

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra zoologie**



**Karyotypová evoluce u ještěřů čeledi Eublepharidae,  
skupiny s různými způsoby determinace pohlaví**

Diplomová práce

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra zoologie

Karyotypová evoluce u ještěřů čeledi Eublepharidae,  
skupiny s různými způsoby determinace pohlaví

Diplomová práce

Autor práce: Martina Pokorná

Vedoucí práce: Mgr. Lukáš Kratochvíl, Ph.D.

Prohlášení autora

Prohlašuji, že diplomovou práci na téma „Karyotypová evoluce u ještěřů čeledi Eublepharidae, skupiny s různými způsoby determinace pohlaví“ jsem vypracovala samostatně, jen s použitím citované literatury a pod vedením příslušného vedoucího diplomové práce.

V Praze dne

14. 12. 2012 

## Poděkování

Na tomto místě bych velice ráda poděkovala všem, kteří mi v průběhu řešení a psaní této práce pomáhali. Zejména svému školiteli Mgr. Lukáši Kratochvílovi, Ph.D., za nápad, který nás přivedl ke studiu chromosomů u gekončků, za jeho všestrannou pomoc v průběhu řešení této práce a skvělý školitelský a přátelský přístup. Doc. Ing. Pertu Rábovi, DrSc. vděčím především za to, že mi umožnil během řešení práce využívat zázemí Laboratoře genetiky ryb ÚŽFG AV ČR v Liběchově, neméně však za jeho veškerou odbornou a metodickou pomoc při vzniku a psaní této práce. Ing. Marii Rábové, CSc. bych chtěla poděkovat zejména za její trpělivou pomoc s obrazovým a softwarovým zpracováním výsledků. Bc. Šárce Pelikánové vděčím zejména za její obětavou technickou pomoc v laboratoři. RNDr. Jiřímu Královi, CSc. děkuji za četné konzultace a celkový zájem, se kterým sledoval postupný vznik předkládané práce. Mgr. Ivě Fukové bych chtěla poděkovat za zaškolení do metody komparativní genomové hybridizace. Mgr. Zuzaně Starostové děkuji především za poskytnutí jejich výsledků fylogenetických vztahů uvnitř studované čeledi. Všem členům „gecko teamu“ děkuji za pomoc, podporu a přátelskou atmosféru, stejně tak děkuji i všem členům Laboratoře genetiky ryb. Na závěr bych velice ráda poděkovala rodičům za jejich podporu, kterou mi věnovali během celého studia a Michalu Vinklerovi za připomínky a poznámky ke vznikající práci.

Práce vznikala za finanční podpory grantu GA UK 130/2006/B-BIO/PrF.

## Abstrakt

Karyotypové změny představují v řadě případů jedny z nejmarkantnějších průvodních jevů speciálních událostí, jejichž význam pro další evoluční procesy není doposud zcela prostudovaný, zejména na molekulární úrovni. V rámci některých skupin se setkáváme s variabilitou v celkovém počtu chromosomů v karyotypu, ale také s variabilitou na úrovni samotné přítomnosti či nepřítomnosti specializovaných pohlavních chromosomů. Právě tato variabilita má klíčovou úlohu pro naše pochopení obecných principů týkajících se evoluce systémů určení pohlavní. Čeleď Eublepharidae představuje z tohoto pohledu velmi zajímavou skupinu. Vzhledem k tomu, že tato skupina zahrnuje druhy, u nichž dochází k určení pohlaví prostřednictvím teploty i druhy, u nichž o pohlaví rozhodují genetické faktory, může přinést studium karyotypových přestaveb a zejména pak studium struktury a homologie pohlavních chromosomů cenné poznatky o evolučních procesech vedoucích k diferenciaci karyotypu a pohlavních chromosomů.

Během řešení tématu diplomové práce byl proveden základní popis karyotypů a dalších chromosomových charakteristik pro vybrané druhy čeledi Eublepharidae dostupnými cytogenetickými metodami. Do analýzy byly zahrnuty následující druhy: *Coleonyx brevis*, *C. elegans*, *C. mitratus*, *C. variegatus*, *Eublepharis angramainyu*, *E. macularius*, *Goniurosaurus araneus*, *G. lichtenfelderi*, *G. luii*, *G. splendens*, *Hemitheconyx caudicinctus*, *Holodactylus africanus*. Bylo zjištěno, že v rámci skupiny patrně docházelo k diferenciaci karyotypu prostřednictvím centrických fúzí Robertsonovského typu a pravděpodobně i tandemových fúzí a to v rámci rodu *Coleonyx* a *Goniurosaurus*. S použitím konvenčních cytogenetických metod nebyly u většiny druhů nalezeny žádné pohlavní rozdíly v karyotypu. Na základě těchto zjištění je možné konstatovat, že pohlavní chromosomy jsou u druhů s genetickým určením pohlaví obvykle homomorfní, což nasvědčuje tomu, že se v evoluci diferencovaly relativně nedávno. U samců druhu *Coleonyx elegans* byl však v karyotypu ( $2n = 31$ ) objeven metacentrický chromosom Y, vzniklý s největší pravděpodobností centrickou fúzí původního Y s autosomem. Při této fúzi došlo ke ztrátě telomerických sekvencí, jelikož hybridizace s telomerickou sondou neodhalila v tomto chromosomu žádné intersticiální signály. Počet chromosomových ramen byl  $NF = 32$ , tedy stejný jako diploidní počet chromosomů v karyotypu samice. Pomocí komparativní genomové hybridizace byl identifikován původní i nově vzniklý X chromosom v karyotypu samce, které spolu s metacentrickým chromosomem Y tvoří v průběhu redukčního dělení trivalent.

## Abstract

Chromosome rearrangements represent one of the most striking phenomena related to speciation. Nevertheless, their importance for other evolutionary processes is not well understood yet. Within some groups we observe even variability in the presence or absence of differentiated sex chromosomes. Such variability has a crucial role for our comprehension of general principles regarding the evolution of sex determining mechanisms. From this point, the family Eublepharidae is a very interesting model group as it includes species with both genetic sex determination and temperature-dependent sex determination. The investigation of the karyotype composition as well as of the structure and homology of sex chromosomes within such taxa could bring valuable information on the general evolutionary processes leading to the differentiation of karyotypes and sex chromosomes.

In this work the description of karyotypes in several selected species of the family Eublepharidae was done by available cytogenetic techniques. I have examined following species: *Coleonyx brevis*, *C. elegans*, *C. mitratus*, *C. variegatus*, *Eublepharis angramainyu*, *E. macularius*, *Goniurosaurus araneus*, *G. lichtenfelderi*, *G. luii*, *G. splendens*, *Hemitheconyx caudicinctus*, *Holodactylus africanus*. It was found that the karyotypic differentiation among species evolved by fixation of centric and probably also tandem fusions. Karyotypes of all but one species with genetic sex determination exhibit no presence of heteromorphic sex chromosomes. This suggests that sex chromosomes in these species are homomorphic and have emerged from autosomes relatively recently. In male karyotype of the species *Coleonyx elegans* ( $2n = 31$ ), the large metacentric chromosome Y was found which probably arose by centric fusion of the former Y sex chromosome with an autosome. The number of chromosome arms is  $NF = 32$  the same as the diploid number of chromosomes in females. The original and derived X chromosomes were identified in the male karyotype by the application of highly sensitive genome comparative methods. I demonstrated that during meiosis, Y chromosome forms a trivalent with both X chromosomes.

# Obsah

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Úvod</b>   | <b>7</b>  |
| 1. Karyotyp a jeho diferenciacie   | 7         |
| 2. Pohlavně determinační mechanismy obratlovců<br>a jejich evoluce   | 11        |
| 2.1. Pohlavně determinační mechanismy  | 11        |
| 2.2. Základní systémy určení pohlaví faktory prostředí   | 13        |
| 2.3. Základní systémy geneticky určeného pohlaví   | 13        |
| 2.4. Evoluce pohlavně determinačních mechanismů  | 14        |
| 3. Obecné evoluční mechanismy vedoucí ke vzniku<br>a diferenciaci pohlavních chromosomů                            | 16        |
| 3.1. Vznik pohlavních chromosomů   | 16        |
| 3.2. Diferenciacie pohlavních chromosomů   | 17        |
| 3.3. Srovnání typu pohlavních chromosomů<br>a pohlavně specifických genů mezi jednotlivými<br>skupinami obratlovců | 19        |
| 3.4. Neopohlavní systémy   | 23        |
| 3.5. Kompenzace genové dávky   | 24        |
| 4. Cytogenetika a cytotaxonomie plazů  | 26        |
| 5. Stručný přehled o čeledi Eublepharidae  | 28        |
| <b>2. Cíl práce</b>  | <b>34</b> |
| <b>3. Materiál a metodika</b>  | <b>35</b> |
| 1. Materiál  | 35        |
| 2. Příprava chromosomových preparátů   | 36        |
| 3. Barvení chromosomů  | 40        |
| 4. Hybridizační techniky   | 42        |
| 5. Zpracování obrazového materiálu   | 47        |
| 6. Klasifikace chromosomů  | 48        |
| <b>4. Výsledky</b>   | <b>49</b> |
| 1. Použité cytogenetické metody  | 49        |
| 2. Popis karyotypu pro jednotlivé druhy čeledi Eublepharidae   | 52        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.1. <i>Coleonyx brevis</i>  | 52        |
| 2.2. <i>Coleonyx elegans</i>   | 54        |
| 2.3. <i>Coleonyx mitratus</i>  | 59        |
| 2.4. <i>Coleonyx variegatus</i>  | 61        |
| 2.5. <i>Hemitheconyx caudicinctus</i>  | 63        |
| 2.6. <i>Holodactylus africanus</i>   | 65        |
| 2.7. <i>Eublepharis angramainyu</i>  | 67        |
| 2.8. <i>Eublepharis macularius</i>   | 69        |
| 2.9. <i>Goniurosaurus araneus</i>  | 71        |
| 2.10. <i>Goniurosaurus lichtenfelderi</i>  | 73        |
| 2.11. <i>Goniurosaurus luei</i>  | 75        |
| 2.12. <i>Goniurosaurus splendens</i>   | 77        |
| <b>5. Diskuse</b>  | <b>79</b> |
| 1. Zhodnocení použitých cytogenetických metod  | 79        |
| 2. Karyotypová evoluce čeledi Eublepharidae  | 81        |
| 3. Pohlavní chromosomy, jejich evoluce a jejich souvislost s pohlavně determinujícími mechanismy | 86        |
| <b>6. Závěr</b>  | <b>92</b> |
| <b>7. Literatura</b>   | <b>93</b> |

# 1. Úvod

## 1. Karyotyp a jeho diferenciacie

Přestože první poznatky o chromosomech obratlovců jsou staré bezmála sto let (viz např. Schultz-Schaeffer 1976), hlavním obdobím rozvoje studia byl až metodický průlom v preparaci chromosomů pomocí mitostatik a hypotonního působení na živé buňky. U všech skupin obratlovců proto sahá studium jejich chromosomů přibližně 50 let do historie. Třebaže od té doby bylo popsáno značné množství karyotypů u různých druhů obratlovců, je prozkoumanost u jednotlivých skupin velmi nerovnoměrná. Čím fylogeneticky vzdálenější jsou studované skupiny obratlovců od člověka, tím nižší je úroveň nashromážděných cytogenetických poznatků. Tento jev souvisí s řadou faktorů jako je např. dostupnost studovaného materiálu, technické problémy při modifikaci jednotlivých metod nebo celkový počet laboratoří zabývajících se cytogenetikou živočichů (Ráb et al. 2007). Přestože rozsah znalostí o karyotypech některých skupin živočichů není dosud na vysoké úrovni, technicky vysoce rozvinutý metodický aparát, v současné době rutinně zavedený v lidské cytogenetice, proniká pozvolna i do cytogenetického studia živočichů a otvírá tak nové možnosti cytogenetického výzkumu v zoologii.

