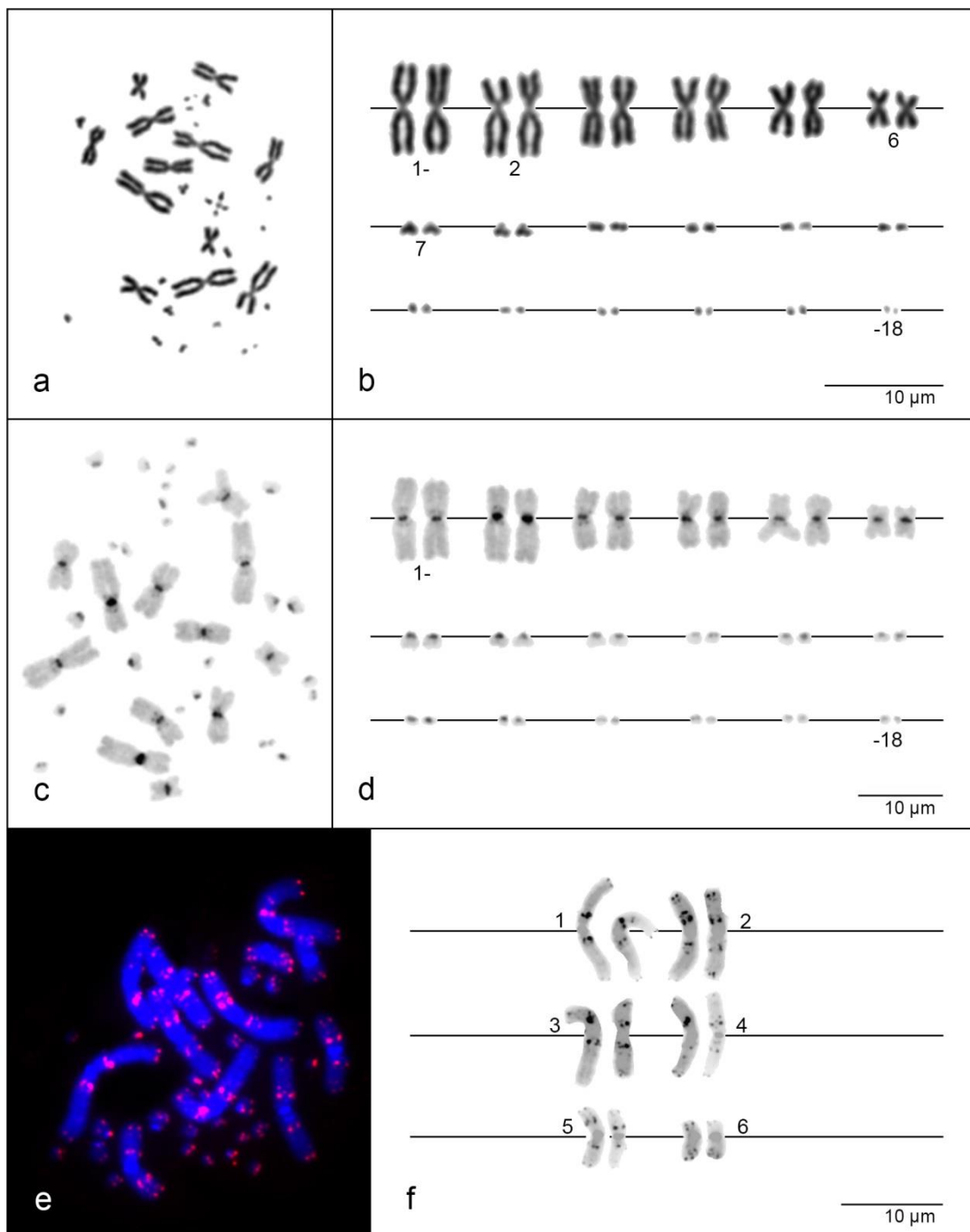


#### 4.1.14. *Chalarodon madagascariensis*

Diploidní počet chromosomů byl shodný pro samici (Obr. 21) i samce (Obr. 22) druhu *Chalarodon madagascariensis*  $2n=36$ . Karyotyp byl tvořen šesti páry makrochromosomů a 12 páry mikrochromosomů. Velikost chromosomů se postupně snižovala, ostrá hranice byla mezi šestým a sedmým párem chromosomů. Makrochromosomy byly metacentrické s výjimkou druhého páru, který byl submetacentrický, sporný šestý pár byl na pomezí sub- a metacentrika. Mikrochromosomy s jasnou polohou centromery byly akrocentrické. C-proužkování odkrylo výrazné bloky heterochromatinu v oblasti centromery všech chromosomů, s výjimkou nejmenších mikrochromosomů, kde nebyl vzhledem k malé velikosti chromosomů heterochromatin pozorován (Obr. 21c,d – samice, Obr. 22c,d – samec). Genom samce i samice byl vyšetřen metodou FISH se specifickou telomerickou sondou. Tato sonda odhalila několikanásobné ITS na všech makrochromosomech. Na každém makrochromosomu pozorovaném u samce (Obr. 22e,f) byly nejméně dva proužky signálů – jeden nad primární konstrikcí a druhý lokalizovaný pod ní. Na druhém chromosomu z prvního páru byly patrné tři výrazné proužky ITS. Na druhém páru makrochromosomů bylo zaznamenáno až pět ITS – dva proužky ITS nad i pod primární konstrikcí a jeden proužek signálu v distální části p raménka. U čtvrtého páru, zejména na druhém chromosomu, jsou rozpoznatelné až čtyři proužky ITS. Na všech chromosomech byly patrné očekávané signály v oblasti telomer. U samice nebyl zaznamenán tak silný a jasný signál, přesto však byly detekovány minimálně dva proužky signálu na prvních pěti párech makrochromosomů a na šestém páru v oblasti telomer bylo zaznamenáno více roztroušeného signálu než je pro telomery běžné (Obr. 21e,f). Použitými metodami se nepodařilo odlišit karyotyp samce a samice.



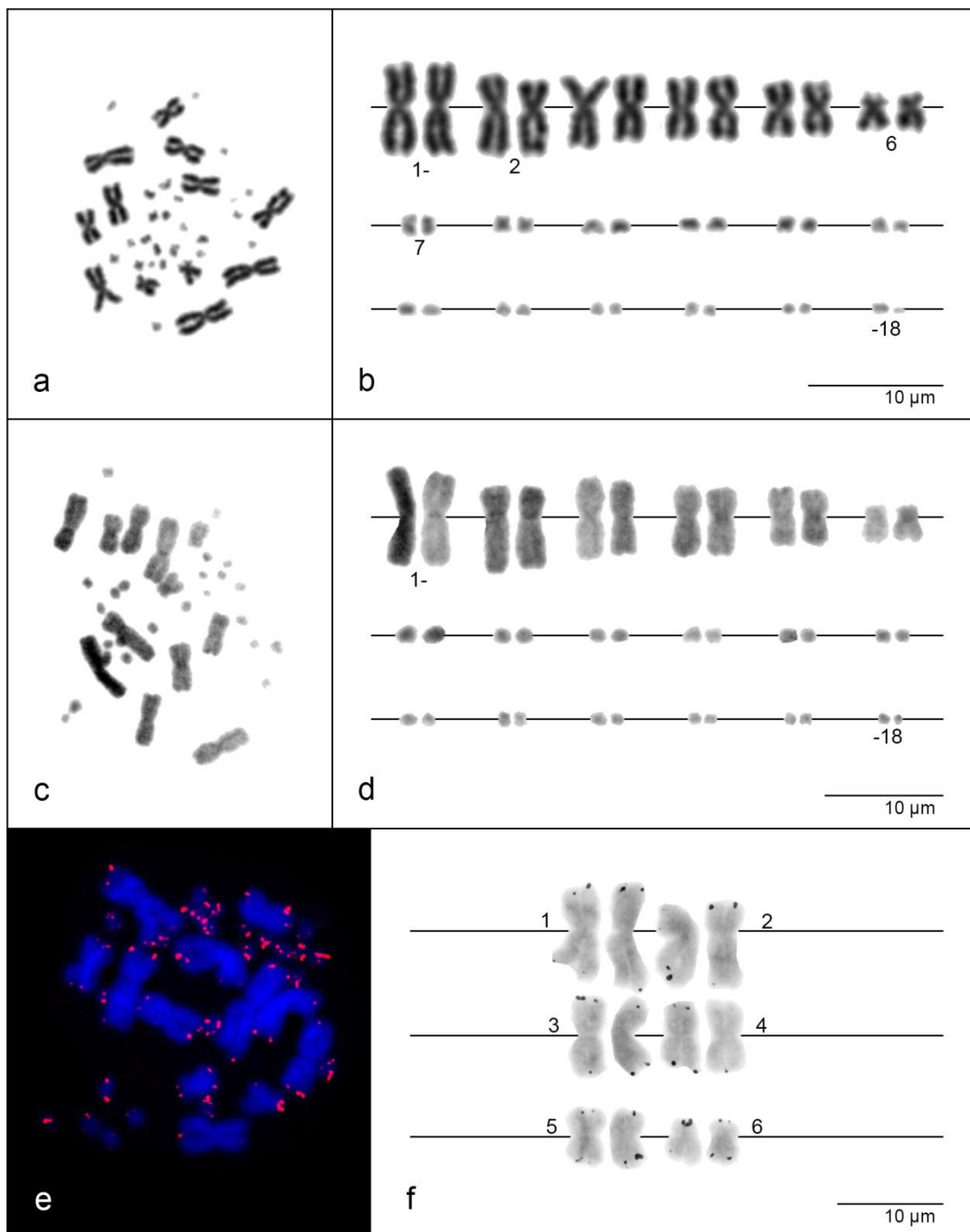
**Obr. 21** Metafáze a karyotypy samice druhu *Chalarodon madagascariensis*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (e) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (f).



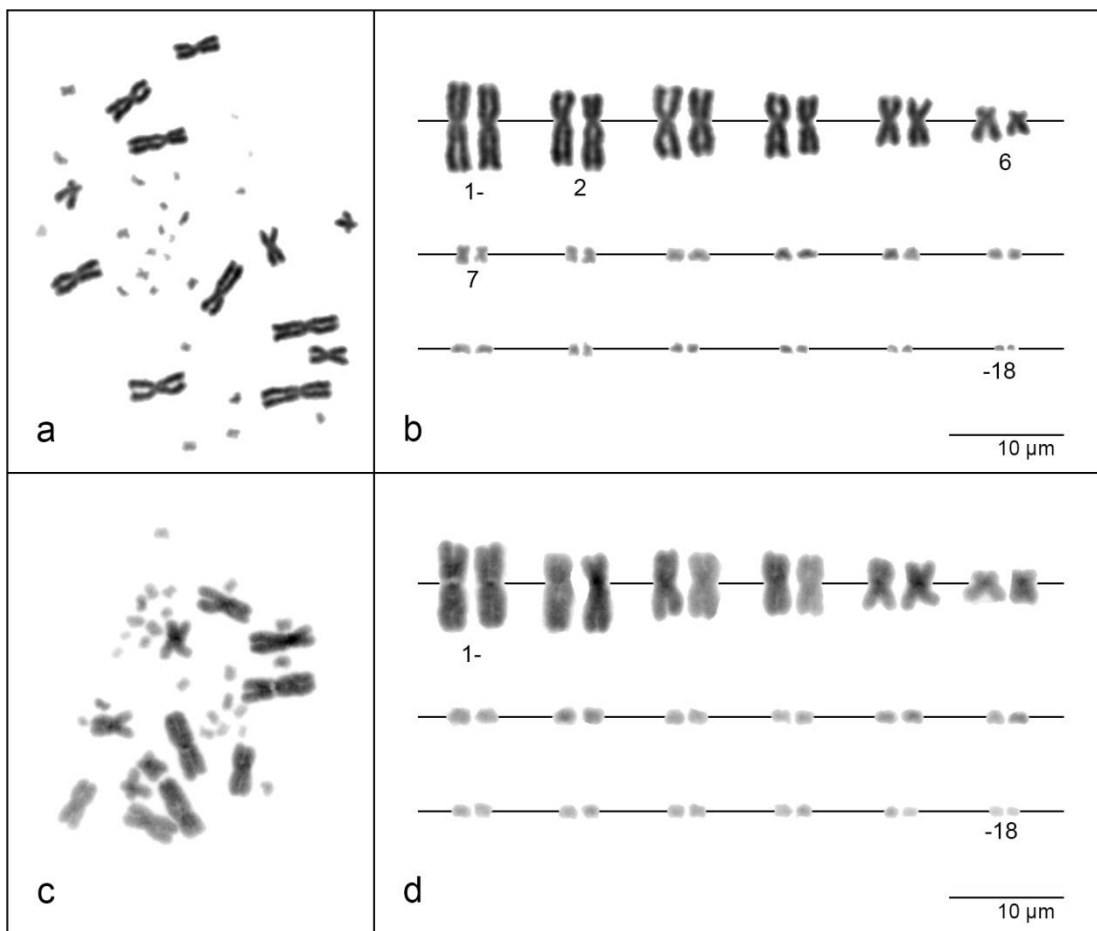
**Obr. 22** Metafáze a karyotypy samce druhu *Chalarodon madagascariensis*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (e) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (f).

#### **4.1.15. *Laemanctus longipes***

Diploidní počet chromosomů byl u samice (Obr. 23) a samce (Obr. 24) druhu *Laemanctus longipes* shodně  $2n=36$ . Karyotyp byl morfologií a počtem chromosomů velmi podobný již zmíněnému karyotypu samice *Basiliscus plumifrons*. Dva páry makrochromosomů byly taktéž submetacentrické oproti ostatním čtyřem metacentrickým párům. Dvanáct párů mikrochromosomů bylo postupně zmenšující se velikosti. C-proužkování neodhalilo žádné výrazné bloky heterochromatinu v genomu obou pohlaví. Velmi slabé proužky byly patrné pouze v centromeře některých makrochromosomů, bez jasného vzoru napříč hodnocenými metafázemi (Obr. 23c,d – samice; Obr. 24c,d – samec). Na základě použitých metod se nepodařilo odhalit rozdíl v karyotypu mezi pohlavími. Vyšetření samičího genomu metodou FISH se specifickou telomerickou sondou odhalilo pouze standardní signály v telomerách (Obr. 23e,f).



**Obr. 23** Metafáze a karyotypy samice druhu *Laemanctus longipes*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (e) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (f).