Intenzivnímu cytogenetickému výzkumu byli podrobeni zejména savci Palearktidy (Zima 2000). Nashromážděný soubor informací umožňuje uvažovat o evolučních a ekologických souvislostech mezidruhové a vnitrodruhové variability karyotypu a chromosomových přestaveb. Byly formulovány různé hypotézy o tom, jakým způsobem může selekce pracovat s počtem chromosomů a jak mohou tyto procesy souviset s morfologickými divergencemi a se speciací (Qumsiyeh 1994).

Variabilita v karyotypu by mohla být odrazem celkové stavby chromosomů; např. skupiny s holocentrickými chromosomy by podle předpokladu měly vykazovat větší variabilitu v počtu chromosomů než skupiny s monocentrickými chromosomy (Cook 2000), protože oddělené fragmenty holocentrických chromosomů jsou schopny udržet normální párování a správnou mitotickou a meiotickou disjunkci (Hughes-Schrader & Schrader 1961). Nicméně rozsah v počtu chromosomů u skupin s holocentrickými chromosomy se nijak zřetelně neliší od téhož rozsahu u taxonů s monocentrickými chromosomy (Cook 2000).

Obecně můžeme tvrdit, že v rámci placentálních savců panuje poměrně vysoká variabilita karyotypů. Uvažujeme-li rozpětí nejmenšího diploidního počtu chromosomů (*Muntiacus reevesi*  $2n = 6$  u samic a 7 u samců; Wurster & Benirschke 1967) a největšího



(*Tympanoctomys barrerae*  $2n = 102$ ; Contreras et al. 1990), které byly dosud u savců popsány, je variabilita v této linii skutečně značná. Naopak vačnatci a ptakořitní jsou v počtu chromosomů v karyotypu velmi konzervativní (Grützner et al. 2004). Poměrně velkou variabilitu v počtech chromosomů nacházíme u ryb ( $2n = 12 - 390$ ), kde je ale situace komplikovanější v důsledku častějšího výskytu polyploidie. U plazů včetně ptáků je rozpětí nejmenšího popsaného počtu chromosomů (*Gonatodes taniae*  $2n = 16$ ; Schmid et al. 1994) a největšího (*Alcedo atthis*  $2n = 132$ ; Burt 2000) srovnatelné jako u savců, jednotlivé taxonomické jednotky však většinou nejsou vnitřně tak variabilní v počtech chromosomů, jak je u savců běžné. Poměrně nízkou variabilitu nacházíme v dosud popsaných karyotypech obojživelníků. Navíc na úrovni menších taxonomických jednotek (rod, druh) bývá počet chromosomů téměř uniformní, zatímco ve většině menších taxonomických jednotek savců je variabilita poměrně vysoká. Rozdíly v karyotypu bývají pozorovány také u morfologicky neodlišitelných druhů nebo mezi různými populacemi jednoho druhu (Zima 2000); např. u rejseka obecného (*Sorex araneus*) je známo 50 chromosomových ras (Zima et al. 1988; Zima et al. 1996). Evoluční procesy řídící karyotypovou diferenciací mohou být tytéž, které hrají roli na úrovni evoluce organismů a selekce chromosomových změn je zprostředkována přímo nebo nepřímo přes fenotyp. Jiné vysvětlení zamítá okamžitý selekční vliv prostředí na karyotyp a předpokládá, že evoluční chromosomové změny jednoduše reflektují autonomní procesy probíhající ve vnitřním prostředí buněčného jádra (Zima 2000). Celková chromosomová evoluce je ovlivňována na dvou základních úrovních: jsou to faktory působící na populaci (demografická úroveň ovlivňuje pravděpodobnost fixace změn v populaci) a faktory na úrovni genotypu, které určují jak často budou chromosomové změny vznikat (Slamovits & Rossi 2002). Někteří autoři uvádějí, že iniciační roli chromosomových změn mohou hrát retroelementy, jež jsou, jak bylo popsáno zejména na příkladu savců, velmi dynamickou součástí genomu představující důležitý faktor genomové plasticity (Wichman et al. 1991; Rossi et al. 1995). Tyto sekvence, podléhající rychlé evoluci by mohly zahájit chromosomové přestavby prostřednictvím intragenomových přesunů mezi nehomologními chromosomy a mezi různými chromosomovými partiemi (Slamovits & Rossi 2002). Tomu nasvědčuje přítomnost rychle se vyvíjejících transposabilních elementů u karyotypově variabilních skupin savců, např. rodu *Macrotus* (Bradley & Wichman 1994).

Chromosomové mutace vedoucí ke kvantitativním změnám chromosomového materiálu (např. delece) podléhají silné negativní selekci, naopak mutace, způsobující změny v uspořádání chromatinu nebo změny v počtu chromosomů mohou být za určitých podmínek zafixovány. Může se tak dít např. vlivem genetického driftu, jehož efekt může

být umocněn sociální strukturovaností většiny savčích populací (Zima 2000). Jiný model týkající se adaptivního charakteru chromosomových změn je tzv. kanalizační model (Bickham & Baker 1979 ex Zima 2000). Tento model předpokládá přímý adaptivní význam chromosomové sady a vliv chromosomových přestaveb na fenotyp. Proces začíná po proniknutí linie do nové adaptivní zóny; v této fázi je rychlost karyotypových změn nejvyšší, v důsledku intenzivní selekce. V další fázi rychlost karyotypové diferenciace klesá, aby v konečné fázi linie vstoupila do stáze s minimálním nebo nulovým počtem chromosomových změn.

Chromosomové změny (zejména reciproční translokace) však často snižují fitness heterozygotů. Karyotypová evoluce bude tedy s největší pravděpodobností podléhat stabilizující selekci, která bude snižovat možnosti vzniku chromosomových přestaveb. K tomu mohou sloužit mnohé mechanismy uspořádání chromosomální DNA (např. vazba na histony, spiralizace), které budou zabraňovat párování nehomologických chromosomů. Vzhledem k tomu, že musí být naopak zajištěno párování homologických chromosomů, budou tyto mechanismy balancovány a s určitou frekvencí bude docházet ke vzniku chromosomových přestaveb, jež mohou být za vhodných podmínek fixovány (Imai et al. 1986). Soubor hypotéz řešících adaptivní význam karyotypové diferenciace souvisí s efektem chromosomových přestaveb na genetickou rekombinaci. Počet možné chromosomové segregace během meiosis je  $2^N$ , kde  $N$  je haploidní počet chromosomů. Je tedy zřejmé, že vliv počtu chromosomů na potenciální variabilitu potomstva je značný. Chromosomové změny, které snižují nebo zvyšují počet chromosomů, mohou snižovat pravděpodobnost rekombinace mezi starou a novou formou chromosomů, což může za určitých podmínek napomáhat speciaci. Vysoký počet chromosomů by tedy v důsledku vyšší variability potomstva mohl usnadnit využívání širší ekologické niky a disperzi na velké geografické vzdálenosti. Na druhou stranu přestavby, v jejichž důsledku dojde ke snížení celkového počtu chromosomů, by měly být selektovány u organismů žijících ve stabilním prostředí a osidlujících úzké ekologické niky v malém geografickém rozsahu (Qumsiyeh 1994). Poměrně častá pozorování blízce příbuzných druhů lišících se počtem chromosomů podporují představu, že chromosomální rozdíly jsou zodpovědné za reprodukčně izolační mechanismy, jež mohou ve výsledku vést ke speciaci. Tyto modely jsou pak klasifikovány podle genetických mechanismů, „fitness“ jednotlivých přestaveb, populační struktury a genetických korelátů (Sites & Moritz 1987; King 1993). I bez souvislosti s fitness mohou být chromosomové změny fixovány prostřednictvím driftu, který zafixuje náhodně vzniklé centrické fúze. Takové změny ještě nemusí být bariérou

pro reprodukci, jedná-li se o populace, kde v jedné došlo k fúzi mezi určitým párem chromosomů (např. chromosomy 1 a 2) a v druhé je zachován původní stav. Jakmile však dojde v druhé populaci k fixaci odlišné fúze (např. mezi chromosomy 1 a 3), budou vznikat u hybridů v meióze kvadrivalenty a segregace bude nerovnoměrná. Tento proces pak bude selektovat na vznik reprodukční bariery (Baker & Bickham 1986). Jiný model souvislosti chromosomových přestaveb a speciace popsal Rieseberg (2001). Podle něj chromosomové přestavby provázené izolací určitých genů mohou prostřednictvím potlačení rekombinace bránit velkým úsekům genomu v genovém toku, a tím napomáhat speciaci.

Většina nově vznikajících karyotypových změn snižuje životaschopnost či plodnost svých nositelů. Karyotypové přestavby, jež byly během evoluce fixovány, však nemohou zhoršovat životaschopnost kříženců s nositeli původní (zpočátku mnohem častější) formy karyotypu. Proto zafixované chromosomové přestavby zřejmě nemohou vytvořit výrazné reprodukční bariery a tím iniciovat speciaci (King 1993). Nicméně změny v karyotypu jsou zřejmě častým produktem speciálních procesů. V důsledku meiotického tahu se může v populaci rychle rozšířit nová mutace, jestliže bude tato mutace ovlivňovat průběh meiózy, např. tak, že bude zvyšovat pravděpodobnost, že se ocitne ve funkčních pohlavních buňkách a tedy v genofondu příští generace (King 1993).