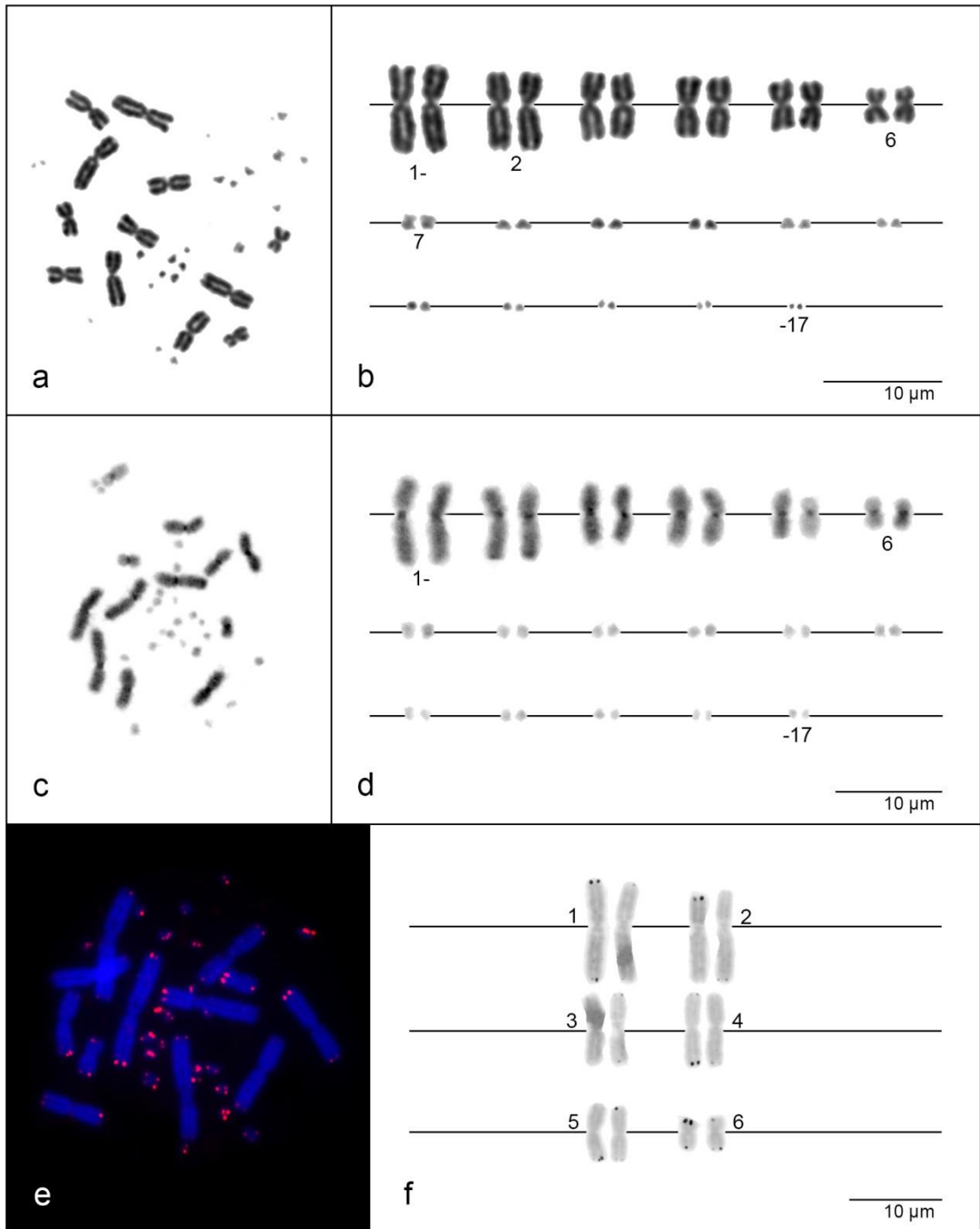


**Obr. 24** Metafáze a karyotypy samce druhu *Laemantus longipes*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d).

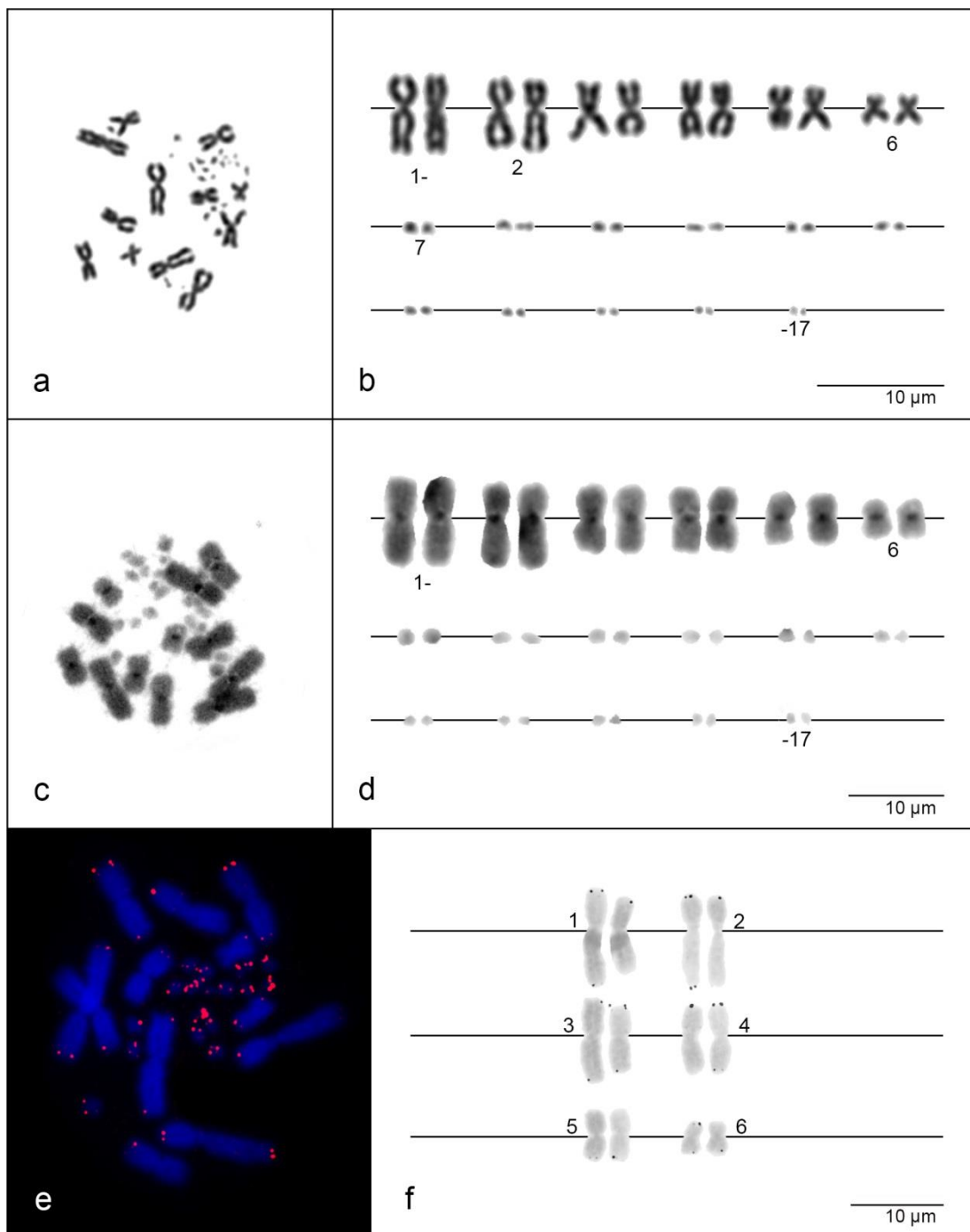
#### **4.1.16. *Leiocephalus carinatus***

Diploidní počet chromosomů byl u samice (Obr. 25) a samce (Obr. 26) druhu *Leiocephalus carinatus* shodně  $2n=34$ . Karyotyp se skládal z šesti párů makrochromosomů a 11 párů mikrochromosomů. Chromosomy byly postupně zmenšující se velikosti, s ostrým přechodem mezi šestým a sedmým párem. Makrochromosomy byly metacentrické s výjimkou druhého páru, který byl submetacentrický. Tento popis se shodoval s již dříve publikovaným karyotypem tohoto druhu (Porter et al. 1989). Pomocí metody C-proužkování byl vizualizován heterochromatin v oblasti centromery všech makrochromosomů (Obr. 25c,d – samice; Obr. 26c,d – samec). U mikrochromosomů nebyla detekována žádná akumulace heterochromatinu. Taktéž hybridizace specifické telomerické sondy na genomy samice (Obr. 25e,f) a samce (Obr. 26e,f) neodhalila žádné ITS a vážala se pouze do oblasti telomer. Rozdíl v karyotypu mezi pohlavími nebyl pomocí použitých metod odhalen.





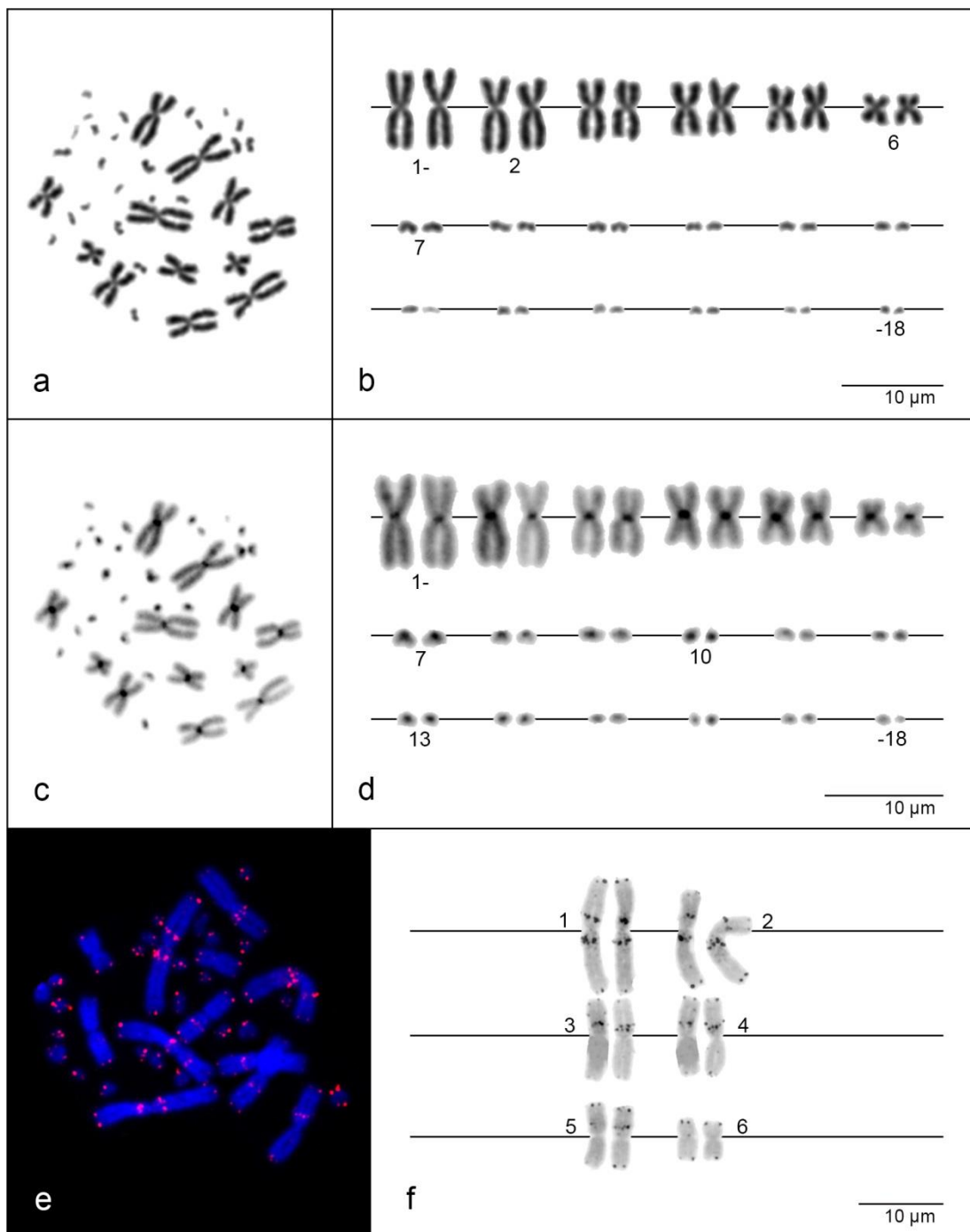
**Obr. 25** Metafáze a karyotypy samice druhu *Leiocephalus carinatus*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (e) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (f).



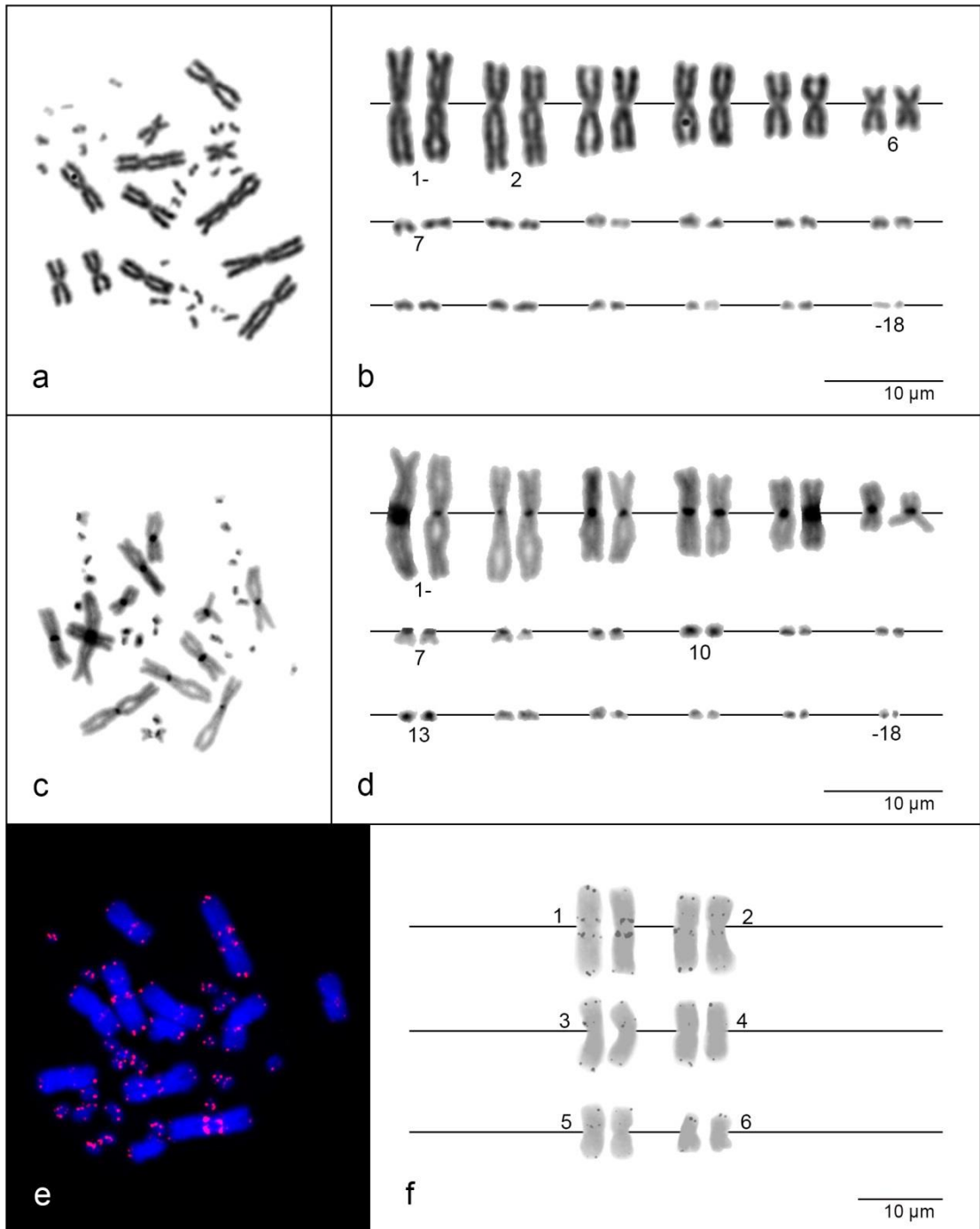
**Obr. 26** Metafáze a karyotypy samce druhu *Leiocephalus carinatus*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (e) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (f).