Karyotypové přestavby mají pravděpodobně významnou souvislost s evolučními procesy na úrovni organismů. Nicméně tato souvislost je zřejmě složitější než přímý adaptivní efekt. Speciace iniciovaná náhodnými chromosomovými přestavbami může být považována za adaptivní odpověď na postkopulační reprodukčně isolační mechanismy vyplývající z křížení populací nebo ras s různými karyotypy. Genetický drift, který závisí na velikosti populace, hraje nepochybně velkou roli při chromosomových přestavbách. Nicméně evoluční procesy ovlivňující diferenciaci karyotypu a speciaci obecně se mohou překrývat (Zima 2000).

## 2. Pohlavně determinační mechanismy obratlovců a jejich evoluce

### 2.1. Pohlavně determinační mechanismy

Předpokládá se, že existence pohlavního rozmnožování podporuje genetickou rekombinaci a tedy fenotypovou variabilitu. Stále však zůstává otázka, proč existují oddělená pohlaví. Hermafroditismus, běžný např. mezi mořskými bezobratlými, není u živočichů zdaleka tak rozšířen jako gonochorismus. Charlesworth (1991) navrhl model přechodu od hermafroditismu ke gonochorismu, kdy musí vzniknout dva typy mutací. První z nich způsobí vznik samic neschopných produkovat samčí gamety a druhá způsobí obdobným procesem vznik samců. V populaci se tedy budou vyskytovat jedinci schopní produkovat jen samčí nebo samičí pohlavní buňky a jedinci schopní produkovat oba typy buněk. Vzhledem k tomu, že samooplození vede k inbreedingu a protože je výhodnější specializovat se na produkci jen jednoho typu gamet než rozdělovat zdroje do dvou typů, bude selekcí nakonec upřednostňován gonochorismus. Ten se také jako selekčně výhodný mechanismus vyskytuje téměř ve všech skupinách živočichů a rostlin.

Mechanismus určení pohlaví je pro gonochoristy základním biologickým procesem, který je bezpodmínečně nutný pro vývoj jedince a pro ustanovení požadovaného poměru pohlaví v přirozené populaci (Fisher 1958). U živočichů se setkáváme se dvěma základními systémy determinace pohlaví. Prvním z nich je environmentálně určené pohlaví (ESD; z angl. „environmental sex determination“), v němž to, zda se vyvine ze zygoty samec či samice, není predikováno pohlavně specifickým genotypem zygoty, ale závisí na vnějších podmínkách. Druhým způsobem je geneticky (někdy asi správněji též označované jako genotypicky) určené pohlaví (GSD; z angl. „genetic sex determination“), kde o pohlaví rozhodují pohlaví determinující geny, jenž jsou vázány na pohlavní chromosomy (Ohno 1967; Bull 1983).

Uvnitř každého z těchto základních typů rozlišujeme ještě několik možností, kterými může být o pohlaví rozhodnuto. V souvislosti s environmentálně určeným pohlavím u plazů většinou hovoříme o teplotně určeném pohlavím (TSD; z angl. „temperature dependent sex determination“), protože z vnějších vlivů je to právě inkubační teplota během kritické periody po oplození, která nejčastěji rozhoduje o pohlaví vyvíjejícího se jedince (Ohno 1967; Charnov & Bull 1977; Bull 1980; Bull 1983; Janzen & Paukstis 1991b; Valenzuela et al. 2003).

Pohlavní chromosomy v genetickém systému určení pohlaví mohou být morfologicky nerozlišené (homomorfní) nebo rozlišené (heteromorfní) (Ohno 1967; Vorontsov 1973; Bull 1983; Olmo 1984; Charlesworth 2002). I morfologicky nerozlišené chromosomy jsou diferencovány jako pohlavní, jestliže nesou geny určující pohlaví (Valenzuela et al. 2003). Od autosomů se tedy neodlišují tvarem ani velikostí, ale tím, že na jednom z nich jsou přítomny pohlaví determinující geny.

V některých případech nebývá snadné správně stanovit, zda je ten který druh skutečně nositelem teplotně nebo geneticky určeného pohlaví. Ne všechny druhy obratlovců postrádající heteromorfní pohlavní chromosomy mají TSD, a přestože je poměr pohlaví vychýlen v důsledku teploty po fertilizaci, nejedná se ve všech případech o TSD (Valenzuela 2003). Prvním krokem ke správné identifikaci je test na přítomnost heteromorfních pohlavních chromosomů. Pokud není zjištěna přítomnost heteromorfních pohlavních chromosomů, musí být zvažována existence homomorfních pohlavních chromosomů (Bull 1983; Dournon et al. 1990). Je-li zjištěna z pokusů s líhnutím při škále konstantních inkubačních teplot nezávislost poměru pohlaví na teplotě a heteromorfní pohlavní chromosomy nebyly nalezeny, může to indikovat právě přítomnost homomorfních pohlavních chromosomů. Někdy mohou vlivy prostředí převážit nad pohlavními chromosomy, a to přímo nebo nepřímo. Jedná se např. o teplotně závislou mortalitu jednoho pohlaví (Burger & Zappalorti 1988) nebo pohlavně selektivní resorpci či aborci embryí (Krackow 1992; Blackburn et al. 1998). Pak hovoříme o GSD modifikovaném environmentálním faktorem a v takovém případě je nutné vyloučit závěry, že je přítomno TSD. Důvodem je skutečnost, že teplota nedeterminuje pohlaví samotné, ale pouze zabraňuje vývoji zygot určitého genotypem daného pohlaví. Alternativně teplota může působit posun v primárním poměru pohlaví tím, že nebudou produkovány gamety dávající vznik určitému pohlaví, případně budou gamety pro dané pohlaví upřednostňovány při fertilizaci (Komdeur et al. 1997; Stockley 1999). Konečně existuje také možnost, že teplota působící při diferenciaci pohlaví může indukovat vznik pohlavních revertantů u druhů nesoucích heteromorfní nebo homomorfní pohlavní chromosomy (Baroiller et al. 1995; Blackburn et al. 1998), tím dochází k rozporu mezi genotypem a fenotypem daného jedince. Pohlavně revertování jedinci se však dají v mnohých případech odhalit při studiu karyotypu nebo podle nevyrovnaných poměrů pohlaví v druhé generaci. V obou předchozích případech je však pohlaví určeno primárně prostřednictvím genetických faktorů a jedná se tím pádem o GSD s environmentálním vlivem. Za teplotní determinaci pohlaví je tedy možné považovat jen ty situace, kdy byly vyloučeny všechny jmenované možnosti a poměr pohlaví sledovaný v dostatečně velkém vzorku závisí na inkubační teplotě (Valenzuela et al. 2003).

## 2.2. Základní systémy určení pohlaví faktory prostředí

Nejznámějším a nejprostudovanějším podtypem environmentálně určeného pohlaví je bezpochyby teplotně určené pohlaví známé u mnoha skupin plazů. V rámci tohoto systému můžeme odlišit tři možnosti, kterými dochází k determinaci pohlaví. V prvním systému (TSDI.a, MF) se při vyšších teplotách líhnou samci a z nižších teplot samice. Ve druhém systému (TSDI.b, FM) je situace obrácená a ve třetím (TSDII., FMF) se samice líhnou z vysokých i nízkých teplot a ze středních teplot se líhnou převážně samci (Viets et al. 1994; Valenzuela 2004). Obě pohlaví se líhnou pouze v rozmezí několika teplotních stupňů specifických pro druh (Valenzuela 2004), např. u aligátora amerického (*Alligator mississippiensis*) je to pouze v rozmezí 1-2 °C (Ewert & Nelson 2003). Určení pohlaví prostřednictvím teploty bylo pozorováno u všech dosud studovaných druhů krokodýlů, u mnoha druhů želv, u obou druhů hatérií a mezi šupinatými plazy u některých druhů agam, chameleonů a gekonů (Janzen & Paukstis 1991a; Janzen & Paukstis 1991b; Viets et al. 1994; Bragg et al. 2000; El Mouden et al. 2001; Harlow 2004; Nelson et al. 2004; Deeming 2005).

Mnoho prací také prokázalo vliv teploty na pohlaví u ryb (Conover 1984; Baroiller et al. 1999; Conover 2004). Z vnějších vlivů to však není pouze teplota, která může rozhodovat o pohlaví mláďat. Mohou to být sociální vlivy, hustota populace či přítomnost samce v hejnu nebo aktuální densita určitého pohlaví (Hurley et al. 2004). U některých druhů ryb zodpovídá za vznik určitého pohlaví pH vody. Tento efekt byl prokázán u 5 druhů cichlid, kde nižší hodnoty pH (5-6) vychylují poměr pohlaví směrem k samcům, zatímco hodnoty pH okolo 7 vedou k nadprodukci samic (Rubin 1985). V některých případech bylo prokázáno, že pohlaví je ovlivňováno populační hustotou; ve většině studovaných populacích vysoká populační hustota vede ke zvýšené produkci samců (Colombo & Grandi 1996).

## 2.3. Základní systémy geneticky určeného pohlaví

V rámci geneticky určeného pohlaví bývá rozlišováno několik základních typů. Nejrozšířenějším je tzv. *dvoufaktoriální systém*, kde je pohlaví determinováno prostřednictvím samčí nebo samičí heterogamete. Pohlavní chromosomy mohou být navzájem strukturně a geneticky velmi odlišné, případně může být přítomen pouze jednoduchý gen nebo malý region odlišující pohlavní chromosomy. V systému pohlavních chromosomů se setkáváme s několika základními kombinacemi. Samec je heterogametický, jsou-li přítomny pohlavní

chromosomy typu XX/XY, XXX/XXY a typu XX/XO, ve kterém došlo k úplné ztrátě Y chromosomu. Za přítomnosti pohlavních chromosomů typu ZZ/ZW, ZZZ/ZZW a ZZZ/ZWW je heterogametickým pohlavím samice (Ohno 1967; Bull 1983). Zvláštním typem geneticky určeného pohlaví je situace vyskytující se u platy skvrnitě (*Xiphophorus maculatus*), kde pohlaví je kontrolováno jednoduchým lokusem nebo skupinou silně vázaných lokusů děděných jako jeden lokus s třemi základními faktory: W, X a Y označovanými jako jednotlivé alely. Chromosomy nesoucí tyto alely byly proto pojmenovány W, X, Y. Tyto alely pak generují tři typy samičích (WX, XX, WY) a dva typy samčích (XY, YY) genotypů (Basolo 1994).

*Multifaktoriální systém* je popisován jako interakce mezi základním pohlavím určujícím mechanismem a dalším faktorem, jako je například dominantní gen (M), který způsobí, že jedinci XY i XX se vyvinou v samce. Samice budou vždy XXmm, zatímco samčí genotyp bude XYMm nebo XXMm (Charlesworth 2002).