#### 4.1.17. *Oplurus fierinensis*

Diploidní počet chromosomů byl u samice (Obr. 27) a samce (Obr. 28) shodně  $2n=36$ . Morfologie i počet chromosomů byl stejný jako u již zmíněného druhu *Chalarodon madagascariensis* ze stejné čeledi (Opluridae). Chromosomy byly postupně klesající velikosti s ostrým přechodem mezi šestým a sedmým párem. Makrochromosomy byly s výjimkou druhého submetacentrického páru všechny metacentrické. Na hraně sub- a metacentrického chromosomu byl šestý pár. Převážná část mikrochromosomů byla patrně akrocentrická. Karyotyp tohoto druhu nebyl doposud publikován. C-proužkováním byl odhalen heterochromatin na všech chromosomech v oblasti primární konstriktce (Obr. 27c,d – samice; Obr. 28c,d – samec), s výjimkou nejmenších mikrochromosomů, kde nebyl patrný zřejmě z důvodu malé velikosti chromosomů. Výraznější bloky heterochromatinu byly pozorovány u sedmého, desátého a třináctého páru chromosomů u obou pohlaví. Specifická telomerická sonda hybridizovala na všech chromosomech v oblasti telomer a ITS byly zachyceny na prvních pěti párech chromosomů. Přičemž na prvním a druhém páru byly zachyceny dva výrazné proužky signálu okolo centromery a na následujících třech párech chromosomů po jednom proužku detekovaného specifického signálu. Stejný vzorec byl nalezen u samičího (Obr. 27e,f) i samčího genomu (Obr. 28e,f). Rozdíl v karyotypu samice a samce nebyl nijak výrazný, nutno však zmínit, že nejmenší mikrochromosom v samčím genomu byl oproti párovému vždy menší (Obr. 28d – 18. pár v karyotypu). Drobnost tohoto chromosomu komplikovala jeho objevení, dost často zřejmě docházelo k jeho „nalepení“ na nějaký z makrochromosomů a metafáze se zdály neúplné (35 chromosomů). Tato heteromorfie nebyla pozorována u chromosomů samice, a tak by mohla poukazovat na pohlavní chromosom Y, nicméně C-proužkování nepotvrdilo heterochromatinizaci tohoto chromosomu.



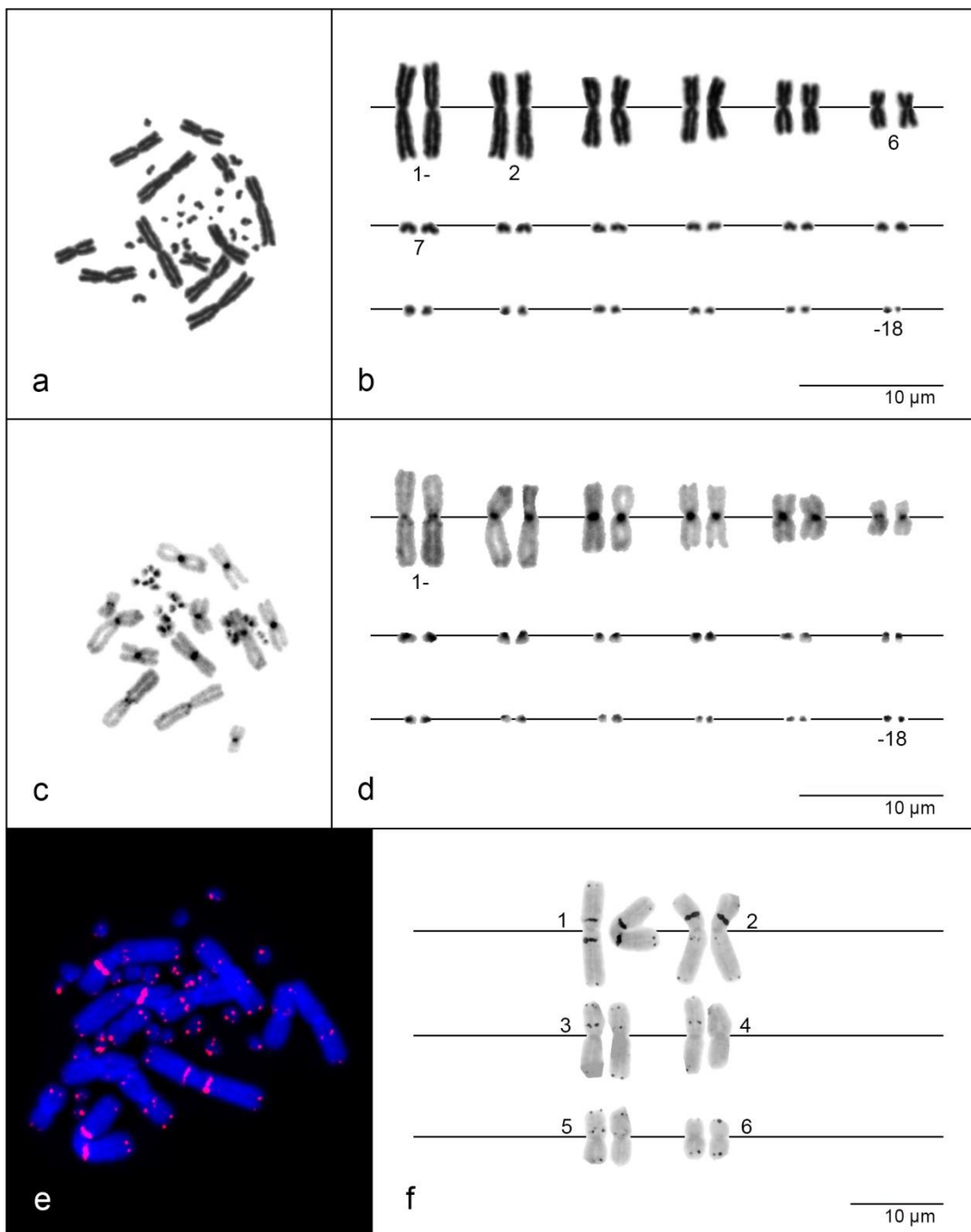
**Obr. 27** Metafáze a karyotypy samice druhu *Oplurus fierinensis*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (e) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (f).



**Obr. 28** Metafáze a karyotypy samce druhu *Oplurus fierinensis*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (e) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (f).

#### 4.1.18. *Oplurus grandidieri*

Diploidní počet chromosomů byl u samce druhu *Oplurus grandidieri*  $2n=36$  (Obr. 29). Morfologie i počet chromosomů byly stejné jako u druhu *Chalarodon madagascariensis* a sesterského druhu *Oplurus fierinensis* ze stejné čeledi (Opluridae). Chromosomy byly postupně snižující se velikosti s ostrou hranicí mezi šestým a sedmým párem. Druhý a zřejmě i šestý pár makrochromosomů byl submetacentrický oproti ostatním metacentrickým. Patrně většina mikrochromosomů byla akrocentrických, u některých z nich byla pozice centromery nejasná, vzhledem k jejich malé velikosti. Na osmnáctém páru byla patrná heteromorfie, kde druhý mikrochromosom z páru byl menší (Obr. 29b,d). Tato heteromorfie byla pozorována u všech hodnocených metafází. C-proužkování detekovalo bloky heterochromatinu v centromere všech chromosomů (Obr. 29c,d). Metodou FISH se specifickou telomerickou sondou byl detekován standardní signál na všech chromosomech v oblasti telomer a ITS na prvních pěti párech makrochromosomů. Dva silné signály byly zaznamenány na prvním páru chromosomů v oblasti nad a pod centromerou. Na druhém páru byl detekován silný signál ve střední části p raménka a slabší signál na q raménku v blízkosti centromery. Na třetím, čtvrtém a pátém páru byly ITS pozorovány jako jeden proužek v oblasti nad centromerou.

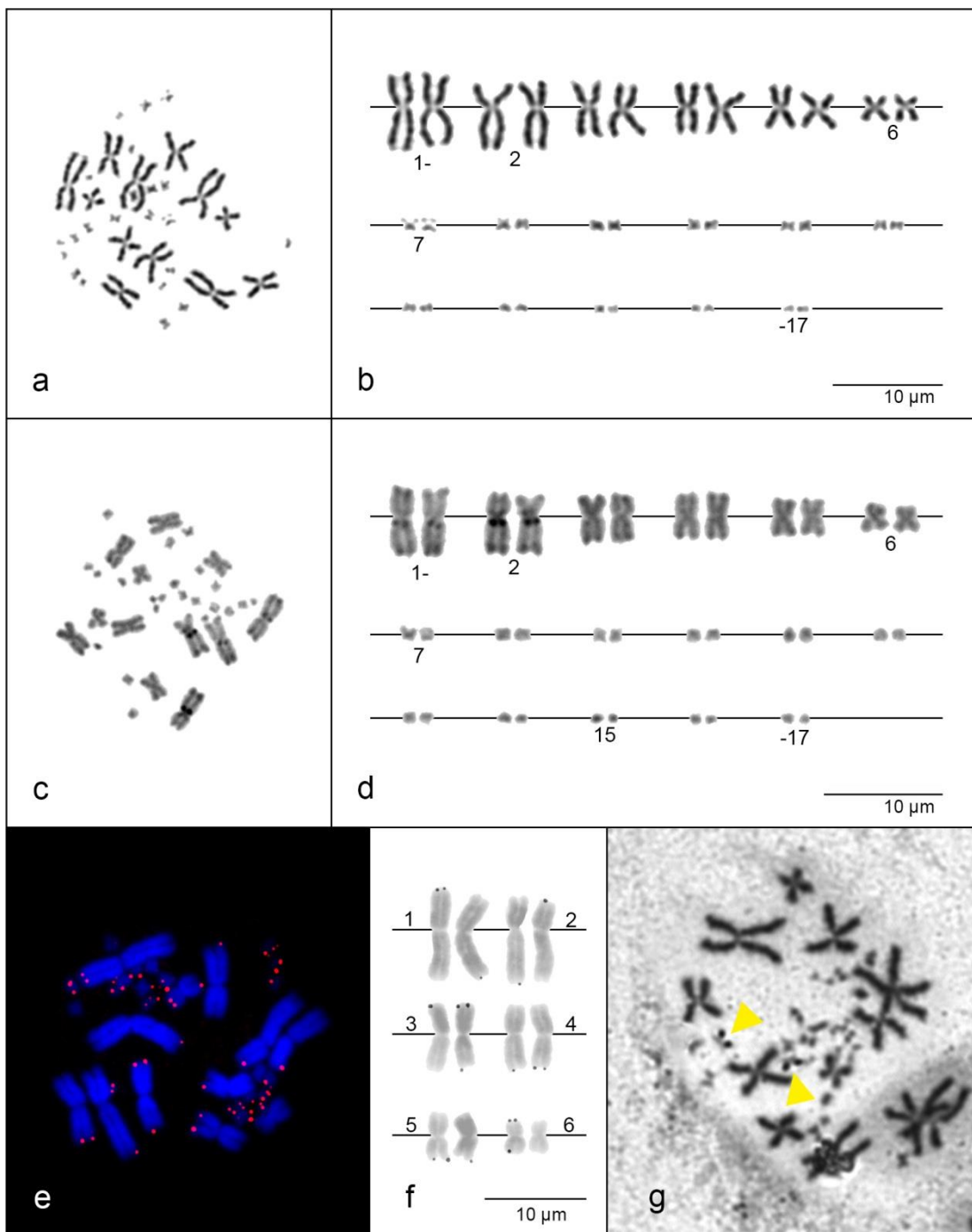


**Obr. 29** Metafáze a karyotypy samce druhu *Oplurus grandidieri*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (e) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (f).

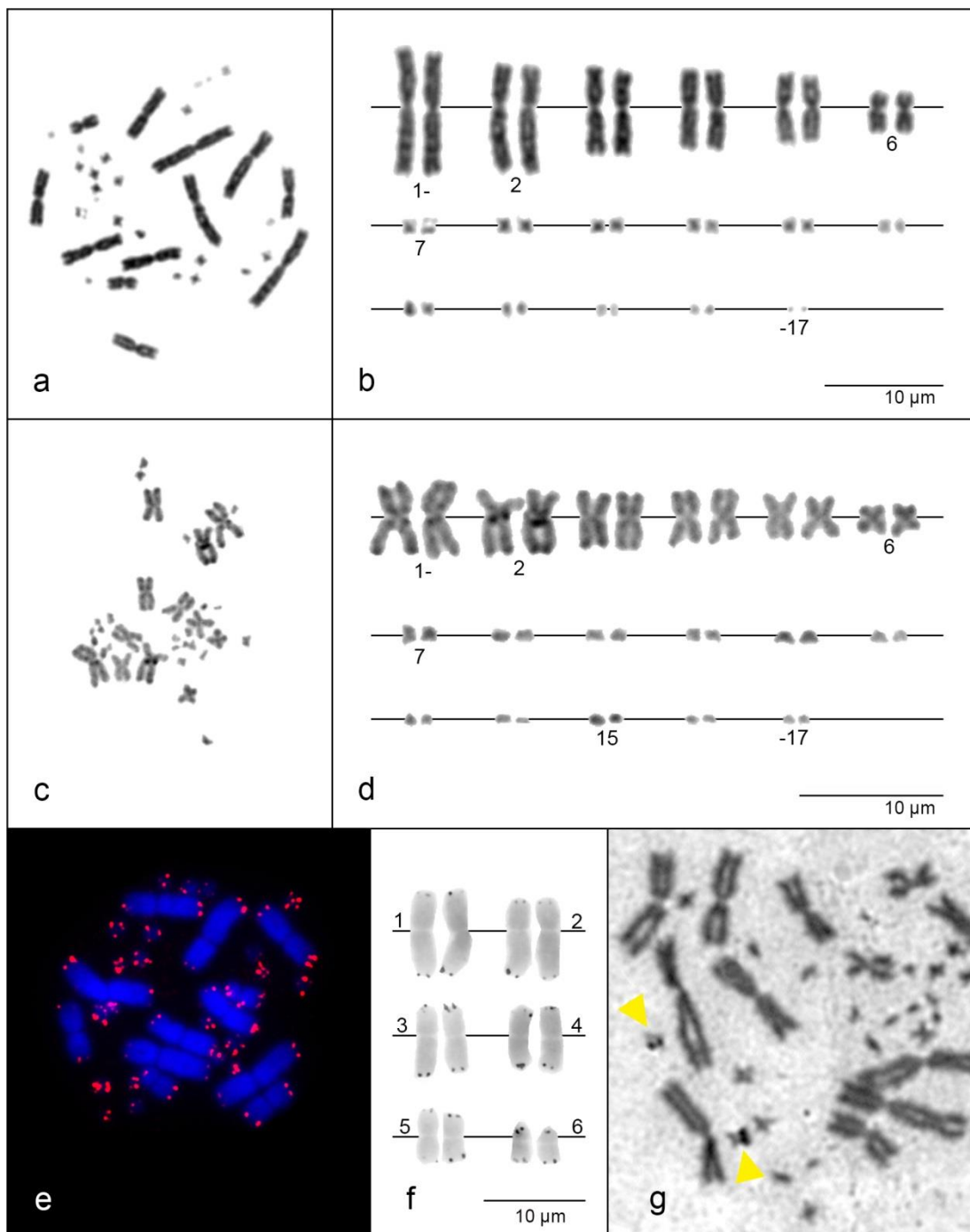
#### **4.1.19. *Petrosaurus thalassinus***

Diploidní počet chromosomů byl u samice (Obr. 30) a samce (Obr. 31) druhu *Petrosaurus thalassinus* shodně  $2n=34$ . Karyotyp se skládal z šesti párů makrochromosomů, které byly, s výjimkou druhého submetacentrického páru, metacentrické a 11 párů mikrochromosomů. Chromosomy byly postupně se snižující velikosti s ostrým přechodem mezi šestým a sedmým párem chromosomů. Metodou C-proužkování byl odhalen heterochromatin v oblasti centromery na prvním a druhém páru. Z mikrochromosomů byl nápadněji heterochromatinizovaný 15. pár. Tento vzor heterochromatinu byl shodný pro obě pohlaví (Obr. 30d – samice; Obr. 31d – samec). Pomocí metody FISH a specifické telomerické sondy byly vyšetřeny genomy obou pohlaví a v obou případech byl signál detekován pouze v oblastech telomery u všech chromosomů (Obr. 30e,f – samice; Obr. 31e,f – samec). U obou pohlaví byly v karyotypu nalezeny dva chromosomy s nerovnoměrně Giemsou obarvenými raménky. Přičemž vždy jeden z dvojice, pár označený jako sedmý, měl raménka obarvená méně než druhý. Na základě tohoto jevu byly chromosomy vyšetřeny metodou stříbření (AgNOR), pomocí které byla potvrzena přítomnost aktivních organizátorů jadérek u obou pohlaví. Ze snímku metafáze je patrné, že se opravdu jednalo o metacentrické mikrochromosomy sedmého páru (Obr. 30g – samice; Obr. 31g – samec). Na základě použitých metod nebyl mezi pohlavími odhalen rozdíl v karyotypu.





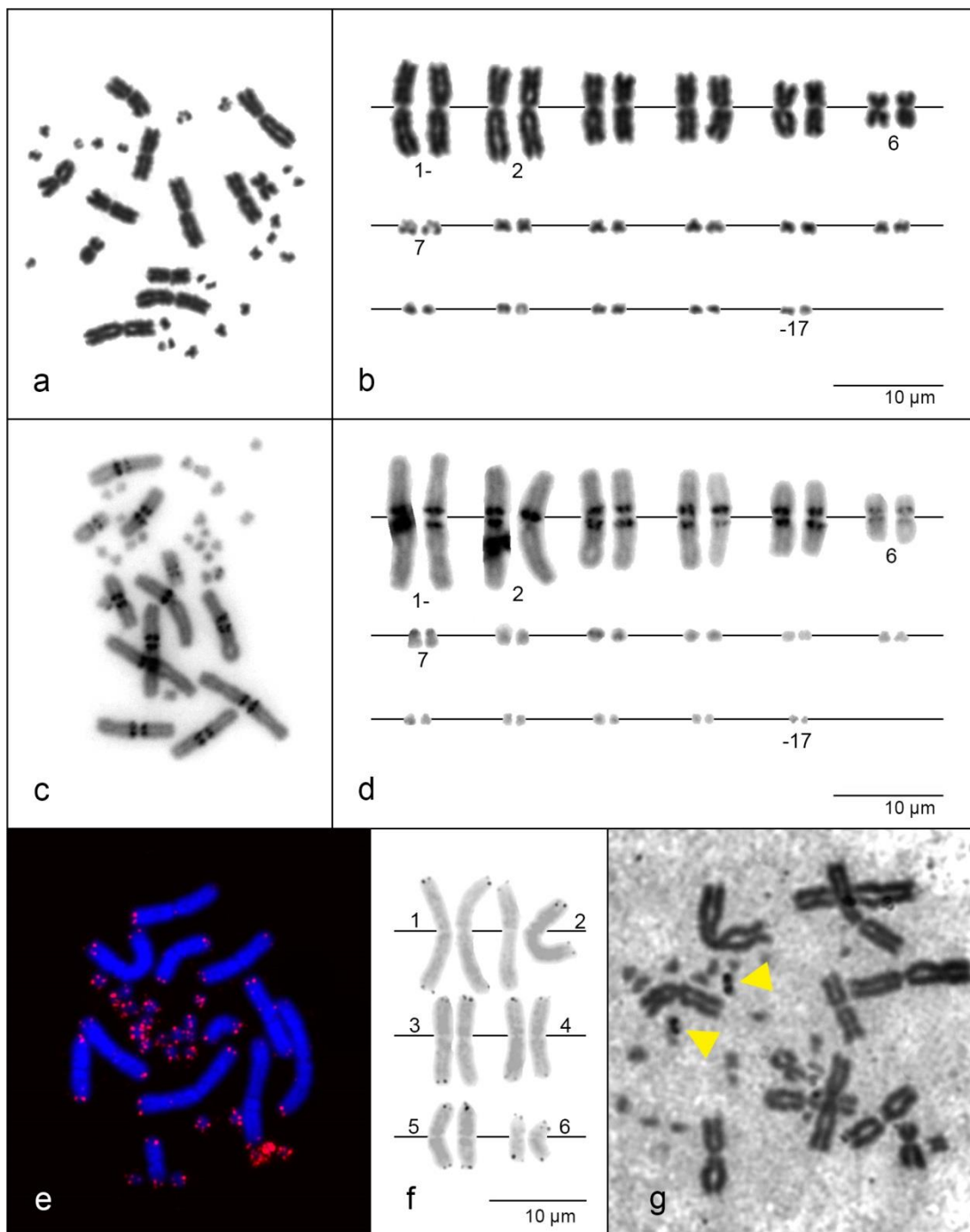
**Obr. 30** Metafáze a karyotypy samice druhu *Petrosaurus thalassinus*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny Giemsou – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (e) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (f); organizátory jadérek na jednom páru mikrochromosomů, odhaleno diferenciálním barvením AgNOR, chromosomy barveny Giemsou (g).



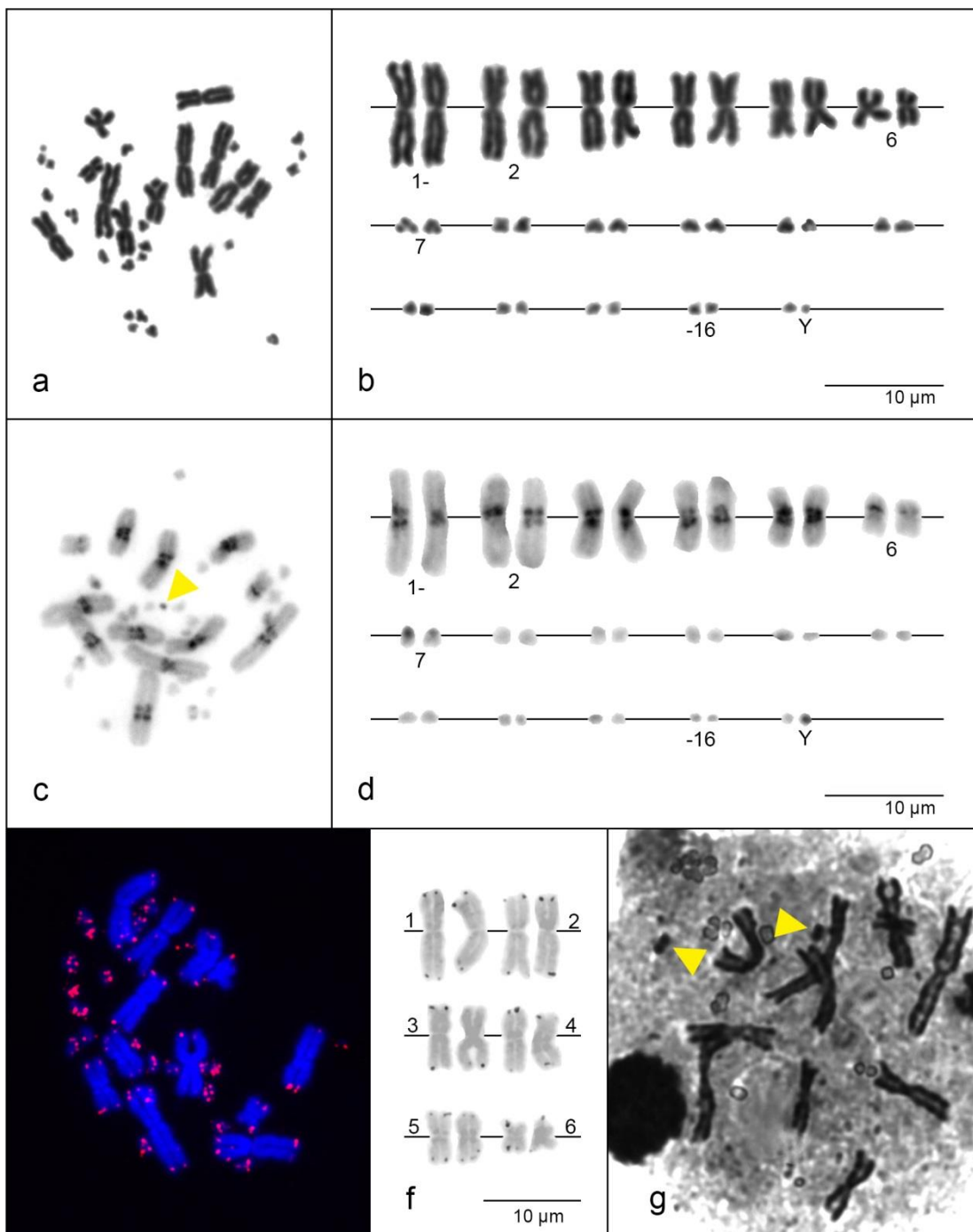
**Obr. 31** Metafáze a karyotypy samce druhu *Petrosaurus thalassinus*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny Giemsou – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (e) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (f); organizátory jadérek na jednom páru mikrochromosomů, odhaleno diferenciálním barvením AgNOR, chromosomy barveny Giemsou (g).

#### 4.1.20. *Sceloporus variabilis*

Diploidní počet chromosomů byl u samice (Obr. 32) a samce (Obr. 33) druhu *Sceloporus variabilis* shodně  $2n=34$ . Velikost chromosomů se postupně snižovala s ostrou hranicí mezi šestým a sedmým párem. S výjimkou druhého submetacentrického páru byly všechny makrochromosomy metacentrické. Poloha centromery u mikrochromosomů nebyla jednoznačná k určení jejich morfologie. U samce tohoto druhu byla patrná heteromorfie ve velikosti nejmenšího páru mikrochromosomů. Menší chromosom z tohoto páru byl označen jako pohlavní chromosom Y (Obr. 33b). Pohlavní chromosom X nebylo možné mezi mikrochromosomy jednoznačně určit. Tento popis karyotypu a identifikace Y chromosomu se shodovala s již dříve publikovaným popisem (Cole 1978). Identifikace pohlavního chromosomu Y byla potvrzena také metodou C-proužkování – pohlavní chromosom byl výrazně heterochromatinizován. Nápadné bloky heterochromatinu byly pozorovány shodně jako dva proužky okolo primární konstrikce všech makrochromosomů a na jednom páru mikrochromosomů (7. pár; Obr. 32c,d – samice; Obr. 33c,d – samec). U obou pohlaví byla odhalena nerovnoměrná distribuce heterochromatinu na druhém páru chromosomů, která byla dobře patrná na všech hodnocených metafázích. Specifická telomerická sonda hybridizovala s genomy obou pohlaví pouze v oblasti telomer, přítomnost ITS nebyla prokázána (Obr. 32e,f – samice; Obr. 33e,f – samec). Na základě nedokonalého obarvení sedmého páru chromosomů, byly chromosomy vyšetřeny metodou stříbření (AgNOR), což potvrdilo přítomnost aktivních organizátorů jadérek u obou pohlaví (Obr. 32g – samice; Obr. 33g – samec).



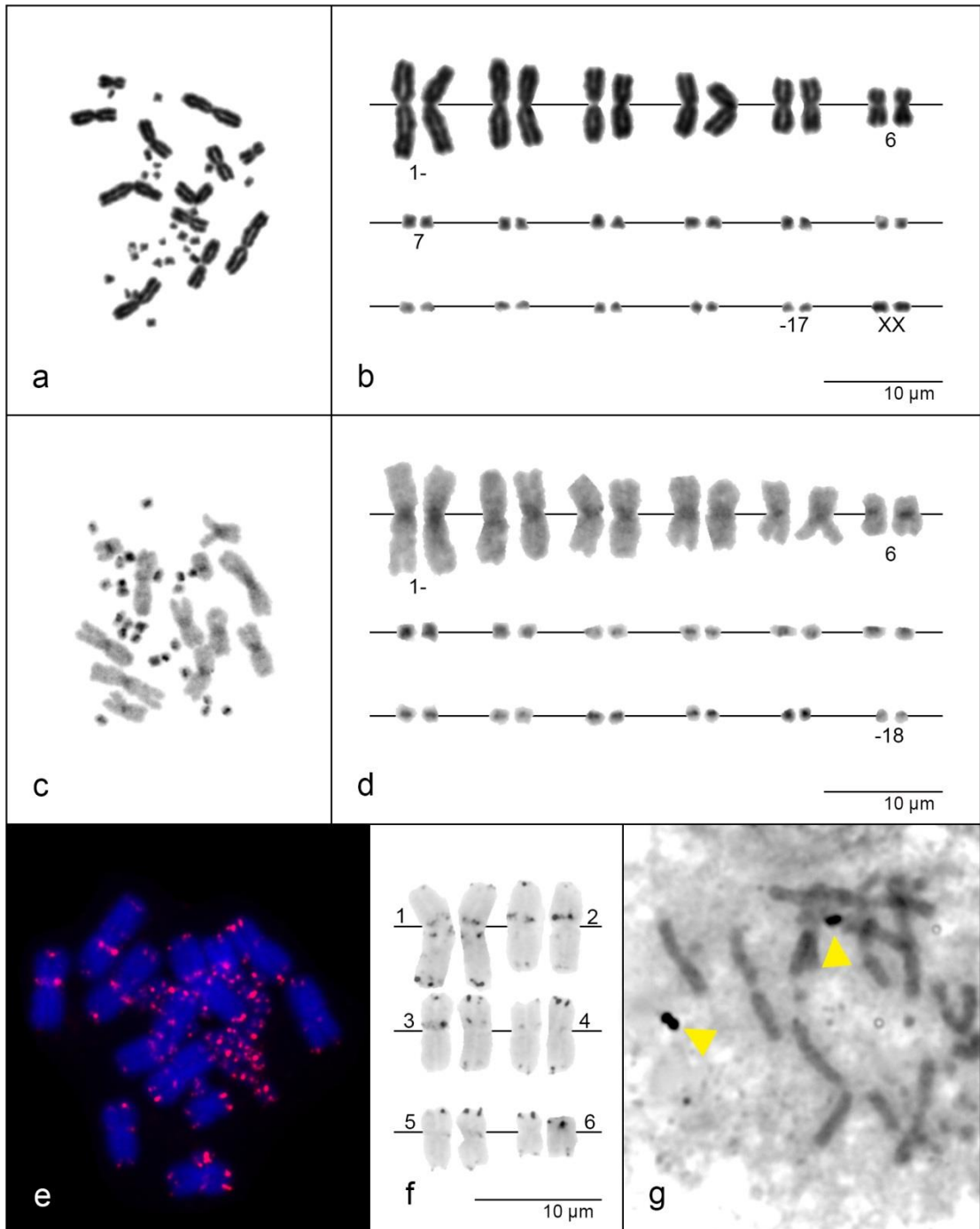
**Obr. 32** Metafáze a karyotypy samice druhu *Sceloporus variabilis*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (e) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (f); organizátory jaderek na jednom páru mikrochromosomů, odhaleno diferenciálním barvením AgNOR, chromosomy barveny Giemsou (g).