*Haplodiploidie* je další z výčtu jednotlivých typů GSD. Diploidní jedinci v tomto případě produkují oplodněná vajíčka, vyvíjející se v samice a neoplozená vajíčka, dávající vznik haploidním samcům. *Systém ztráty otcovského genomu* je geneticky velmi podobný haplodiploidii. Všichni potomci vznikají z oplozených vajíček, ale u samců je kompletně eliminován otcovský genom. V některých případech se eliminace týká pouze germinální linie buněk, v jiných zahrnuje i buňky somatické. Poslední dva jmenované systémy však byly dosud popsány pouze u bezobratlých živočichů. (Bull 1983; Bull 1987; Charlesworth & Guttman 1996; Charlesworth 2002).

#### **2.4. Evoluce pohlavně determinačních mechanismů**

Jednou z nejdiskutovanějších otázek souvisejících se způsobem určení pohlaví a s evolucí pohlavních chromosomů je otázka vzniku pohlavně determinačních mechanismů a možnosti jejich přechodů (Ohno 1973; Charnov & Bull 1977; Bull 1980; Bull 1983; Moritz 1990; Janzen & Paukstis 1991a; Charlesworth 2002; Valenzuela et al. 2003; Miller et al. 2004; Mank & Avise 2006). Na ESD a GSD je možné nahlížet jako na dva konce jednoho kontinua (Sarre et al. 2004). Příkladem může být scink *Bassiana duperreyi*, u něhož byly popsány pohlavní chromosomy a zároveň závislost poměru pohlaví na teplotě (Shine et al. 2002). Jelikož ale nebyl do současnosti dostatečně jednoznačně popsán mechanismus dlouhodobého udržování pohlavních chromosomů v ESD populaci, je možné se domnívat, že v tomto případě se mohlo jednat o geneticky určené pohlaví s environmentálním efektem (viz výše).

Největší zájem je věnován otázkám možného přechodu mezi jednotlivými pohlavně determinacími mechanismy. Na jedné straně jsou popsány hypotézy a teoretické mechanismy vzniku a udržování geneticky určeného pohlaví z původnějšího environmentálního systému (Ohno 1973; Bull 1983; Charlesworth & Charlesworth 2000; Charlesworth 2002). Na straně druhé existují teorie o přechodu mezi základními systémy určení pohlaví v opačném směru (Charnov & Bull 1977; Charnov 1982; Bull 1983; Conover 1984).

Odpovědi na otázky, který ze systémů určení pohlaví je v evoluci původnější a jakým směrem se u jednotlivých skupin ubíraly přechody mezi jednotlivými pohlavně determinacími systémy, mohou přinést fylogenetické analýzy. Jednu z prvních analýz vytvořili Janzen & Paukstis (1991a) a výsledkem bylo konstatování, že ESD je spíše než GSD ancestrálním stavem pro želvy. Ve stejném roce pak publikovali výsledky fylogenetické analýzy také pro ještěry se stejným závěrem (Janzen & Paukstis 1991b). Výsledkem analýzy vytvořené pro všechny obratlovce (Janzen & Krenz 2004; Janzen & Phillips 2006) je tvrzení, že v rámci vertebrát je ancestrálním stavem GSD a ESD vznikalo v jednotlivých skupinách nezávisle. ESD je původním stavem u želv, zatímco v rámci skupiny Squamata je situace nerozřešena. Problémem je, že autoři začlenili do analýzy i sporná data a rozsah nashromážděných informací o pohlavně determinacích mechanismech není příliš velký. Podle rozsáhlejší analýzy vytvořené pro šupinaté plazy (Pokorná & Kratochvíl, nepubl. rukopis) je ancestrálním systémem pro tuto skupinu TSD a k přechodům v GSD docházelo v jednotlivých skupinách, kde je přítomno, nezávisle. S dobře podpořenou variabilitou v pohlavně determinacích mechanismech (míněno GSD vs. TSD) se navíc u ještěrů setkáváme pouze ve dvou skupinách, a to u gekonů a agam.

Analýza vypracovaná pro kostnaté ryby (Mank et al. 2006) přinesla rozporuplné výsledky. Autoři odhalili v této skupině značnou variabilitu v pohlavně determinacích mechanismech a z analýzy vyplývá celá řada vzájemných přechodů jednotlivých systémů. Bohužel i zde se setkáváme s nedostatečným počtem dosud zkoumaných taxonů, která je ale zapříčiněna složitostí pozorování pohlavně determinacích mechanismů u ryb. Chromosomy jsou často malé a početné a pohlavní rozdíly jsou těžko odhalitelné. Ještě složitější je však stanovit u ryb environmentální způsob pohlavního určení. Z toho důvodu jsou data ovlivněna identifikací pohlavně determinacích mechanismů ve prospěch GSD.



### 3. Obecné evoluční modely vedoucí ke vzniku a diferenciaci pohlavních chromosomů

#### 3.1. Vznik pohlavních chromosomů

Vzniku pohlavních chromosomů předcházela přechod od isogamie k funkční a později morfologické anizogamii; přechod od konjugace morfologicky identických gamet k fúzi strukturně i funkčně odlišných pohlavních buněk, ke kterému došlo nezávisle u mnoha skupin živočichů a rostlin (Barton & Charlesworth 1998).

Evoluce heteromorfních chromosomů z původního homomorfního páru s největší pravděpodobností není výsledkem jedné strukturální změny, ale mnoha postupných kroků. Protože evoluční proces nemůže být opakován experimentálně, mohou se jednotlivé změny na chromosomech během evoluce rekonstruovat pouze pomocí srovnávacích studií (Scherer & Schmid 2001). U některých druhů ryb, plazů a obojživelníků se až do dnešní doby dochovalo několik iniciálních stádií diferenciaci pohlavních chromosomů; díky tomu je možné rekonstruovat evoluční posloupnost, v níž vznikaly vzrůstající strukturální změny pohlavních chromosomů (Scherer & Schmid 2001). Na začátku došlo patrně k rozlišení dvou typů pohlavních genů. Jedním z nich jsou geny kontrolující vývoj znaků charakteristických pro dané pohlaví během ontogeneze. Druhým typem genů jsou tzv. geny „spouštěče pohlaví“ rozhodující o tom, která z vývojových cest pohlavních znaků bude použita. Budeme-li uvažovat vznik systému určení pohlaví prostřednictvím XX/XY chromosomů, bude zřejmě gen pro samce (M) dominantní alele pro vznik samice (f). Homozygotní stav (ff) tedy bude charakteristický pro samice a heterozygotní (Mf) pro samce (Ohno 1967). Předpokladem je, že v evoluci pohlavních chromosomů existoval stav, kdy 90% homomorfních chromosomů bylo tvořeno homologickým materiálem a geny „spouštěče pohlaví“ byly koncentrovány na malých nerekombinujících úsecích cytomorfolicky nerozlišených pohlavních chromosomů (Vorontsov 1973). Pokračující diferenciaci těchto chromosomů je možná jenom proto, že je umožněna postupná akumulace relativně dlouhých segmentů nesoucích pohlavně determinující faktory na vznikajících X a Y chromosomech (Ohno 1967). Postupně tedy dochází ke koncentraci genů „spouštěčů pohlaví“ na jednom z párů autozomů, zatímco geny kontrolující vývoj pohlavně charakteristických znaků zůstaly distribuovány mezi ostatní autozomy (Vorontsov 1973).

### 3.2. Diferenciace pohlavních chromosomů

Z evolučního hlediska je výhodné, aby geny „spouštěče pohlaví“ nesly odlišné chromosomy, mezi nimiž je potlačen crossing-over, jelikož ten by mohl způsobit vznik jedinců, kteří nejsou ani samci ani samice (Charlesworth & Charlesworth 2000; Charlesworth 2002). Tento tlak pravděpodobně vedl k potlačení crossing-overu v nehomologických úsecích vznikajících pohlavních chromosomů (Scherer & Schmid 2001). Úplné přerušení však mnohdy nemusí být zcela dokonalé a existuje mnoho přechodů od homomorfních k diferencovaným heteromorfním pohlavním chromosomům (Bull 1983). Nicméně izolace vznikajících chromosomů způsobená zamezením crossing-overu mezi nimi může poskytnout podmínky pro rozdílnou kumulaci antagonistických pohlavně determinačních genů a genů pro pohlavně vázané znaky na původně homologických chromosomech. Roli v této pokračující diferenciaci mohou mít delece, inverze nebo geny suprimující rekombinaci. Prvním krokem ke vzniku heteromorfních pohlavních chromosomů je však patrně vznik pericentrické inverze, která může potlačit crossing-over a vytvořit podmínky, za kterých zamezení crossing-overu znamená selekční výhodu (Ohno 1967). Dojde-li totiž ke crossing-overu uvnitř invertovaného segmentu, budou produkovány gamety, jejichž chromosomy ponese delece nebo duplikace. Po vzniku pericentrické inverze následuje takřka zpravidla heterochromatinizace Y a W chromosomů, zatímco většina struktur na X a Z chromosomech zůstává zachována (Schmid & Steinlein 2000). Geny, které leží na X a Z chromosomech tvoří nepostradatelnou část genomu a jejich ztráta by mohla mít vážné následky pro viabilitu, proto se diferenciace vznikajícího heteromorfního páru týká pouze Y a W chromosomů. Ty jsou potom z velké části tvořeny vysoce repetitivními DNA sekvencemi (Ohno 1967). Absence genetické rekombinace narušuje schopnost přírodního výběru podporovat fixaci pozitivních mutací a eliminovat fixaci škodlivých mutací na Y (Barton & Charlesworth 1998). Řada procesů může vést k rychlejší fixaci škodlivých mutací nebo naopak k pomalejší fixaci mutací výhodných na vznikajícím Y chromosomu ve srovnání s X. Většina těchto procesů souvisí s tzv. Hill-Robertsonovým efektem, který popisuje jev, kdy zvýšení frekvence upřednostňované alely způsobuje zvýšení frekvence škodlivé alely, která je s ní v těsné genové vazbě (Braverman et al. 1995; Charlesworth & Guttman 1996; Charlesworth & Charlesworth 2000), což vede k oslabení pozitivní selekce v nerekombinujících úsecích. Mezi evoluční procesy, které vedou ke snížené adaptivnosti a variabilitě nerekombinujících úseků může patřit také selekce na pozadí. Neutrální nebo slabě selektovaná mutace má

ve velké nerekombinující populaci šanci na zafixování pouze, vznikne-li na chromosomu, který nenese velkou škodlivou mutaci, s níž by mohly být odstraněny (Charlesworth & Guttman 1996; Hey 1999; Otto 2000). Efektivní velikost populace nerekombinujících chromosomů pak může být značně snížena ve velké populaci v rovnováze důsledkem selekce. To urychluje fixaci slabě škodlivých mutací a zpomaluje fixaci výhodných mutací (Charlesworth & Charlesworth 2000). Vlivem efektu Mullerovy rohatky, v důsledku mírně negativních mutací vznikajících náhodně, dochází k postupnému zhoršování průměrné životaschopnosti jedinců v populaci (Muller 1964). Chromosomy nesoucí méně škodlivých mutací nemohou být v nepřítomnosti rekombinace a zpětných mutací opraveny a tento proces je provázen fixací škodlivé mutace (Charlesworth & Charlesworth 2000; Gorelick 2003). Jmenované procesy mohou vést k snížení efektivní velikosti populace vznikajících nepárových chromosomů, a tím k poklesu vlivu selekce na úkor genetického driftu. Y nebo W chromosomy tedy nesou oproti chromosomům X a Z změny ve struktuře a konstituci a mají haploidní nerekombinující genom. To vede spolu s faktem, že četnost chromosomu Y (W) je oproti četnosti X (Z) třetinová, k fixaci škodlivých mutací na Y (W). K tomuto efektu může ještě přispívat pohlavní výběr, který snižuje efektivní počet rozmnožujících se samců a také fakt, že nedochází k odstranění škodlivých mutací fixovaných spolu s výhodnými mutacemi prostřednictvím rekombinace. Všechny tyto faktory přispívají postupně k heterochromatinizaci chromosomu Y (W), což podněcuje evoluci mechanismů kompenzujících genovou dávku mezi odlišnými pohlavními chromosomy (Charlesworth 2002).