**Obr. 33** Metafáze a karyotypy samce druhu *Sceloporus variabilis*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (e) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (f); organizátory jadérek na jednom páru mikrochromosomů, odhaleno diferenciálním barvením AgNOR, chromosomy barveny Giemsou (g).

#### 4.1.21. *Uranoscodon superciliosus*

Diploidní počet chromosomů byl u samice druhu *Uranoscodon superciliosus*  $2n=36$  (Obr. 34). Velikost chromosomů postupně klesala s velkým rozdílem mezi šestým a sedmým párem chromosomů. S výjimkou prvního a šestého submetacentrického páru byly všechny makrochromosomy metacentrické. Polohu centromery mikrochromosomů nebylo možné jednoznačně určit. Popis karyotypu se shodoval s již dříve publikovaným karyotypem tohoto druhu (Pellegrino et al. 1994). Podle publikovaných karyotypů samce a samice v téže práci, se podařilo rozlišit na základě velikosti a morfologie samičí pohlavní chromosomy X v metafázích barvených Giemsou. Metodou C-proužkování byl vizualizován heterochromatin v oblasti centromery zejména na šestém páru makrochromosomů a na mikrochromosomech (Obr. 34c,d). Slabé proužky byly patrné také v centromere ostatních makrochromosomů. Na karyotypu sestaveném z chromosomů ošetřených C-proužkováním nebylo možné určit pohlavní chromosomy X. Použitím FISH se specifickou telomerickou sondou byly odhaleny signály ITS na pěti párech makrochromosomů (Obr. 34e,f). Na prvním páru byly detekovány dva proužky signálu ITS, na druhém páru byl detekován silnější proužek nad centromerou a velmi slabý signál pod centromerou, u čtvrtého a pátého páru byly ITS zachyceny v oblasti centromery. Chromosomy byly vyšetřeny stříbřením (AgNOR), které odhalilo aktivní organizátory na jednom páru mikrochromosomů (Obr. 34g).



**Obr. 34** Metafáze a karyotypy samice druhu *Uranoscodon superciliosus*: metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (b); invertovaný obraz vizualizace heterochromatinu metodou C-proužkování, chromosomy barveny směsí DAPI – metafáze (c) a odpovídající karyotyp (d); FISH se specifickou telomerickou sondou – chromosomy barveny směsí DAPI (modře), červeně vizualizované signály telomerických sekvencí (e) a invertovaný obraz spárovaných makrochromosomů se signály telomerických sekvencí (f); organizátory jadérek na jednom páru mikrochromosomů, odhaleno diferenciálním barvením AgNOR, chromosomy barveny Giemsou (g).





## 5. Diskuze

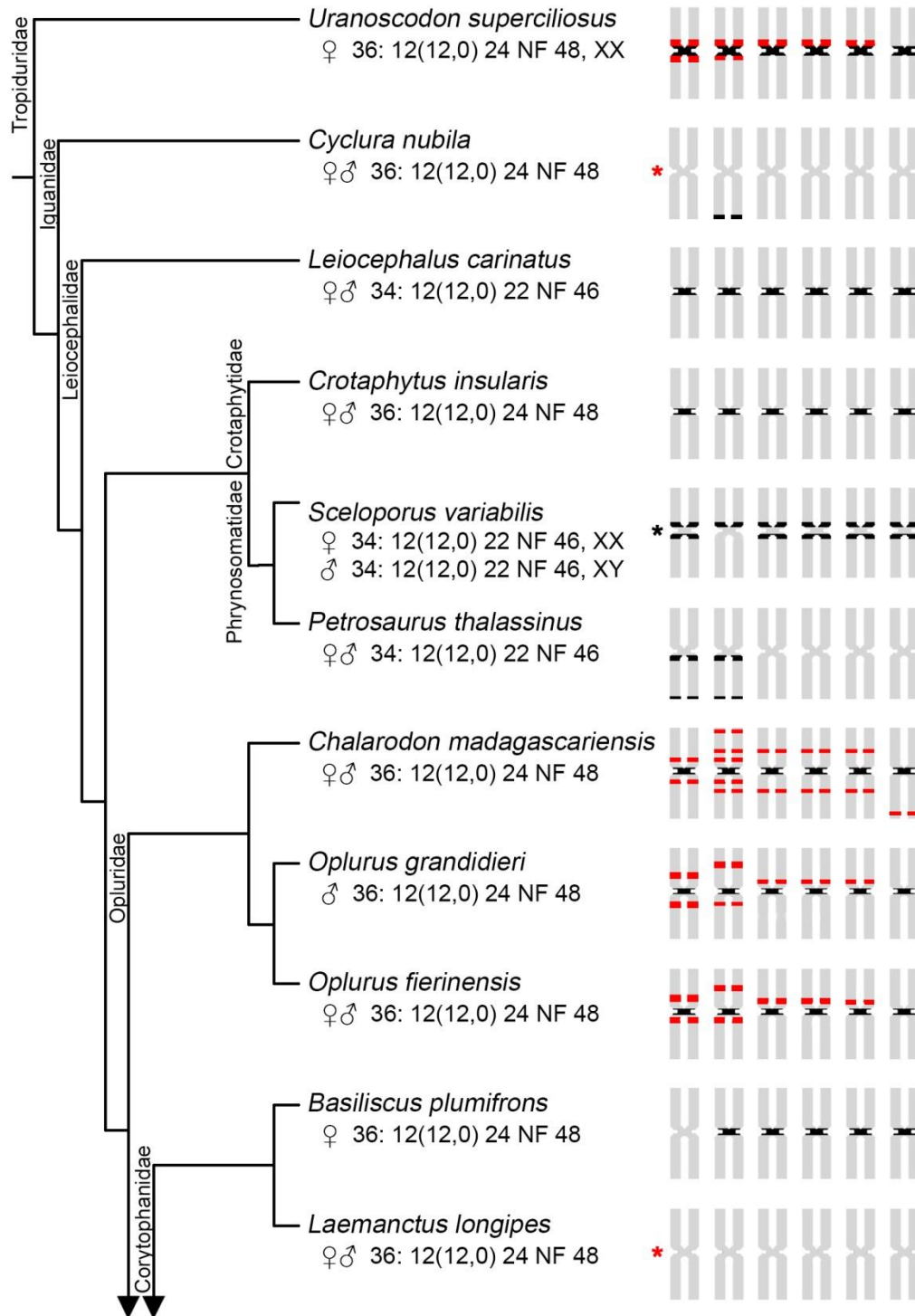
### 5.1. Evoluce karyotypu skupiny Pleurodonta

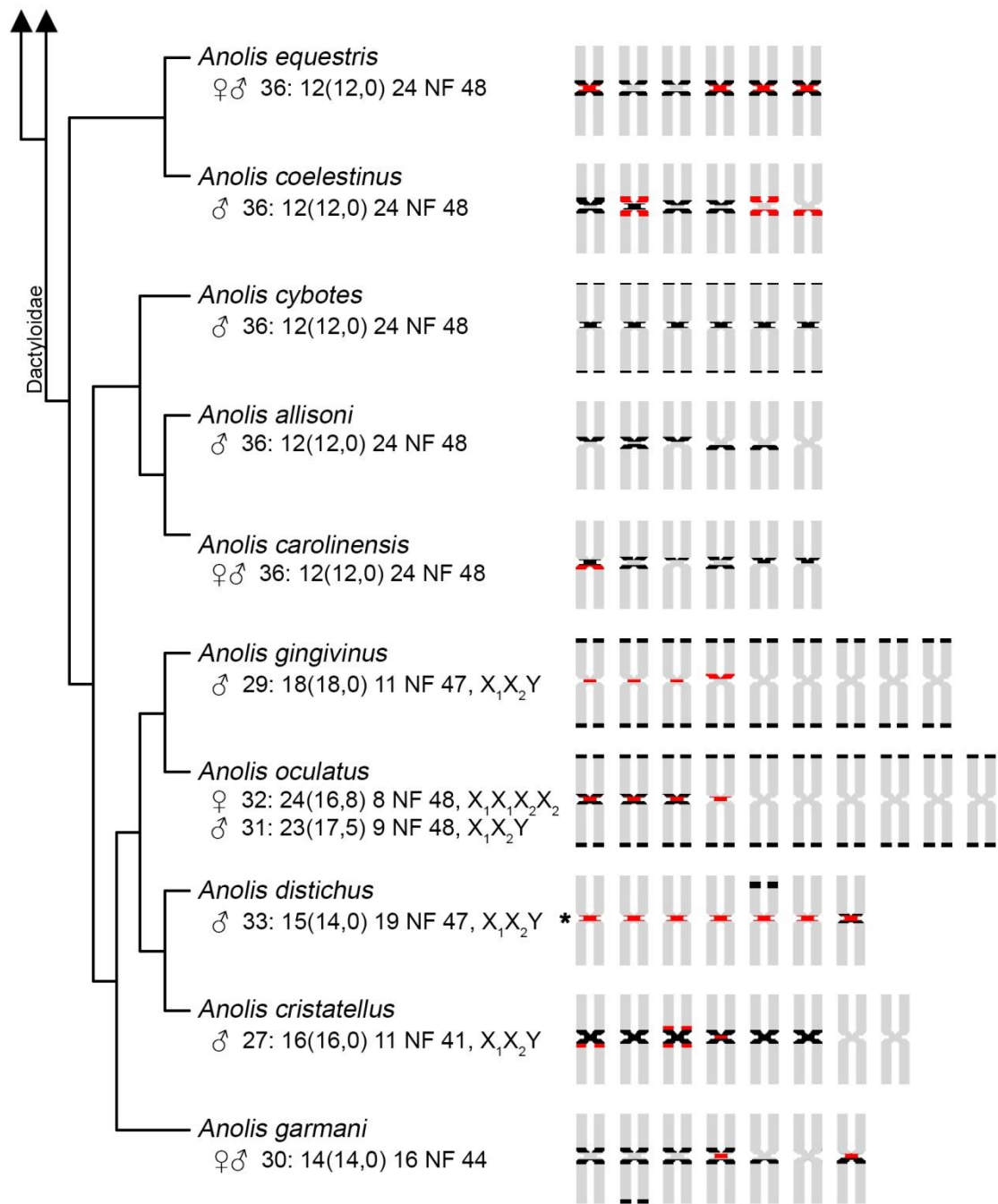
Doposud byl karyotyp popsán přibližně pro 300 z celkového počtu 1075 recentních druhů leguánů (Olmo & Signorino 2005). V diplomové práci byl vyšetřen karyotyp celkem 21 druhů (viz Obr. 35). U třinácti z nich, které byly již dříve cytogeneticky zkoumány, byl publikovaný popis karyotypu potvrzen a doplněn o nová zjištění. Dále se podařilo popsat karyotyp osmi druhů, pro něž nebyla cytogenetická data dosud známa. Srovnáním se známými karyotypy příbuzných druhů nebyl u těchto nově popsaných karyotypů nalezen rozdíl v počtu ani v základní morfologii chromosomů. Karyotypy druhů *Basiliscus plumifrons* a *Laemactus longipes* se v tomto ohledu shodovaly s karyotypem druhu *Basiliscus vittatus* (Gorman et al. 1967), karyotyp druhu *Crotaphytus insularis* se shodoval s karyotypem druhu *Crotaphytus collaris* (De Smet 1981), karyotyp druhu *Cyclura nubila* se shodoval s karyotypem druhu *Cyclura cornuta* (Gorman et al. 1967), karyotyp druhu *Petrosaurus thalassinus* se shodoval s karyotypem druhu *Petrosaurus mearnsi* (Gorman et al. 1969) a karyotypy druhů *Chalarodon madagascariensis*, *Oplurus fierinensis* a *O. grandidieri* se shodovaly s karyotypem druhu *O. cuvieri* (Gorman 1967).

Pro většinu zkoumaných druhů (kromě odvozenějších druhů z rodu *Anolis*) byl zjištěn diploidní počet chromosomů  $2n=36$ . Výjimkou pak byl druh *Leiocephalus carinatus* a zahrnuté druhy čeledi Phrynosomatidae s  $2n=34$  chromosomy. Základní morfologie chromosomů byla stejná, v běžném karyotypu s 36 chromosomy bylo standardně přítomno 12 dvouramenných makrochromosomů a 24 mikrochromosomů s  $NF=48$ . Tento karyotyp byl pozorován ve většině linií skupiny Pleurodonta a dalších šupinatých plazů (Olmo & Signorino 2005). Na základě provedené analýzy dostupných a nově zjištěných cytogenetických dat leguánů (ancestrální rekonstrukce diploidního počtu a typu pohlavních chromosomů; Altmanová 2011; viz Přílohy – Kladogramy 1 a 2) můžeme tento karyotyp považovat za široce rozšířený a pro leguány ancestrální.

Přestože jsou leguání chromosomy velice konzervativní ve velikosti, počtu a základní morfologii, zřejmě u nich docházelo k poměrně častým vnitrochromosomálním přestavbám. U druhů rodu *Anolis* byl pozorován posun centromery u některých původně metacentrických makrochromosomů k výslednému submetacentrickému typu. Tato změna polohy centromery, vzniklá např. mechanismem pericentrické inverze, by mohla způsobit

zásadní změnu v expresi genů lokalizovaných v oblastech zlomu a mít tedy vliv na zdatnost jedince (Kirkpatrick 2010). Druhové zacílení této práce a použité metody však neumožnily podrobněji přestavby detekovat a zjistit, jakým způsobem k této změně polohy centromery došlo.





**Obr. 35** Fylogenetický strom studovaných druhů s jednotkovou délkou větví a s vizualizovanými cytogenetickými daty. Symboly samce a samice značí pohlaví jedinců zahrnutých do analýzy. Karyotyp je zapsán sledem: počet chromosomů v diploidní sadě: počet makrochromosomů (dvouramenných, jednoramenných) počet mikrochromosomů, NF = celkový počet ramének, detekované pohlavní chromosomy. Schématické chromosomy představují haploidní sadu makrochromosomů jejichž morfologie je pro zjednodušení uniformní. Bloky heterochromatinu jsou znázorněny černě. Červenou barvou jsou vyznačeny intersticiální telomerické sekvence (signály v oblasti telomer byly vždy přítomné, ale nejsou pro přehlednost zobrazeny). Fylogenetické vztahy podle Pyron et al. 2013.