Rozsáhlá degenerace nepárového pohlavního chromosomu však není obecným jevem pro všechny skupiny živočichů; u některých zůstává Y nebo W chromosom stejně velký jako X a Z a nese řadu genů (Charlesworth 2002). Předpokládá se, že tento stav je mezistupněm mezi homomorfními chromosomy a stavem, kde Y a W jsou velmi redukováné vůči X a Z; u mnoha evolučně odvozených skupin se s ním tedy nesetkáme. V některých případech však naopak dochází ke kumulaci repetitivních sekvencí na nepárovém pohlavním chromosomu do té míry, že se pak stává největším chromosomem celého karyotypu (Matsunaga et al. 2003).

### 3.3. Srovnání typu pohlavních chromosomů a pohlavně specifických genů mezi jednotlivými skupinami obratlovců

V rámci obratlovců se setkáváme s různými způsoby chromosomálního určení pohlaví. U ryb je situace zvláště komplikovaná. Můžeme se zde setkat s určením pohlaví prostřednictvím pohlavních chromosomů, a to typu XX/XY např. u některých lososovitých i typu ZZ/ZW např. u rodu *Gambusia*. U rodu *Xiphophorus*, jak již bylo zmíněno, nacházíme samičí i samčí heterogamii ve stejném druhu, což bývá vysvětlováno recentní divergencí pohlavních chromosomů (Basolo 1994). Na příkladu druhu *Xiphophorus maculatus* tedy může být demonstrováno, že mezi jednotlivými chromosomálními systémy nemusí být vždy ostrá hranice. Existují ale i jiné, zpravidla druhově specifické mechanismy určení pohlaví ryb, ve kterých hrají roli více než dva pohlavní chromosomy nebo multifaktoriální polygenetický systém. Mnoho prací také prokázalo environmentální vliv na pohlaví vyvíjejících se jedinců (Baroiller et al. 1999). O genech determinujících pohlaví ryb je v současnosti stále málo informací. Recentně byl identifikován gen pro samčí determinaci (*DMY*) u sladkovodní ryby *Oryzias latipes*, kde jsou heterogametickým pohlavím samci. Molekulární manipulací bylo prokázáno, že přítomnost fragmentu tohoto genu v genotypu samice je postačující pro vývoj varlat (Devlin & Nagahama 2002; Matsuda et al. 2007).

U obojživelníků byl do současnosti popsán pouze chromosomální způsob determinace pohlaví. Stejně jako u ryb se u nich ovšem můžeme setkat buď se samčí (XX/XY) nebo se samičí (ZZ/ZW) heterogamií (Wallace et al. 1999). U některých druhů nacházíme také nerozlišené, homomorfní pohlavní chromosomy (Hayes 1998). Neobvyklý způsob určení pohlaví byl objeven u novozélandské žáby *Leiopelma hochstetteri*, u níž o pohlaví rozhoduje systém OW/OO, ve kterém došlo k úplné ztrátě pohlavního chromosomu Z (Green 1988).

Savci naopak reprezentují skupinu, která vykazuje vnitřně víceméně jednotný typ genetického určení pohlaví. O budoucím pohlaví savčího embrya rozhodují XX/XY chromosomy (Vorontsov 1973; Graves & Watson 1991; Graves 2000; Charlesworth & Charlesworth 2000; Chow & Brown 2003; Grützner et al. 2004; Carrel & Willard 2005; Matsubara et al. 2006). U placentálních savců je zpravidla chromosom X velký a genově bohatý oproti malému heterochromatinizovanému Y, který má s X shodnou pouze malou pseudoautosomální oblast, v níž dochází mezi X a Y k rekombinaci během meiotického dělení. V současné době je na Y chromosomu člověka popsáno 33 genů (oproti zhruba 3000 – 4000 na X), z nichž 10 je exprimováno pouze ve varlatech a další ovlivňují zejména

vývoj samčích sekundárních pohlavních znaků (Roldan & Gomendio 1999) a některé jsou inaktivní pseudogeny (Graves 2000). Nicméně ne všechny geny zodpovědné za vývoj varlat nebo samčích pohlavních buněk jsou lokalizovány na Y; řada z nich je umístěna na X chromosomu. *SRY*, gen zodpovědný za vývoj varlat je homologický pro placentální savce a vačnatce (Foster et al. 1992; Ganesh et al. 1997; Pask et al. 2000), u vejcorodých savců však žádný gen specifický pro samce nebyl nalezen. *SRY* patří do skupiny genů, které mají homology na X chromosomu, což naznačuje, že tyto geny jsou důležité pro obě pohlaví. Gen *SRY* specifický pro vývoj samců se zřejmě vyvinul z genu *SOX3*, jenž je jeho homologem na chromosomu X (Charlesworth 2003). Gen *ATRX* nalezený u vačnatců, exprimovaný pouze ve varlatech, je považovaný za původní savčí pohlavně determinační gen a je označován jako možný iniciátor diferenciace pohlavních chromosomů (Graves & Shetty 2001). Vzácně u savců může dojít k úplné ztrátě Y chromosomu, např. u rodu *Ellobius* (Charlesworth 2002). Předpokladem je, že geny rozhodující o vývoji určitého typu gonády jsou přemístěny na jiné místo v genomu, a tedy na jiný pár chromosomů (Graves 2005), které pak slouží jako neopohlavní chromosomy nebo dojde spolu se ztrátou pohlavního chromosomu také ke ztrátě samčího pohlavního genu a pohlavní systém je pak typu XX/XO (Graves & Shetty 2001). Zatímco X chromosom placentálních savců tvoří 5% haploidního genomu, u vačnatců jsou to pouze 3% a u vejcorodých jsou naopak pohlavní chromosomy poměrně velké a párují po celém krátkém raménku chromosomu X a dlouhém raménku Y. Nicméně geny lokalizované na lidském pohlavním chromosomu X byly nalezeny na X chromosomu vačnatců i vejcorodých savců (Graves 1995). Zajímavým zjištěním, které poněkud narušuje pohled na jednotnost systému pohlavní determinace uvnitř savců je skutečnost, že u ptakopyska *Ornithorhynchus anatinus* byla objevena přítomnost pěti X chromosomů, z nichž jeden je homologický s ptačím Z chromosomem. Tato zjištění by mohla znamenat, že systém určení pohlaví přítomný u ptáků mohl být ancestrálním stavem pro všechny savce (Grützner et al. 2004), jak to interpretují autoři nebo že paralelně došlo ke vzniku pohlavních chromosomů ze stejného páru autosomů.

U ptáků o pohlaví rozhodují ZZ/ZW pohlavní chromosomy (Vorontsov 1973; Fridolfsson et al. 1998; Ellegren 2000). Chromosom Z tvoří 7% haploidního genomu uniformně u různých řádů ptáků, zatímco velikost W je v jednotlivých skupinách různá. Nicméně geny lokalizované na Z chromosomu kura domácího (*Gallus gallus*) byly nalezeny na tomtéž chromosomu u emu (*Dromaius novaehollandiae*) (Shetty et al. 1999). Není ještě zcela jasné, zda ptačí ZZ/ZW systém „pracuje“ přes samičí determinační geny umístěné na W chromosomu nebo prostřednictvím rozdílné dávky genů na chromosomu Z.

Gen *DMRT1*, který je součástí diferenciační kaskády varlat u všech obratlovců a jehož lokus byl nalezen na chromosomu Z u kura domácího, je považován za kandidátní gen pro určení pohlaví u ptáků (Graves & Shetty 2001). Na chromosomu W bylo do současnosti odhaleno jen několik genů, všechny mají své homology na Z, nejsou to však pseudoautosomální geny, ale jsou umístěny v nerekombinujících oblastech pohlavních chromosomů. Nejlépe prozkoumané jsou geny *CHD1Z* a *CHD1W* (Griffiths et al. 1996; García-Moreno & Mindell 2000); sekvenční data napovídají, že tyto dva geny mohly vzniknout nezávisle (Ellegren & Fridolfsson 1997) a jelikož leží v nerekombinujících oblastech W chromosomu, mohly by sloužit jako pohlaví určující geny. Podobně byl na W chromosomu odhalen i gen *ATP5A1*, jehož homolog se taktéž nachází v nerekombinující oblasti Z (Fridolfsson et al. 1998; Ellegren 2000).

Vlastní plazi (zde chápáni jako parafyletický taxon, tzn. bez ptáků) jsou skupinou obratlovců, ve které nalézáme určitou různorodost v mechanismech určení pohlaví. U želv (*Chelonia*), tedy skupiny s nejasným fylogenetickým postavením v rámci plazů, se setkáváme s druhy, které mají teplotně určené pohlaví, např. z čeledi *Pelomedusidae*, *Kinosternidae*, *Emydidae* nebo *Bataguridae* (Ewert & Nelson 1991). Dále potom s druhy, jejichž pohlaví je determinováno pohlavními chromosomy, a to morfologicky nerozlišenými (např. *Apalone*, *Pelodiscus* (*Trionychidae*), *Emydura*, *Chelodina* (*Chelidae*)) nebo rozlišenými, a to typu XX/XY např. u zástupců rodu *Staurotypus* (*Staurotypidae*) nebo ZZ/ZW, např. u rodu *Kachuga* (*Bataguridae*) (Janzen & Paukstis 1991b). Uvnitř jednotlivých čeledí nacházíme druhy se zcela odlišnými systémy, což může být podnětem k úvahám o původu a stáří jednotlivých pohlavně determináčních mechanismů. Jedním ze dvou plazích řádů, které reprezentují teplotně podmíněné určení pohlavní jako konzervativní model na úrovni celého řádu, jsou krokodýli (*Crocodylia*; Ewert & Nelson 2003) (všechny druhy krokodýlů však v tomto ohledu zkoumány nebyly). Druhým řádem s teplotně určeným pohlavím jsou haterie (*Rhynchocephalia*); v rámci tohoto řádu byly studovány oba druhy (*Sphenodon punctatus*, *S. guntheri*) a u obou bylo prokázáno TSD (Nelson et al. 2004). Haterie jsou sesterskou skupinou řádu *Squamata*. Uvnitř řádu šupinatých (*Squamata*) je možné nalézt téměř jakýkoli mechanismus, kterým je o pohlaví rozhodováno. Setkáváme se zde s teplotně určeným pohlavím stejně tak jako s genetickým a to se samičí i samčí heterogamecií. Nejlépe prozkoumaným systémem u plazů je patrně samičí heterogamie uniformní pro všechny hady. Geny, které rozhodují o determinaci konkrétního pohlaví však nejsou dosud spolehlivě popsány. Nejdříve byla u hadů jako kandidátní sekvence označena malá repetitivní oblast koncentrovaná na chromosomu W, podobná sekvenci soustředěné

na chromosomu Y u myši. Nicméně genovým mapováním se prokázalo, že tento úsek není zodpovědný za vývoj gonád u hadů (Graves & Shetty 2001). Jako další kandidátní geny byly určeny geny *DMRT1* a *SOX9*, jež jsou vysoce konzervativními geny s významnou rolí při diferenciaci varlat u různých skupin obratlovců (Foster et al. 1994; Wagner et al. 1994; Raymond et al. 1999). U třech druhů hadů z různých čeledí, kde probíhalo mapování těchto genů, však byly objeveny jejich homology na autosomech, z čehož vyplývá, že tyto geny také nezodpovídají za pohlavní determinaci hadů (Matsubara et al. 2006).

Obecně můžeme říci, že pohlavní chromosomy v páru jsou navzájem homologické (Ohno 1967). Ohno (1967) popsal, že rozdílná velikost pohlavních chromosomů u jednotlivých různě starých skupin hadů odpovídá posloupnosti diferenciaci pohlavních chromosomů a degenerace W. Společný původ pohlavních chromosomů u třech zástupců evolučně různě odvozených čeledí hadů byl potvrzen komparativním mapováním pohlavně vázaných genů (Matsubara et al. 2006). Podobný obraz nacházíme také u ptáků, kde pohlavní chromosomy běžců jsou poměrně málo diferencované oproti výrazné diferenciaci ZW u pěvců. Na základě podobné velikosti X chromosomu savců a Z ptáků a shodných výsledných fenotypů pohlavně vázaných mutací Ohno (1967) usuzuje, že je možné, aby pohlavní chromosomy ptáků a savců měly shodný původ. Později bylo u ptáků prokázáno, že geny specifické pro pohlavní chromosom W (*ATP5A1*, *CHDI*) mají své kopie na chromosomu Z; v rámci páru jsou tedy chromosomy homologické. Komparativním mapováním se však ukázalo, že ani jeden z těchto genů není pohlavně vázaný u placentálních savců, což naznačuje nezávislý vznik pohlavních chromosomů u ptáků a savců (Fridolfsson et al. 1998). Nezávislý původ pak potvrzují další studie, zaměřené na mapování pohlavně specifických genů, např. Z - vázané geny u kura domácího (*Gallus gallus*) mají své homologní sekvence na lidském chromosomu 5 a 9 (Nanda et al. 2000; Burt 2002) a naopak X - vázané geny člověka byly lokalizovány na chromosomu 1 a 4 kura domácího (Burt 2002; Kohn et al. 2004; Smith & Sinclair 2004). Na základě podobné velikosti Z chromosomů ptáků a hadů bylo předpokládáno, že pohlavní chromosomy těchto dvou skupin mají shodný původ (Graves & Shetty 2001). Sekvence ležící na Z chromosomu japonské užovky *Elaphe quadrivirgata* mají homology na autosomech člověka a kura domácího, stejně tak jako homology pohlavních genů kura domácího a člověka se nacházejí na autosomech hada (Matsubara et al. 2006). To dokazuje, že systém určení pohlaví s heterogametickým samičím pohlavím vznikl v evoluci nezávisle u předka ptáků a u předka hadů.

Ne vždy je snadné pohlavní chromosomy identifikovat, přestože dané druhy podle poměru pohlaví při pokusech s inkubační teplotou vykazují genetické určení pohlaví.

Homomorfní pohlavní chromosomy v rané fázi své diferenciaci jsou konvenčními cytogenetickými metodami neodhalitelné. V takových situacích je nezbytné použít citlivější metody molekulární cytogenetiky, jako např. komparativní genomovou hybridizaci. Touto metodou byly například odhaleny pohlavní chromosomy u agamy *Pogona vitticeps* nebo u australské sladkovodní želvy *Chelodina longicollis*, které jsou tvořeny mikrochromosomy (Ezaz et al. 2005; Ezaz et al. 2006). Pokud se však pohlavní chromosomy liší pouze v jednom nebo několika málo genech, nebudou odhalitelné ani s použitím komparativní genomové hybridizace.

### 3.4. Neopohlavní systémy

V některých případech mohou vlivem různých chromosomových přestaveb vznikat tzv. neopohlavní systémy (z angl. „neo-sex chromosomes“). Neopohlavní chromosomy většinou vznikají jako výsledek přestaveb zahrnujících pohlavní chromosomy a autosomy, nejčastěji prostřednictvím tzv. Robertsonových translokací. Jedná se o proces zahrnující centrickou fúzi dvou telocentrických nebo akrocentrických chromosomů za vzniku jednoho metacentrického chromosomu. Celý tento proces může, ale nemusí zahrnovat ztrátu telomerických sekvencí fúzovaných chromosomů v závislosti na procesech, které k fúzi vedou (Robertson 1916 ex Slijepcevic 1998). Při značení chromosomů pomocí telomerické sondy tedy můžeme v některých případech očekávat intersticiální signály v oblasti centromery u nově vzniklého metacentrického chromosomu. U řady obratlovců, u nichž došlo k centrickým fúzím byly intersticiální signály nalezeny. V těchto případech musí být zřejmě zapojeny nějaké mechanismy inaktivace telomerických sekvencí v oblasti centromery fúzovaných chromosomů (Slijepcevic 1998).

V procesu vzniku neopohlavních chromosomových systémů mohou hrát roli i reciproční translokace mezi metacentrickými chromosomy nebo centrické štěpení a patrně mohou být mezi tyto mechanismy zahrnovány i tandemové fúze (Yonenaga-Yassuda et al. 2005). Výsledkem jsou potom např. systémy  $X_1X_2Y$ ,  $XY_1Y_2$  nebo  $Z_1Z_2W$  či  $ZW_1W_2$ . Za přítomnosti neopohlavních systémů pozorujeme během meiosis vznik trivalentů, kvadrivalentů nebo složitějších chromosomových řetězců. Se systémy, v nichž dochází k centrické fúzi původního Y chromosomu s autosomem za vzniku velkého metacentrického chromosomu se setkáváme v rámci různých skupin živočichů. Druhý chromosom z páru autosomů, kde jeden z nich fúzoval s Y, po této fúzi začne fungovat jako nový X chromosom. Homologní pár těchto chromosomů u samice pak z důvodu zachování správného párování



funguje jako další pár pohlavních chromosomů X. V karyotypu samice se tedy vyskytují dva páry pohlavních chromosomů označované jako  $X_1X_1X_2X_2$ . Takový systém můžeme najít např. u některých skupin hmyzu, pavouků, ryb, obojživelníků, plazů nebo u savců (Gorman & Stamm 1975; De Smet 1981; Ewulonu et al. 1985; Fredga & Bulmer 1988; de Almeida-Toledo et al. 2000; Galián et al. 2002; da Silva & Margarido 2005; Král et al. 2006). U plazů se v některých ojedinělých případech setkáváme i se systémy, kdy u druhů, kde je heterogametickým pohlavím samice, došlo k fúzi W pohlavního chromosomu s autosomem (Odierna et al. 1996; Odierna et al. 2001) nebo naopak k fúzi autosomu se Z pohlavním chromosomem (Ray-Chaudhuri et al. 1971). Podobná situace byla popsána u rejska obecného (*Sorex araneus*), kde došlo k fúzi původního X chromosomu s akrocentrickým autosomem, druhý chromosom z původního páru autosomů pak funguje jako  $Y_2$  (Fredga & Bulmer 1988; Ashley 2002). Kromě situace u ptakopyska, kde komplex chromosomů vznikl pravděpodobně několikanásobnými chromosomovými translokacemi, při kterých páry autosomů získávaly postupně pohlavně specifické alely (Grützner et al. 2006), byl systém zahrnující více než čtyři pohlavní chromosomy dosud nalezen pouze u několika druhů rostlin a bezobratlých živočichů (Grützner et al. 2006).

### 3.5. Kompenzace genové dávky

Během diferenciaci pohlavních chromosomů dochází k značnému poklesu genové výbavy nepárového pohlavního chromosomu. Hemizygotní existence většiny genů na X je riskantní, přihlédneme-li k tomu, že monosomie i velmi malých autosomových oblastí je u člověka letální (Ohno 1957). Skutečnost, že samci s jedním X chromosomem prospívají stejně dobře jako samice se dvěma X, naznačuje, že v evoluci vznikl nějaký mechanismus vyrovnávající genetickou nerovnoměrnost mezi samci a samicemi. Muller (1947 ex Ohno 1967) zavedl pro tento mechanismus termín kompenzace genové dávky („dosage compensation mechanism“). Ztráta aktivity Y vázaných genů je tedy doprovázena mechanismem, který zabezpečuje přibližně stejné množství genových produktů na X chromosomech samce a samice (Marín et al. 2000). U různých skupin živočichů se mechanismus kompenzace genové dávky vyvinul odlišným způsobem. Nejlépe prostudovaný je především systém u placentálních savců a u octomilek (*Drosophila melanogaster*). Samčí X chromosom octomilek je hypertranskribovaný, zatímco u savců dochází k inaktivaci jednoho X chromosomu v buňkách samic (Muller 1947; Barr & Bertram 1949 ex Ohno 1967). Zatímco u vačnatců je vždy inaktivován otcovský X chromosom, u lidí je výběr náhodný a