\* *Cyclura nubila*, *Laemantus longipes* – u těchto druhů nebyla použita metoda FISH s telomerickou sondou

\* Rozdílný blok heterochromatinu v rámci 2. páru makrochromosomů druhu *Sceloporus variabilis* a 5. páru makrochromosomů druhu *Anolis distichus*

Většina cytogenetických studií klasifikuje leguání mikrochromosomy jako metacentrické (např. Leaché & Sites 2009). Toto nebylo potvrzeno vyšetřením mikrochromosomů druhů z čeledi Opluridae. Jak je patrné již na mikrochromosomech barvených Giemsou a mnohem lépe po aplikaci metody C-proužkování, jedná se o mikrochromosomy akrocentrické (Obr. 21, 22, 27-29). Výjimku tvoří nejmenší chromosomy v karyotypu, u kterých není poloha centromery zcela jasná. Možných scénářů, jak ke změně morfologie mikrochromosomů mohlo dojít, se nabízí několik. V rámci intrachromosomálních změn by patrně mohla hrát roli pericentrická inverze či translokace centromery. Díky mnohonásobnému výskytu ITS na makrochromosomech by se taktéž mohlo jednat o interchromosomální přestavby, například translokace fragmentů odštěpených z mikro- na makrochromosomy s inkorporací původních telomerických oblastí za vzniku ITS. Vzhledem k obtížnému určení přesného počtu akrocentrických mikrochromosomů však není zatím možné spolehlivě určit mechanismus jejich vzniku.

### **5.1.1. Akumulace heterochromatinu v genomu zkoumaných druhů**

Genomy všech analyzovaných druhů byly vyšetřeny metodou C-proužkování. Pomocí této techniky diferenciálního barvení byla prozkoumána míra akumulace a rozložení heterochromatinu v genomu. Ze zde zahrnutých druhů byla metoda C-proužkování dříve použita jen u druhu *Uranoscodon superciliosus* (Pellegrino et al. 1994).

Metodu se podařilo úspěšně aplikovat na všechny preparáty a bylo dosaženo očekávané síly signálu. Pouze u druhů *Laemanctus longipes* a *Crotaphytus collaris* byl heterochromatin vizualizován velmi slabě i přes opakování metody s pozmeněným časem denaturace. Lze se tedy domnívat, že u těchto druhů je heterochromatin akumulován jen ve velmi omezené míře nebo vůbec. Míra akumulace heterochromatinu a jeho rozložení v genomu byla napříč studovanými liniemi velmi variabilní (s výjimkou čeledi Opluridae) a nebyl odhalen žádný výrazný evoluční trend v distribuci heterochromatinu. Větší podobnost byla zaznamenána pouze u vzájemně příbuzných druhů. V rámci čeledi Opluridae (druhy *Chalarodon madagascariensis*, *Oplurus fierinensis* a *O. grandidieri*) byly shodně detekovány výrazné bloky konstitutivního heterochromatinu v centromerách všech makrochromosomů a většině mikrochromosomů. Daný znak by tedy mohl být synapomorfii čeledi Opluridae.

Z druhově početněji zastoupené čeledi Dactyloidae byl doposud metodou C-proužkování prověřen pouze druh *Anolis grahami* (Blake 1986), u kterého byl heterochromatin detekován v oblasti centromery a telomer většiny chromosomů. Velmi podobný heterochromatinový vzor byl nalezen i u v této práci zkoumaného blízce příbuzného druhu *A. garmani*, pouze v terminálních oblastech byl signál slabší. Detekce heterochromatinu však zřejmě závisí nejen na teplotě denaturace a renaturace chromosomů, ale i na míře jejich spiralizace, jak je patrné u druhu *Anolis equestris*. Zejména u samce tohoto druhu bylo dosaženo celé sekvence proužků heterochromatinu lokalizovaných do oblasti centromery, a to v důsledku méně spiralizovaných chromosomů. Navzájem blízce příbuzné druhy *Anolis oculatus* a *A. gingivinus* sdílely oproti výše zmíněnému druhu „opačný“ vzor heterochromatinu, který byl lokalizovaný do oblastí telomer a signál v centromerách byl jen velmi slabý.

Neočekávaný výsledek byl získán aplikací C-proužkování u druhu *Anolis distichus*. V karyotypu tohoto druhu byla kromě heterochromatinizace v oblasti centromery nejmenšího páru makrochromosomů, pohlavních chromosomů a mikrochromosomů detekována heteromorfie pátého páru makrochromosomů. Jeden chromosom z páru submetacentriků obsahoval výrazný blok heterochromatinu ve střední části p raménka na všech hodnocených metafázích a u druhého chromosomu byla tato oblast zvýrazněna velmi slabě či nebyla heterochromatinizace pozorována vůbec. Velikost obou chromosomů byla shodná. Podobně nerovnoměrná distribuce heterochromatinu byla publikována u samice fylogeneticky vzdáleného druhu *Tropidurus hispidus* (Kasahara et al. 1987a). V karyotypu *T. hispidus* byla odhalena heteromorfie čtvrtého páru způsobená adicí heterochromatinového bloku na terminální část q ramének jednoho chromosomu, což se ale projevilo i na délce aberantních ramének tohoto chromosomu oproti „normálním“ (Kasahara et al. 1987a). Vzhledem k tomu, že v analýze byl zastoupen pouze jeden samec a vůbec prvním použití tohoto diferenciálního barvení u vyšetřovaného druhu *A. distichus*, však nelze objasnit přesný mechanismus vzniku této heteromorfie. Není tedy jisté, zda se jedná o chromosomální aberaci, která by byla unikátní pouze pro tohoto jedince, nebo zda je možné, že by byla sdílena v celé populaci. Studovaný jedinec pocházel z odchovu v zajetí.

V rámci čeledi Phrynosomatidae byl, kromě druhu *Petrosaurus thalassinus*, zkoumán druh *Sceloporus variabilis*, u něhož byla pozorována taktéž rozdílná akumulace

heterochromatinu, a to sice u druhého páru makrochromosomů (i zde pozorováno na všech hodnocených metafázích). Nerovnoměrná heterochromatinizace uvnitř jednoho páru bývá často projevem diferenciací pohlavních chromosomů (např. Graves 2008). V tomto případě se však nejedná o pohlavně specifický znak, protože byl tento jev pozorován u obou pohlaví. Zároveň byla již dříve u rodu *Sceloporus* velmi dobře zdokumentována přítomnost a morfologie pohlavních chromosomů (Leaché & Sites 2009). Pohlavní chromosom Y druhu *Sceloporus variabilis* byl identifikován jako nejmenší mikrochromosom v karyotypu samce (Cole 1978), což bylo pozorováno i nyní, a nově potvrzeno metodou C-proužkování vizualizující heterochromatinizaci tohoto pohlavního chromosomu. Určitá variabilita v distribuci heterochromatinu může být patrná již na populační úrovni, například Olmo et al. (1986) pozorovali rozdíly v heterochromatinizaci u dvou populací ještěrky poddruhu *Podarcis sicula sicula*.

### **5.1.2. Odhalené aktivní organizátory jadérek u vybraných druhů**

Metoda vizualizace NORů byla použita pouze u čtyř druhů, u kterých bylo nápadné neúplné obarvení oblasti chromosomu pomocí konvenčního barvení. Impregnační stříbrem (AgNOR) byla odhalena přítomnost NORů na jednom páru mikrochromosomů (zřejmě 12. pár) u samice druhu *Uranoscodon superciliosus* (shodně s Pellegrino et al. 1994). Patrně na 7. páru chromosomů (také mikrochromosomy) byly NORy detekovány u obou pohlaví druhů *Sceloporus variabilis* a *Petrosaurus thalassinus* z čeledi Phrynosomatidae, což odpovídá publikovaným datům z Porter et al. (1994). V citované práci byl zahrnut příbuzný druh *Petrosaurus mearnsi*, lokalizace signálů NORů byla shodná i pro druh *P. thalassinus*. Nově bylo zdokumentováno umístění NORů pro čeleď Corytophanidae na jednom z akrocentrických párů mikrochromosomů u samice druhu *Basiliscus plumifrons*. Z dosud publikovaných údajů není zcela jasné, zda ancestrálně byly NORy u leguánů lokalizovány pouze na 2. páru makrochromosomů a nebo na jednom páru mikrochromosomů (Porter et al. 1994). Nově popsané lokalizace NORů nepřináší v tomto ohledu zásadnější informace nutné k rozřešení otázky jejich ancestrálního umístění v rámci karyotypu.

### 5.1.3. Distribuce telomerických sekvencí

Současná znalost distribuce telomerických sekvencí v genomu leguánů byla dosud omezena pouze na dvě studie s celkem pěti zahrnutými druhy náležícími do dvou čeledí – Phrynosomatidae (Meyne et al. 1990) a Polychrotidae (Bertolotto et al. 2001). V této diplomové práci byla metoda FISH se specifickou telomerickou sondou (TTAGGG)<sub>n</sub> použita celkem u 19 druhů z osmi čeledí leguánů. Sonda hybridizovala vždy specificky do oblastí telomer u všech analyzovaných jedinců a u některých druhů byly detekovány ITS. Přítomnost ITS napříč studovanými liniemi byla zjištěna pouze u zástupců čeledí Dactyloidae, Opluridae a Tropiduridae (viz Obr. 35). Čeleď Dactyloidae vykazovala poměrně variabilní mezidruhovou distribuci ITS signálů, které byly lokalizovány do pericentromerické oblasti různého počtu párů chromosomů, s výjimkou druhů *Anolis cybotes* a *A. allisoni*, u kterých nebyl signál ITS zaznamenán. Neočekávaně vysoká frekvence výskytu ITS byla odhalena v čeledi Opluridae. Například u druhu *Chalarodon madagascariensis* byly ITS zaznamenány uvnitř ramének všech makrochromosomů se sekvencí až pěti proužků na chromosomech druhého páru. Čeleď Opluridae se tak výrazně odlišuje od ostatních čeledí leguánů, u nichž byla zaznamenaná frekvence výskytu ITS výrazně nižší. Výskyt ITS pro čeleď Tropiduridae nebyl dosud znám. V této diplomové práci byla analyzována samice druhu *Uranoscodon superciliosus*, u které byl odhalen signál ITS na pěti párech makrochromosomů.

Ačkoliv u zde zkoumaných phrynosomatidů (*Petrosaurus thalassinus* s  $2n=34$  a *Sceloporus variabilis* s  $2n=34$ ) nebyly ITS detekovány, Meyne et al. (1990) odhalili ITS shodně na posledních třech párech makrochromosomů u druhů *Sceloporus olivaceus* ( $2n=22$  podle Cole 1970) a *Cophosaurus texanus* ( $2n=34$  podle Painter 1921). Ve stejné práci byl také analyzován druh *Phrynosoma cornutum* ( $2n=36$  podle Cavazos 1951), u kterého však nebyly ITS zjištěny. Zároveň však autoři udávají, že u posledních dvou zmíněných druhů je potřeba výsledky ověřit z důvodu nekvalitních chromosomových preparátů použitých v analýze. Pokud by publikované výsledky u druhů *C. texanus* a *P. cornutum* byly považovány za správné, bylo by vzhledem k fylogenetickému postavení vyšetřených druhů v rámci čeledi (např. Pyron et al. 2013) a patrně také rozdílech v počtu chromosomů v diploidní sadě zřejmé, že i v této čeledi je přítomnost ITS poměrně variabilní. Nicméně, stejně jako u již zmíněné čeledi Dactyloidae, i zde je

zkoumaný vzorek druhů příliš malý, aby bylo možné usuzovat na nějaký trend v distribuci ITS v genomu v rámci celé fylogenetické linie.

Výskyt ITS v genomu může být způsoben několika událostmi. Obecně se uvádí, že přítomnost ITS souvisí s fúzí chromosomů ať již s tandemovou (Lee et al. 1993) či Robertsonskou (Slijepcevic 1998). V místě fúze poté zůstávají telomerické sekvence z původních telomer fúzovaných chromosomů, což umožňuje tyto přestavby zpětně odhalit. Tyto mechanismy se zřejmě nepodílely na inkorporaci ITS do genomu u čeledi Opluridae, jelikož karyotyp studovaných druhů této čeledi je konzervativní s  $2n=36$  a  $NF=48$ . Po fúzi chromosomů by tedy musela následovat štěpení, která by opět navrátila původní diploidní počet chromosomů. Nicméně přítomnost akrocentrických mikrochromosomů v karyotypu (oproti ancestrálním metacentrickým; např. Leaché & Sites 2009) a konzervativnost v počtu chromosomů diploidní sady mohou poukazovat na poměrně častý výskyt intrachromosomálních přestaveb v evoluci genomu této linie. Jedním z možných mechanismů začlenění ITS se zdá být inverze, při které dochází k jednomu či více zlomům na chromosomu, otočení tohoto odlomeného fragmentu a jeho opětovnému začlenění zpět do chromosomu. Pokud by na makrochromosomu proběhla inverze úseku obsahujícího telomerickou oblast, dala by vzniknout ITS v místě tohoto zlomu. Vzhledem k poměrně vysokému počtu ITS detekovaných zejména na druhém páru makrochromosomů druhu *Chalarodon madagascariensis* se však zdá být méně pravděpodobný mnohonásobný výskyt inverzí na jednom konkrétním chromosomu. Jiným možným vysvětlením zvýšené frekvence výskytu ITS může být náhodný proces přenosu telomerických sekvencí a jejich následné amplifikaci vedoucí k ITS prostřednictvím satelitních sekvencí (Garrido-Ramos et al. 1998). Zcela nelze také vyloučit možnost artefaktů v získaných signálech pro případ nespecifičnosti telomerické sondy, kdy by tato mohla hybridizovat na podobné repetitivní sekvence, například na AT báze bohatý heterochromatin. Kolokalizace sondy s oblastí heterochromatinu však byla v rámci studovaných druhů výjimečná. Možnost arteficiálních signálů byla taktéž minimalizována přečištěním naamplifikované sondy nadbytkem kompetitorové DNA, která přednostně navázala nespecifické repetitivní sekvence z roztoku sondy. Zjištěné výsledky naznačují zatím spíše vliv náhodného procesu jako je například přesun pomocí transpozonů.



## 5.2. Diferenciace pohlavních chromosomů

Během diferenciace pohlavního chromosomu Y, způsobené absencí rekombinace s pohlavním chromosomem X, dochází v různé míře k jeho heterochromatinizaci (shrnutí např. v Graves 2008). Jedním z cílů této práce proto bylo pokusit se odhalit pohlavní chromosomy s použitím metody C-proužkování na základě vizualizace akumulovaného heterochromatinu během procesu diferenciace.

Metodou C-proužkování se nyní podařilo detekovat téměř kompletní heterochromatinizaci nepárových pohlavních chromosomů celkem u čtyř druhů anolisů (*Anolis cristatellus*, *A. distichus*, *A. gingivinus* a *A. oculatus*). U těchto druhů byly již dříve odhaleny neopohlavní chromosomy  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  použitím konvenčního barvení na základě velikosti a morfologie těchto chromosomů (Gorman & Atkins 1966, 1969; Gorman et al. 1967, 1968).