různí se mezi jednotlivými tkáněmi (Chow & Brown 2003). Inaktivace není vždy zcela úplná, některým genům se daří z ní uniknout a jsou potom exprimovány na obou X chromosomech. Předpokladem je, že se jedná o geny účastnící se vývoje sexuálně dimorfních znaků samic (Carrel & Willard 2005). Inaktivační centrum, tzv. Xq nutné k tomu, aby mohl být X inaktivován, se u člověka nachází v proximální části chromosomu X. Inaktivace je řízena genem *Xist*, který je exprimován pouze na inaktivovaném X chromosomu. Tento gen zprostředkovává produkci *Xist* RNA, která se akumuluje po celé délce X chromosomu a dává tak signál k inaktivaci. Před započítím meiotického dělení je X reaktivován a zůstává aktivní během celé oogeneze až do rané embryogeneze (Marín et al. 2000). Dalším modelovým druhem pro studium kompenzace genové dávky je *Caenorhabditis elegans*, kde je snížena exprese na obou hermafroditických X chromosomech (Meyer 2000). Dostupná evidence naznačuje, že vznik mechanismů kompenzace genové dávky sahá poměrně hluboko do minulosti (např. u savců je vznik tohoto mechanismu odhadován na dobu před 170 miliony lety). Evoluce těchto mechanismů probíhala v jednotlivých skupinách nezávisle, o čemž svědčí i odlišnost genů kódujících komponenty kompenzace genové dávky v jednotlivých skupinách (Marín et al. 2000). Mimo dobře prostudovaných modelových druhů je informací o kompenzaci genové dávky poměrně málo. U ptáků není žádná evidence proteinů účastnících se těchto mechanismů, ale kvantifikací mRNA genů transkribovaných na Z se prokázalo, že zde nepochybně k mechanismu kompenzace genové dávky dochází. To, že jsou oba Z chromosomy samce replikovány synchronně, naznačuje, že nedochází k inaktivaci jednoho ze Z chromosomů jako u X chromosomů savců. Jakým mechanismem je tedy kompenzace genové dávky zajištěna, není dosud jasné (McQueen et al. 2001).

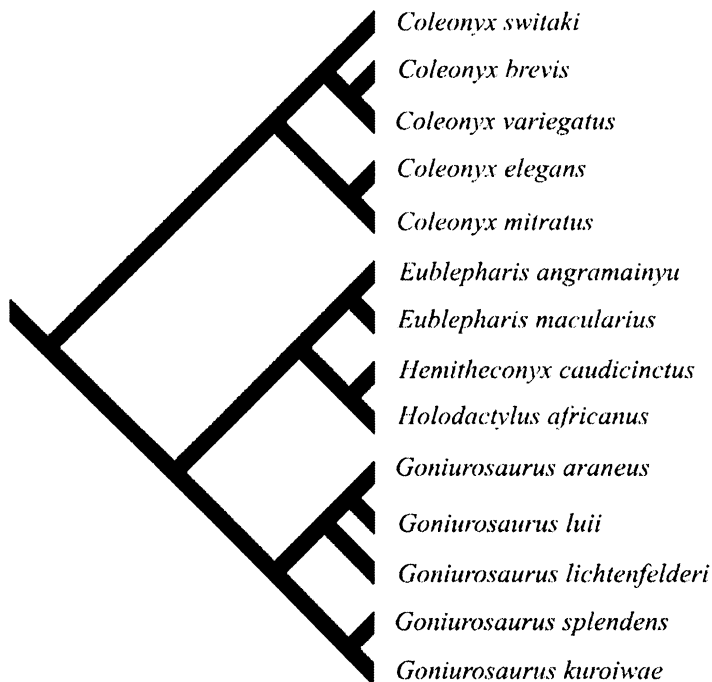
#### 4. Cytogenetika a cytotaxonomie plazů

Prozkoumanost jednotlivých hlavních linií plazů je značně nerovnoměrná v závislosti na dostupnosti studovaných taxonů i na možnostech aplikace běžných cytogenetických metod. Nicméně ze známých údajů je zřejmé, že jednotlivé hlavní vývojové linie plazů se ve variabilitě v počtu chromosomů různí. Skupina Testudines podle dostupných údajů vykazuje poměrně nízkou variabilitu v počtu a morfologii chromosomů (Norris et al. 2004). Fylogenetická pozice této skupiny je přitom sporná. Tradičně je zařazována jako anapsidní linie recentních plazů (Lee 1997; Wilkinson et al. 1997); výsledky některých studií založených na molekulárních datech (Zardoya & Meyer 1998; Hedges et al. 1999) však naznačují, že již zřejmě není otázkou, zda želvy jsou či nejsou diapsidní, ale kde je mezi diapsidy jejich pozice (Rippel 1999). Želvy mají diploidní počet chromosomů v rozsahu od 50 do 70 a variabilita spočívá zejména v počtu mikrochromosomů (Bickham et al. 1983; Bickham & Carr 1983). Makrochromosomy želv však vykazují značnou homologii s makrochromosomy hatérií (Norris et al. 2004). U obou druhů hatérií, které tvoří sesterskou linii k monofylu Squamata, je diploidní počet chromosomů  $2n = 36$ . Karyotyp je tvořen 14 páry makrochromosomů, jejichž morfologie je v podstatě srovnatelná s morfologií zástupců sedmi čeledí želv. Karyotyp zástupců čeledi Trionychidae a Carettochelyidae naopak vykazuje podstatnou chromosomální odlišnost ve srovnání s ostatními želvy i hatériemi (Norris et al. 2004). Tyto dvě čeledi jsou na základě chromosomálních a morfologických údajů označovány za nejodlišnější skupiny v rámci taxonu Testudines (Bickham et al. 1983). Přestože fylogenetické práce založené na molekulárních datech podporují monofylum Lepidosauria (tj. haterie a šupinatí plazi) (Townsend et al. 2004; Vidal & Hedges 2005; Fry et al. 2006), karyotyp harérií je poměrně značně odlišný od karyotypu většiny skupin šupinatých plazů (Norris et al. 2004). Narozdíl od želv a krokodýlů je u šupinatých plazů pozorována vyšší variabilita v počtu a morfologii chromosomů mezi jednotlivými skupinami (Norris et al. 2004). Byly zaznamenány počty chromosomů v rozsahu mezi 16 a 57 chromosomy v diploidním stavu (Olmo 2005). Uvnitř jednotlivých čeledí však mnohdy není rozptyl v počtech chromosomů nijak značný. Z celkového pohledu se ale i tak jedná o skupinu s poměrně vysokou variabilitou zejména v morfologii chromosomů (Olmo et al. 2002). Olmo et al. (2002) zaznamenali shody ve vzoru G-pruhů mezi želvy a krokodýly, zatímco šupinatí plazi v tomto vzoru vykazují značnou odlišnost. Nicméně i v rámci skupiny Squamata je vzor G-pruhů poměrně konzervativní. Zdá se tedy, že je tento typ struktury zastoupení

euchromatinu v karyotypu apomorfii šupinatých plazů. U krokodýlů se setkáváme se dvěma základními typy karyotypu. A to s karyotypem tvořeným převážně submetacentrickými a metacentrickými chromosomy a nebo karyotypem, jež sestává ze subtelocentrických a akrocentrických chromosomů. Původnější formou je patrně karyotyp tvořený submeta- a metacentrickými chromosomy a druhý typ karyotypu zřejmě vznikl prostřednictvím štěpení metacentrických chromosomů a evoluční fixace těchto událostí (Cohen & Gans 1970). Rozsah počtu chromosomů v diploidním stavu je v rámci této skupiny 30 až 42 (Olmo 2005). Stejně jako krokodýli jsou součástí archosaurní skupiny plazů také linie vedoucí k recentním ptákům. Rozsah v počtu chromosomů u recentních ptáků se pohybuje mezi 40 až 132 chromosomy v diploidním stavu (Shields 1982; Burt 2002). Typický ptačí karyotyp obsahuje přibližně 40 párů chromosomů, z toho je nejčastěji 30 párů mikrochromosomů (Burt 2002). Tento typ karyotypu se zřejmě vyvinul před 100–250 miliony lety. Recentní práce popisují, že mikrochromosomy tvoří přibližně 25 % ptačího genomu a nesou zhruba 50 % genů (Smith et al. 2000). Původní ptačí karyotyp zřejmě obsahoval přibližně 20 mikrochromosomů (Burt 2002) a akumulace dalších mikrochromosomů se mohla s největší pravděpodobností odehrát prostřednictvím chromosomových zlomů.

## 5. Stručný přehled o čeledi Eublepharidae

Čeď Eublepharidae je jednou z čeledí taxonu Gekkota a je pravděpodobně sesterskou skupinou všech zbývajících linií tohoto taxonu (Han et al. 2004). Gekkota je celosvětově rozšířená skupina ještěřů, zahrnující podle posledních studií 5 vývojových linií (Han et al. 2004). Časná kladogeneze uvnitř skupiny Gekkota je zřejmě asociována s rozpadem superkontinentu Pangea zhruba před 180 miliony lety. V této fázi došlo zřejmě k divergenci mezi laurasijskou skupinou Eublepharidae a gondwanskou skupinou Gekkonoidea (zbývajících žijících linií skupiny Gekkota). V gondwanské skupině pak došlo k časnému štěpení v souvislosti s rozpadem Gondwany na východní část (východogondwanské linie: Carphodactylidae + Diplodactylidae + Pygopodidae) a západní část (západogondwanská linie Gekkonidae). Divergence mezi žijícími rody uvnitř čeledi Eublepharidae a východních gondwanských liniích (Diplodactylidae, Pygopodidae, Carphodactylidae) jsou pravděpodobně hlubší než mezi rody uvnitř čeledi Gekkonidae (Han et al. 2004). Fylogenetické vztahy uvnitř čeledi Eublepharidae byly studovány na základě kombinace morfologických znaků a molekulárních údajů, tj. sekvence genů pro 12S a 16S rRNA (Starostová et al. 2005). Tento přístup však nerozřešil všechny fylogenetické vztahy mezi druhy čeledi; nerozřešeny zůstaly nejstarší divergence. Na rozřešení vztahu bazálních linií se totiž neshodují výsledky jednotlivých použitých fylogenetických metod (Bayesiánská analýza, Neighbor-joining, maximální věrohodnost a maximální parsimonie). Problémy dělá především rozřešení pozice druhu *Aeluroscalabotes felinus* (Starostová – ústní sdělení), což je druh, jež se nevyskytuje v souboru druhů vyšetřovaných cytogenetickými metodami v této práci. Po vyřazení tohoto druhu dává Bayesiánská analýza a metoda neighbor-joining stejné výsledky. Právě tento strom (Obr.1) jsem použila pro účely vizualizace výsledků získaných řešením této práce. Pozice druhu *Coleonyx switaki* ve fylogenetickém stromu byla určena podle práce Grismera (1988), kde publikoval kladogram rodu *Coleonyx* na základě morfologických a meristických znaků.