Bylo zjištěno, že při vzniku neopohlavních chromosomů dochází poměrně rychle k umlčování původně autosomálních genů (Bachtrog et al. 2008), čehož může být dosaženo právě mechanismem heterochromatinizace. Překvapivé je v tomto ohledu množství zjištěného heterochromatinu, které u zástupců ostatních dosud studovaných linií s neopohlavním chromosomem Y nebylo zaznamenáno vždy ve stejné míře. Například u druhu *Tropidurus itambere* (čeleď Tropiduridae) byla pozorována kompletní heterochromatinizace nepárového chromosomu Y (Kasahara et al. 1996), zatímco u dvou dříve zkoumaných druhů z čeledi Polychrotidae byl naopak u druhu *Polychrus marmoratus* identifikovaný nepárový Y chromosom bez známek heterochromatinu a u druhu *P. acutirostris* byl nepárový Y chromosom heterochromatinizován jen částečně (Bertolotto et al. 2001). V genomu dlouhodobě udržovaná vysoká míra akumulace heterochromatinu na nepárovém pohlavním chromosomu Y by tak pro dané druhy mohla naznačovat určitou výhodnost, jinak by pravděpodobně docházelo k výraznějším delecím v takto degenerovaných oblastech.

V karyotypu samce druhu *Sceloporus variabilis* byl již dříve na základě výrazně menší velikosti popsán pohlavní chromosom Y (Cole 1978). Metodou C-proužkování byla nyní přítomnost Y chromosomu potvrzena, jak je patrné na Obr. 33c,d; téměř celý chromosom byl výrazně heterochromatinizován. Nápadně menší mikrochromosom v jednom páru byl nyní odhalen konvenčním barvením i u samců zkoumaných druhů z rodu *Oplurus*. Jelikož

tato heteromorfie nebyla patrná v karyotypu samic, mohlo by se i zde jednat o pohlavní chromosom Y. Nicméně v tomto případě vyšetření samčích genomů metodou C-proužkování neodhalilo žádný rozdíl v akumulaci heterochromatinu v rámci tohoto heteromorfního páru mikrochromosomů. U ostatních zde studovaných druhů nebyla odhalena odlišnost ani v morfologii a velikosti chromosomů ani v míře jejich heterochromatinizace mezi pohlavími.

Rozdíly v genomu mezi pohlavími poměrně často nemusí být zaznamatelné na úrovni chromosomů technikami klasické cytogenetiky, v některých případech je nutné přistoupit k využití molekulárních metod. Kvantitativní PCR (qPCR), jako jedna z těchto metod, byla patrně poprvé použita k testování homologie pohlavních chromosomů v práci Nguyen et al. (2013). Recentně byla publikována celogenomová sekvence druhu *Anolis carolinensis*, současně byl ve stejné práci identifikován pohlavní chromosom X a popsány X-vázané geny (Alföldi et al. 2011). Propojením metodického postupu qPCR a znalosti primerů pro autosomální i na X chromosom vázaných genů, jsme byli schopni testovat homologii pohlavních chromosomů a současně tím potvrdit samotnou přítomnost pohlavních chromosomů (Rovatsos, Altmanová, Pokorná a Kratochvíl, dosud nepublikovaný rukopis). Na základě známých primerů pro tři geny z šestého páru autosomů a pěti na X chromosom vázaných genů jsme pomocí qPCR stanovili poměr dávky těchto genů mezi pohlavími. Testováno bylo celkem 17 druhů anolisů spolu s referenčním druhem *Anolis carolinensis* a tři druhy z čeledi Phrynosomatidae jako outgroup (*Sceloporus variabilis*, *Sceloporus malachiticus* a *Petrosaurus thalassinus*). Vyšetřovány byly druhy s již identifikovanými heteromorfními pohlavními chromosomy, ale především druhy s dosud nedetekovanými pohlavními chromosomy, často homomorfními. Zjištěná genová dávka byla u všech pěti X-vázaných genů u samců poloviční než u samic a pro autosomální geny byla tato dávka shodná pro obě pohlaví. Výsledky tak jasně prokázaly homologii pohlavních chromosomů X nejen u všech zkoumaných druhů anolisů, ale také i u druhů z čeledi Phrynosomatidae zahrnutých v analýze jako outgroup. Byla tak potvrzena přítomnost pohlavních chromosomů, které i přes svůj homomorfní charakter jsou sekvenčně natolik odlišné, že bylo možné metodou qPCR odhalit rozdílnou dávku X-vázaných genů mezi pohlavími.

Z hlediska existence homologie pohlavních chromosomů u anolisů (Dactyloidae) a zkoumaných zástupců čeledi Phrynosomatidae je otázkou, zda tuto homologii sdílí

i ostatní linie leguánů. Fylogeneze celé skupiny je dosud neustálená (viz Obr. 2), bude tedy proto nutné otestovat zástupce dalších leguáních linií.

Dosud zjištěná variabilita v počtu a morfologii chromosomů u druhově bohatých linií, jako jsou zejména rody *Anolis*, *Liolaemus* a *Sceloporus*, naznačuje existenci přímé souvislosti speciace s chromosomálními přestavbami (White 1978). K těmto přestavbám může docházet jak u linií podléhajících adaptivní radiaci (např. rod *Anolis*, Losos 2009), tak i v případě speciace vycházející z malé geograficky izolované populace (např. chromosomální rasy druhu *Liolaemus monticola*; Lamborot 1991, Lamborot & Alvarez-Sarret 1993). V rámci celé skupiny Pleurodonta je však zřejmě původnější a častější konzervativní typ karyotypu ( $2n=36$ , s 12 makro- a 24 mikrochromosomy; viz Přílohy – Kladogram 1), který skupina sdílí i s jinými liniemi šupinatých plazů (Olmo & Signorino 2005). Konzervativní karyotyp tak patrně představuje určitou univerzální a velmi stabilní kompartmentaci genomu (Bickham & Baker 1979), v dané fylogenetické linii však v tomto ohledu nebrání existenci značné variability v konkrétním uspořádání uvnitř vlastních chromosomů. Příkladem výskytu takového konzervativního karyotypu je čeleď Opluridae endemická pro Madagaskar. Není však zatím zcela jasné, zda v případě nalezeného velkého množství ITS hrála v evoluční minulosti čeledi větší roli ostrovní izolace, která umožnila akumulaci inkorporací ITS v jinak konzervativním karyotypu (oproti jiným liniím leguánů), nebo se zde jedná spíše o apomorfii předka celé linie.

## 6. Závěr

Během řešení této diplomové práce byl nově stanoven základní popis karyotypu u osmi druhů leguánů, které nebyly doposud cytogeneticky zkoumány. Jmenovitě se jednalo o druhy: *Basiliscus plumifrons* a *Laemanctus longipes* (Corytophanidae); *Crotaphytus insularis* (Crotaphytidae); *Cyclura nubila* (Iguanidae s.s.); *Chalarodon madagascariensis*, *Oplurus fierinensis* a *Oplurus grandidieri* (Opluridae); *Petrosaurus thalassinus* (Phrynosomatidae). Již publikovaný karyotyp se podařilo potvrdit u dalších 13 druhů. Získané metafázní chromosomy všech zkoumaných druhů (pokrývajících osm čeledí leguánů) byly, s výjimkou druhu *Uranoscodon superciliosus*, vůbec poprvé prověřeny metodou C-proužkování. Na 18 druhů zastupujících celkem sedm čeledí byla nově aplikována metoda FISH se specifickou telomerickou sondou. Použitím zmíněných metod byla odhalena variabilita v distribuci heterochromatinu napříč celou skupinou a ITS byly detekovány pouze u zástupců tří čeledí (Dactyloidae, Opluridae a Tropiduridae). Konzervativní vzor heterochromatinizace a vysoká míra ITS v genomu byla shodně nalezena u všech zástupců čeledi Opluridae a patrně se jedná o apomorfii této linie. Použité metody neumožnily identifikovat strukturní rozdíly v karyotypu mezi pohlavími u některých druhů, ačkoliv u nich byla přítomnost pohlavních chromosomů diferenciovaných na sekvenční úrovni potvrzena pomocí qPCR. Heterochromatinizace nepárového pohlavního chromosomu Y byla odhalena u druhů s neopohlavními chromosomy  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  a u druhu *Sceloporus variabilis* s původním systémem XY. Tyto nepárové pohlavní chromosomy byly již dříve popsány na základě jejich heteromorfie.

Výsledky diplomové práce umožnily první náhled na evoluci karyotypu napříč skupinou Pleurodonta pomocí metody C-proužkování a molekulárně cytogenetické metody FISH. Zjištěná variabilita v heterochromatinizaci a výskytu ITS v genomech vybízí v navazujících studiích k podrobnějšímu prozkoumání možných evolučních trendů větším druhovým zastoupením jednotlivých fylogenetických linií.

Původ vzniku vysokého výskytu ITS zjištěného v čeledi Opluridae by bylo vhodné prověřit osekvenováním izolovaných ITS úseků (např. pomocí laserové mikrodisekce) nebo aplikací FISH se sondou detekující transpozony. K poznání evoluce karyotypu celé skupiny by mohlo pomoci použití také dalších cytogenetických markerů, jako je lokalizace ribozomálních sekvencí, případně znalost akumulace mikrosatelitů v genomu. V budoucnu

je plánován také test homologie jednotlivých chromosomů pomocí „chromosome painting“ se sondami z rozsortovaných chromosomů druhu *Anolis carolinensis*, což může prozradit více o případných interchromosomálních přestavbách.

Homologie pohlavních chromosomů pomocí qPCR bude ověřena i u dalších linií leguánů. U druhů s neopohlavními chromosomy by bylo vhodné otestovat případnou tendenci k fúzi původního pohlavního chromosomu Y vždy se stejným párem autosomů, například opět pomocí „chromosome painting“.

## 7. Literatura

- Aiassa D, Martori R, Gorla N. 2005.** Citogenética de los lagartos del género *Liolaemus* (Iguania: Liolaemidae) de América del Sur. *Cuadernos de Herpetología* **18**: 23–36.
- Altmanová M. 2011.** *Evoluce pohlavních chromozomů a karyotypů u leguánů (Squamata: Iguanidae sensu lato)*. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha.
- Alföldi J, Di Palma F, Grabherr M, Williams C, Kong L, Mauceli E, Russell P, Lowe CB, Glor RE, Jaffe JD, Ray DA, Boissinot S, Shedlock AM, Botka C, Castoe TA, Colbourne JK, Fujita MK, Moreno RG, Hallers BF, Haussler D, Heger A, Heiman D, Janes DE, Johnson J, de Jong PJ, Koriabine MY, Lara M, Novick PA, Organ CL, Peach SE, Poe S, Pollock DD, de Queiroz K, Sanger T, Searle S, Smith JD, Smith Z, Swofford R, Turner-Maier J, Wade J, Young S, Zadissa A, Edwards SV, Glenn TC, Schneider CJ, Losos JB, Lander ES, Breen M, Ponting CP, Lindblad-Toh K. 2011.** The genome of the green anole lizard and a comparative analysis with birds and mammals. *Nature* **477**: 587–591.
- Bachtrog D, Hom E, Wong KM, Maside X, de Jong P. 2008.** Genomic degradation of a young Y chromosome in *Drosophila miranda*. *Genome Biology* **9**: R30.
- Bertolotto CEV. 2006.** *Enyalius (Leiosauridae, Squamata): o que os dados moleculares e cromossômicos revelam sobre esse gênero de lagartos endêmico do Brasil*. Dizertační práce. Universidade de São Paulo. São Paulo.
- Bertolotto CEV, Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Yonenaga-Yassuda Y. 2002.** Comparative cytogenetics and supernumerary chromosomes in the Brazilian lizard genus *Enyalius* (Squamata, Polychrotidae). *Hereditas* **136**: 51–57.
- Bertolotto CEV, Rodrigues MT, Skuk G, Yonenaga-Yassuda Y. 1996.** Comparative cytogenetic analysis with differential staining in three species of *Liolaemus* (Squamata, Tropiduridae). *Hereditas* **125**: 257–264.
- Bertolotto CEV, Rodrigues MT, Yonenaga-Yassuda Y. 2001.** Banding patterns, multiple sex chromosome system and localization of telomeric (TTAGGG)<sub>n</sub>

- sequences by FISH on two species of *Polychrus* (Squamata, Polychrotidae). *Caryologia* **54**: 217–226.
- Bickham JW, Baker RJ. 1979.** Canalization model of chromosomal evolution. *Bulletin of Carnegie Museum of Natural History* **13**: 70–84.
- Blake JA. 1986.** Complex chromosomal variation in natural populations of the Jamaican lizard *Anolis grahami*. *Genetica* **69**: 3–17.
- Bull J. 1980.** Sex determination in reptiles. *Quarterly Review of Biology* **55**: 3–21.
- Burt DW. 2002.** Origin and evolution of avian microchromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* **96**: 97–112.
- Castiglia R, Bezerra AMR, Flores-Villela O, Annesi F, Muñoz A, Gornung E. 2013.** Comparative cytogenetics of two species of ground skinks: *Scincella assata* and *S. cherriei* (Squamata: Scincidae: Lygosominae) from Chiapas, Mexico. *Acta Herpetologica* **8**: 69–73.
- Cavazos L. 1951.** Spermatogenesis of the horned lizard *Phrynosoma cornutum*. *American Naturalist* **85**: 373–379.
- Cole CJ. 1970.** Karyotypes and evolution of the *spinus* group of lizards in the genus *Sceloporus*. *American Museum Novitates* **2431**: 1–47.
- Cole CJ. 1978.** Karyotypes and systematics of the lizards in the *variabilis*, *jalapae*, and *scalaris* species groups of the genus *Sceloporus*. *American Museum Novitates* **2653**: 1–13.
- Cole CJ, Lowe CH, Wright JW. 1967.** Sex chromosomes in lizards. *Science* **155**: 1028–1029.
- Dobigny G, Ozouf-Costaz C, Waters PD, Bonillo C, Coutanceau JP, Volobouev V. 2004.** LINE-1 amplification accompanies explosive genome repatterning in rodents. *Chromosome Research* **12**: 787–793.
- Ellegren H. 2002.** Dosage compensation: do birds do it as well? *Trends in Genetics* **18**: 25–28.

- Ellegren H. 2010.** Evolutionary stasis: the stable chromosomes of birds. *Trends in Ecology & Evolution* **25**: 283–291.
- Ezaz T, Sarre SD, O’Meally D, Graves JAM, Georges A. 2009.** Sex chromosome evolution in lizards: independent origins and rapid transitions. *Cytogenetic and Genome Research* **127**: 249–260.
- Ezaz T, Stiglec R, Veyrunes F, Graves JAM. 2006.** Relationships between vertebrate ZW and XY sex chromosome systems. *Current Biology* **16**: 736–743.
- Ferguson-Smith M a, Trifonov V. 2007.** Mammalian karyotype evolution. *Nature Reviews. Genetics* **8**: 950–962.
- Garrido-Ramos MA, de la Herrán R, Ruiz Rejón C, Ruiz Rejón M. 1998.** A satellite DNA of the Sparidae family (Pisces, Perciformes) associated with telomeric sequences. *Cytogenetics and Cell Genetics* **83**: 3–9.
- Gamble T. 2010.** A review of sex determining mechanisms in geckos (Gekkota: Squamata). *Sexual Development* **4**: 88–103.
- Gorman GC. 1965.** Interspecific karyotypic variation as a systematic character in the genus *Anolis* (Sauria: Iguanidae). *Nature* **208**: 95–97.
- Gorman GC. 1973.** The Chromosomes of the Reptilia, a cytotaxonomic interpretation. In: Chiarelli AB, Capanna E (eds) *Cytotaxonomy and vertebrate evolution*. Academic Press, Inc., New York, pp 349–424.
- Gorman GC, Atkins L. 1966.** Chromosomal heteromorphism in some male lizards of the genus *Anolis*. *American Naturalist* **100**: 579–583.
- Gorman GC, Atkins L. 1968.** New karyotypic data for 16 species of *Anolis* (Sauria: Iguanidae) from Cuba, Jamaica, and the Cayman Islands. *Herpetologica* **24**: 13–21.
- Gorman GC, Atkins L. 1969.** The zoogeography of Lesser Antillean *Anolis* lizards: An analysis based upon chromosomes and lactic dehydrogenases. *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology* **138**: 53–80.



- Gorman GC, Baptista L, Bury RB. 1969.** Chromosomes and sceloporine relationships, with special reference to the horned lizards. *Mammalian Chromosomes Newsletter* **10**: 6-11.
- Gorman GC, Atkins L, Holzinger T. 1967.** New karyotypic data on 15 genera of lizards in the family Iguanidae, with a discussion of taxonomic and cytological implications. *Cytogenetics* **6**: 286–299.
- Graves JAM. 2008.** Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes. *Annual Review of Genetics* **42**: 565–586.
- Hall WP. 1973.** *Comparative population cytogenetics, speciation, and evolution of the iguanid lizard genus Sceloporus*. Dizertační práce. Harvard University Cambridge, Massachusetts.
- Herpin A, Scharfl M. 2009.** Molecular mechanisms of sex determination and evolution of the Y-chromosome: insights from the medaka fish (*Oryzias latipes*). *Molecular and Cellular Endocrinology* **306**: 51–58.
- Hernando A. 2003.** Karyotype, constitutive heterochromatin and nucleolus organizer regions in two species of *Liolaemus* (Squamata, Tropicuridae). *Caryologia* **56**: 269–273.
- Howell WM, Black DA. 1980.** Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* **36**: 1014–1015.
- Charlesworth B. 1991.** The evolution of sex chromosomes. *Science* **251**:1030–1033.
- Charlesworth B. 1996.** The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Current Biology* **6**: 149–162.
- Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G. 2005.** Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity* **95**: 118–128.
- Charlesworth D, Mank JE. 2010.** The birds and the bees and the flowers and the trees: lessons from genetic mapping of sex determination in plants and animals. *Genetics* **186**: 9–31.

- Itoh Y, Melamed E, Yang X, Kampf K, Wang S, Yehya N, Van Nas A, Replogle K, Band MR, Clayton DF, Schadt EE, Lusic AJ, Arnold AP. 2007.** Dosage compensation is less effective in birds than in mammals. *Journal of Biology* **6**: 2.
- Kasahara S, Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Yonenaga-Yassuda Y. 1996.** Comparative cytogenetic studies of eleven species of the *Tropidurus torquatus* group (Sauria, Tropiduridae) with banding patterns. *Hereditas* **46**: 37–46.
- Kasahara S, Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT. 1987a.** Geographical karyotypic variations and chromosome banding patterns in *Tropidurus hispidus* (Sauria, Iguanidae) from Brazil. *Caryologia* **40**: 43–57.
- Kasahara S, Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT. 1987b.** Karyotype and evolution of the *Tropidurus nanuzae* species group (Sauria, Iguanidae). *Revista Brasileira de Genetica* **10**: 185–197.
- Kasahara S, Yonenaga-Yassuda Y, Schincariol RA, L'Abbate M. 1983.** Chromosome mechanisms of sex determination, G- and C-band patterns and nucleolus organizer regions in *Tropidurus hispidus* (Sauria, Iguanidae). *Genetica* **60**: 151–156.
- Kasai F, O'Brien PCM, Martin S, Ferguson-Smith MA. 2012.** Extensive homology of chicken macrochromosomes in the karyotypes of *Trachemys scripta elegans* and *Crocodylus niloticus* revealed by chromosome painting despite long divergence times. *Cytogenetic and Genome Research* **136**: 303–307.
- King M. 1993.** *Species Evolution. The Role of Chromosome Change*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Kirkpatrick M. 2010.** How and why chromosome inversions evolve. *PLoS Biology* **8**: 1000501.
- Kitano J, Peichel C. 2012.** Turnover of sex chromosomes and speciation in fishes. *Environmental Biology of Fishes* **94**: 549–558.

- Lamborot M. 1991.** Karyotypic variation among populations of *Liolaemus monticola* (Topiduridae) separated by riverine barriers in the Andean range. *Copeia* **4**: 1044–1059.
- Lamborot M, Alvarez-Sarret E. 1993.** Karyotypic variation within and between populations of *Liolaemus monticola* (Tropiduridae) separated by the Maipo River in the coastal range of central Chile. *Herpetologica* **49**: 435–449.
- Lamborot M, Navarro-Suarez M. 1984.** Karyotypes and sex determination in *Phymaturus palluma* Molina (Iguanidae). *Herpetologica* **40**: 258–264.
- Leaché AD, Sites JW. 2009.** Chromosome evolution and diversification in North American spiny lizards (genus *Sceloporus*). *Cytogenetic and Genome Research* **127**: 166–181.
- Lee C, Sasi R, Lin CC. 1993.** Interstitial localization of telomeric DNA sequences in the Indian muntjac chromosomes: further evidence for tandem chromosome fusions in the karyotype evolution of the Asian muntjacs. *Cytogenetics and Cell Genetics* **63**: 156–159.
- Levan A, Fredga L, Sandberg AA. 1964.** Nomenclature of centromeric position on chromosomes. *Hereditas* **52**: 201–220.
- Losos JB. 1990.** Ecomorphology, performance capability, and scaling of West Indian *Anolis* lizards: an evolutionary analysis. *Ecological Monographs* **60**: 369–388.
- Losos JB. 2009.** *Lizards in an evolutionary tree: Ecology and adaptive radiation of anoles*. University of California Press, Berkeley.
- Macey JR, Larson A, Ananjeva NB, Papenfuss TJ. 1997.** Evolutionary shifts in three major structural features of the mitochondrial genome among iguanian lizards. *Journal of Molecular Evolution* **44**: 660–674.
- Mank JE. 2009.** The W, X, Y and Z of sex-chromosome dosage compensation. *Trends in Genetics* **25**: 226–233.
- Matsubara K, Tarui H, Toriba M, Yamada K, Nishida-Umehara C, Agata K, Matsuda Y. 2006.** Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes,

- birds, and mammals and step-wise differentiation of snake sex chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 18190–18195.
- Matsuda Y, Nishida-Umehara C, Tarui H, Kuroiwa A, Yamada K, Isobe T, Ando J, Fujiwara A, Hirao Y, Nishimura O, Ishijima J, Hayashi A, Saito T, Murakami T, Murakami Y, Kuratani S, Agata K. 2005.** Highly conserved linkage homology between birds and turtles: bird and turtle chromosomes are precise counterparts of each other. *Chromosome Research* **13**: 601–615.
- Matthey R. 1931.** Chromosomes de reptiles. Sauriens, Ophidiens, Cheloniens. L'évolution de formule chromosomiale chez les Sauriens. *Revue Suisse de Zoologie* **38**: 117–186.
- Matthey R. 1945.** L'évolution de la formule chromosomiale chez les vertébrés. *Experientia* **1**: 50–56, 78–86.
- Meyne J, Baker RJ, Hobart HH, Hsu TC, Ryder OA, Ward OG, Wiley JE, Wurster-Hill DH, Yates TL, Moyzis RK. 1990.** Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* **99**: 3–10.
- Nguyen P, Sykorová M, Síchová J, Kuta V, Dalíková M, Capková Frydrychová R, Neven LG, Sahara K, Marec F. 2013.** Neo-sex chromosomes and adaptive potential in tortricid pests. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 6931–6936.
- Nicholson KE, Crother BI, Guyer C, Savage JM. 2012.** It is time for a new classification of anoles (Squamata: Dactyloidae). *Zootaxa* **3477**: 1–108.
- Núñez H, Navarro J, Garín C, Pincheira-Donoso D, Merrigio V. 2003.** *Phrynosaura manueli* y *Phrynosaura torresi*, nuevas especies de lagartijas para el norte de Chile (Squamata: Sauria). *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural, Chile* **52**: 67–88.

- Okajima Y, Kumazawa Y. 2009.** Mitogenomic perspectives into iguanid phylogeny and biogeography: Gondwanan vicariance for the origin of Madagascarian oplurines. *Gene* **441**: 28–35.
- Ohno S. 1967.** *Sex chromosomes and sex-linked genes*. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. New York, Berlin.
- Olmo E. 2005.** Rate of chromosome changes and speciation in reptiles. *Genetica* **125**: 185–203.
- Olmo E. 2008.** Trends in the evolution of reptilian chromosomes. *Integrative and Comparative Biology* **48**: 486–493.
- Olmo E, Signorino G. 2005.** CHROMOREP: A reptiles chromosome database. <http://chromorep.univpm.it/> [accessed 01 August 2013]
- Olmo E, Odierna G, Cobror O. 1986.** C-band variability and phylogeny of Lacertidae. *Genetica* **71**: 63–74.
- Painter TS. 1921.** Studies in reptilian spermatogenesis. I. The spermatogenesis of lizards. *Journal of Experimental Zoology* **34**: 281–327.
- Pellegrino KCM, Bertolotto CEV, Paulo S, Rodrigues MT, Yonenaga-Yassuda Y. 1999.** Banding patterns, heteromorphic sex chromosomes and Ag-stained NORs after pachytene stage in the meiosis of the Brazilian lizard *Urostrophus vauieri* (Squamata, Polychrotidae). *Caryologia* **52**: 21–26.
- Pellegrino K, Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT. 1994.** Cytogenetic studies in six species of Tropicuridae (Sauria). *Revista Brasileira de Genetica* **17**: 401–408.
- Pokorná M. 2007.** *Karyotypová evoluce u ještěřů čeledi Eublepharidae, skupiny s různými způsoby determinace pohlaví*. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha.
- Pokorná M, Giovannotti M, Kratochvíl L, Caputo V, Olmo E, Ferguson-Smith MA, Rens W. 2012.** Conservation of chromosomes syntenic with avian autosomes in squamate reptiles revealed by comparative chromosome painting. *Chromosoma* **121**: 409–418.

- Pokorná M, Giovannotti M, Kratochvíl L, Kasai F, Trifonov VA, O'Brien PCM, Caputo V, Olmo E, Ferguson-Smith MA, Rens W. 2011.** Strong conservation of the bird Z chromosome in reptilian genomes is revealed by comparative painting despite 275 million years divergence. *Chromosoma* **120**: 455–468.
- Pokorná M, Kratochvíl L. 2009.** Phylogeny of sex-determining mechanisms in squamate reptiles: are sex chromosomes an evolutionary trap? *Zoological Journal of the Linnean Society* **156**: 168–183.
- Pokorná M, Rábová M, Ráb P, Ferguson-Smith MA, Rens W, Kratochvíl L. 2010.** Differentiation of sex chromosomes and karyotypic evolution in the eye-lid geckos (Squamata: Gekkota: Eublepharidae), a group with different modes of sex determination. *Chromosome Research* **18**: 809–820.
- Porter CA, Crombie R, Baker R. 1989.** Karyotypes of five species of Cuban lizards. *Occasional Papers The Museum Texas Tech University* **130**: 1–7.
- Porter CA, Haiduk M, de Queiroz K. 1994.** Evolution and phylogenetic significance of ribosomal gene location in chromosomes of squamate reptiles. *Copeia* **1994**: 302–313.
- Porter CA, Hamilton MJ, Sites JW, Baker RJ. 1991.** Location of ribosomal DNA in chromosomes of squamate reptiles: systematic and evolutionary implications. *Herpetologica* **47**: 271–280.
- Pough FH, Andrews RM, Cadle JE, Crump ML, Savitzky AH, Wells KD. 2004.** *Herpetology*. Third edition. Pearson Education. London.
- Pyron RA, Burbrink FT, Wiens JJ. 2013.** A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evolutionary Biology* **13**: 93.
- Qumsiyeh MB. 1994.** Evolution of number and morphology of mammalian chromosomes. *The Journal of Heredity* **85**(6): 455–465.
- Shedlock AM, Edwards SV. 2009.** Amniota. In: Hedges SB, Kumar S (eds) *The timetree of life*. Oxford University Press, New York, pp 375–379.

- Schulte JA, Moreno-Roark F. 2010.** Live birth among Iguanian lizards predates Pliocene-Pleistocene glaciations. *Biology Letters* **6**: 216–218.
- Sites, JW. 1983.** Chromosome evolution in the iguanid lizard *Sceloporus grammicus*. I. Chromosome polymorphisms. *Evolution* **37**: 38–53.
- Sites JW, Moritz C. 1987.** Chromosomal evolution and speciation revisited. *Systematic Zoology* **36**: 153–174.
- De Smet WHO. 1981.** Description of the orcein stained karyotypes of 36 lizard species (Lacertilia, Reptilia) belonging to the families Teiidae, Scincidae, Lacertidae, Cordylidae and Varanidae (Autarchoglossa). *Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia* **76**: 73–118.
- Slijepcevic P. 1998.** Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma* **107**: 136–140.
- Tegelström H, Ebenhard T, Rytman H. 1983.** Rate of karyotype evolution and speciation in birds. *Hereditas* **98**: 235–239.
- Therman-Suomalainen E. 1949.** Investigations on secondary constrictions in *Polygonatum*. *Hereditas* **35**: 86–108.
- Townsend TM, Mulcahy DG, Noonan BP, Sites JW, Kuczynski C a, Wiens JJ, Reeder TW. 2011.** Phylogeny of iguanian lizards inferred from 29 nuclear loci, and a comparison of concatenated and species-tree approaches for an ancient, rapid radiation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **61**: 363–380.
- Uetz P, Hošek J (eds.)** The Reptile Database. <http://www.reptile-database.org> [accessed 01 August 2013]
- Webster TP, Hall WP, Williams EE. 1972.** Fission in the evolution of a lizard karyotype. *Science* **177**: 611–613.
- White MJD. 1978.** *Modes of speciation*. W. H. Freeman and Company, San Francisco.

- Wiens J, Hutter C, Mulcahy D. 2012.** Resolving the phylogeny of lizards and snakes (Squamata) with extensive sampling of genes and species. *Biology letters* **8**: 1043–1046.
- Yonenaga-Yassuda Y, Kasahara S, Chu T, Rodrigues MT. 1988.** High-resolution RBG-banding pattern in the genus *Tropidurus* (Sauria, Iguanidae). *Cytogenetics and Cell Genetics* **48**: 68–71.
- Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT, Cristina K, Pellegrino M. 2005.** Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The  $X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y$  sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilophthalmus* and *Tretioscincus*. *Genetics and Molecular Biology* **28**: 700–709.



## 8. Přílohy

**Kladogram 1:** Analýza ancestrálního stavu diploidního počtu chromosomů v karyotypu skupiny Pleurodonta

**Kladogram 2:** Analýza distribuce typů pohlavních chromosomů ve skupině Pleurodonta

**Dataset:** Cytogenetické údaje o leguánech s citacemi zdrojových studií (přiloženo pouze na CD)