Obr.1 Fylogenetický strom skupiny Eublepharidae, upravený podle Starostová (ústní sdělení) a Grismer (1988) konstruovaný na základě kombinace morfologických a molakulárních dat.

Skupina Eublepharidae je nevelkou čeledí zahrnující 28 popsanych druhů nočních ještěřů. Všichni zástupci této čeledi mají svíslou zorničku, pohyblivá víčka, tenké prsty bez přísavných lamel a lámavý dorůstavý ocas. Mají invariantní snůšku, kladou dvojici vajec s pružnou kožovitou skořápkou. Jednotlivé druhy mají své areály rozšíření na africkém, asijském a severoamerickém kontinentu, což poukazuje na značné stáří celé skupiny. Rozšíření skupiny gekončků v Africe (rody *Holodactylus* a *Hemitheconyx*) se vysvětluje sekundární invazí z původně patrně laursijského areálu (Grismer 1988). Druhy této čeledi vykazují variabilitu ve velikosti těla, klimatických nárocích, ve velikosti genomu (Starostová et al. 2005) a také ve způsobu determinace pohlaví. Některé druhy mají pohlaví určeno geneticky a jiné teplotně (Viets et al. 1994; Bragg et al. 2000; Kratochvíl - vlastní data). Z tohoto důvodu je tato čeleď velmi vhodnou skupinou ke studiu pohlavních chromosomů a obecných evolučních principů souvisejících s určováním pohlaví. Typický „gekončí“ karyotyp je tvořen 32-46 chromosomy v diploidním stavu. Primárně je tvořen stupňovitou sérií akrocentrických chromosomů bez výrazného přechodu mezi makrochromosomy a mikrochromosomy. Velké metacentrické elementy nejsou časté a většina dvojramenných chromosomů, které byly pozorovány, má zřejmě subterminální centromeru (Gorman 1973).

V rámci čeledi Eublepharidae byl karyotyp do současnosti popsán pouze pro čtyři druhy (*Eublepharis macularius*  $2n = 38$ ; *Coleonyx variegatus*  $2n = 32$ ; *Coleonyx switaki*  $2n = 24$ ; *Goniurosaurus kuroiwae*  $2n = 24$ ).

Do souboru druhů studovaných v této práci byly zahrnuty všechny druhy čeledi Eublepharidae, zastoupené v chovech PřF UK. Jelikož se jedná o exotické plazy, výběr byl závislý především na dostupnosti zástupců jednotlivých druhů.

Jedním z druhů zahrnutých do diplomové práce je *Eublepharis macularius* (Blyth 1954); patrně nejlépe prozkoumaný zástupce celého taxonu Gekkota. Areál jeho rozšíření zahrnuje východní a jižní oblast Afghánistánu, Pákistán a severozápadní část Indie. Na těchto územích vyhledává stepní ekosystémy zasahující až do výšek 2500 m.n.m. Jedná se jeden z velkých druhů čeledi (109-158 mm; Anderson 1999). U tohoto druhu bylo dokumentováno teplotně určené pohlaví (Viets et al. 1993; Bragg et al. 2000; Rhen & Crews 2000); karyotyp je v diploidním stavu tvořen 38 akrocentrickými chromosomy, z toho je 6 párů mikrochromosomů (Gorman 1973; De Smet 1981).

Příbuzným druhem *E. macularius* je *Eublepharis angramainyu*, Anderson & Leviton 1966. S celkovou délkou těla téměř 30 cm je jedním s největších druhů. Do současnosti jsou tyto gekončící známí pouze z několika málo lokalit jihozápadního Iránu, severovýchodního Iráku a severovýchodní Sýrie (Seufer et al. 2005), přičemž zástupci syrské a iránské populace se liší ve zbarvení a některých folidotických znacích (Kratochvíl – stní sdělení); žádné oddělené formální taxony však nebyly popsány. Celkově existuje o tomto druhu jen málo informací, takže nebyl dosud popsán ani způsob určení pohlaví, ani karyotyp. Podle našich zkušeností je tento druh spíše TSD, přestože vzorek je dosud poměrně malý.

Mezi další asijské gekončíky patří zástupci rodu *Goniurosaurus*. V našich chovech je tento rod zastoupen čtyřmi druhy. Prvním z nich je *Goniurosaurus araneus*, Grismer, Viets & Boyle 1999. Dodnes je tento druh oficiálně známý pouze z typové lokality v severozápadní části Vietnamu (u hranic s Čínou), kde preferuje kopcovité oblasti s dostatečnou vzdušnou vlhkostí, většinou jsou nalézáni v blízkosti jeskyní. Jedná se o středně velkého gekona (115-130 mm; Seufer et al. 2005), bez popsání karyotypu stejně jako bez zjištěného způsobu determinace pohlaví.

*Goniurosaurus luii*, Grismer, Viets & Boyle 1999 je zřejmě nejčastěji chovaný druh tohoto rodu. Je známý z malého okrsku v jihozápadní části Číny (na druhé straně vietnamsko-čínské hranice než *G. araneus*). Podobně jako zástupci druhu *G. araneus* jsou i jedinci tohoto druhu nalézáni v blízkosti vápencových jeskyní tropického lesa (Seufer et al. 2005).

Velikost těla je také podobná jako u druhu *G. araneus*, karyotyp nebyl do současnosti popsán. Pohlaví je u tohoto druhu s největší pravděpodobností určeno genetickými faktory (Kratochvíl – vlastní data).

Třetím zástupcem rodu *Goniurosaurus* je *G. lichtenfelderi* (Mocquard 1897), který se vyskytuje na ostrově Kuining Chao a na pevnině na vietnamském pobřeží v blízkosti čínské hranice. Ostrov Kuining Chao je součástí rozsáhlého souostroví podobných ostrovů a je pravděpodobné, že areál *G. lichtenfelderi* zahrnuje více než jen jeden z těchto ostrovů (Seufer et al. 2005). Biotop, ve kterém se tyto gekoni vyskytují, je tvořený krasovými útvary tropického deštného lesa, jejichž četné štěrbiný jsou gekony využívány jako útočiště (Seufer et al. 2005). Maximální délka těla (od čenichu ke kořeni ocasu) je 105 mm, karyotyp nebyl popsán. Stejně jako u druhu *G. luii* bylo u tohoto druhu pozorováno GSD (Kratochvíl – vlastní data).

Posledním studovaným druhem tohoto rodu je *Goniurosaurus splendens* (Nakamura & Uéno 1959). Jsou to gekoni z ostrova Tokuno, který je součástí Japonského souostroví. Vyskytují se ve vápenatých jeskyních a v jejich blízkosti, ve štěrbinách a pod kameny na okraji tropického lesa a v zahradách (Seufer et al. 2005). Délka jejich těla (od čenichu ke kořeni ocasu) nepřevyšuje 77 mm a celkovým vzhledem jsou velmi podobní druhu *Goniurosaurus kuroiwaie* z ostrova Okinawa (Seufer et al. 2005), u něhož byl popsán karyotyp sestávající z  $2n = 24$  chromosomů, z toho 16 makrochromosomů (14 metacentrických, 2 akrocentrické) a 8 mikrochromosomů (Ota et al. 1987). Karyotyp byl determinován na základě studia dvou samců a šesti samic, vyšetřeno bylo 62 metafází a s použitím klasického cytogenetického barvení nebyly odhaleny žádné pohlavní rozdíly mezi karyotypy samic a samců. Zástupci druhu *G. splendens* dosud nebyli podrobena vyšetření karyotypu.

Mezi africké druhy čeledi Eublepharidae, zahrnuté do diplomové práce, patří jeden ze dvou druhů rodu *Hemitheconyx*, konkrétně *Hemitheconyx caudicinctus* (Duméril 1851). Areál rozšíření sahá od Senegalu po severní Kamerun, kde tyto gekoni vyhledávají stepní biotopy, popřípadě suchý les, kde se klima mění v závislosti na období sucha či dešťů. Jsou to velcí, robustní ještěři s délkou těla (od čenichu ke kořeni ocasu) přibližně 155 mm (Seufer et al. 2005). Bylo u nich dokumentováno teplotně závislé určení pohlaví (Bragg et al. 2000), karyotyp však nebyl popsán.

Druhým studovaným africkým druhem je *Holodactylus africanus*, Boettger 1893. Vyskytuje se ve východní části Afriky na území Somálska, Etiopie a Tanzanie, kde jsou zástupci tohoto druhu vázáni na oblasti suchých písčitých savan a polopouští s řídkou



vegetací. Je to druh adaptovaný k nočnímu částečně podzemnímu způsobu života v horkých a suchých oblastech. Tomu odpovídá i stavba těla. Délka těla nepřesahuje 83 mm, ocas je krátký (23 mm) a silný, stejně tak jako nohy sloužící k hrabání nor (Seufer et al. 2005). Není známý karyotyp ani typ determinace pohlaví.

Na americkém kontinentu jsou gekončící zastoupeni rodem *Coleonyx*, přičemž jedinci čtyř druhů jsou zastoupeni v našich chovech a byli začleněni do pokusů na této práci. Prvním z nich je *Coleonyx brevis*, Stejneger 1893. Areál rozšíření tohoto druhu začíná na jihovýchodě státu Nové Mexiko, přechází přes poušť Chihuahua, řeku Rio Grande a končí v severní části Mexika. Vyhledává aridní oblasti s řídkým porostem trávy a keřů. S délkou těla (od čenichu ke kořeni ocasu) 63 mm je nejmenším druhem celé čeledi (Seufer et al. 2005), bylo u něj dokumentováno genetické určení pohlaví (Viets et al. 1994), ale karyotyp dosud nebyl popsán.

*Coleonyx elegans*, Gray 1845 má oproti předchozímu druhu svůj areál rozšíření posunutý do jižních oblastí Mexika, do Belize, Guatemaly a El Salvadoru. Jedná se o pozemní druh ukrývající se ve spadaném listí nížinných oblastí tropického lesa, stejně tak jako v sušších křovinných biotopech (Seufer et al. 2005). Je to největší druh rodu *Coleonyx* dosahující délky těla (od čenich ke kořeni ocasu) 108 mm (Seufer et al. 2005), bylo u něj pozorováno genetické určení pohlaví (Kratochvíl – vlastní data); karyotyp nebyl popsán.

Celkovým vzhledem je předchozímu popsanému druhu velmi podobný *Coleonyx mitratus* (Peters 1893), rozšířený od jižní Guatemaly, přes El Salvador, Honduras, Nikaraguu a Kostariku až do severních oblastí Panamy. Obývá tropické a subtropické deštné lesy, ale i suché lesy zejména podél jejich okrajů. Na rozdíl od druhu *Coleonyx elegans* je s maximální délkou těla 91 mm druhem menším (Seufer et al. 2005), bylo u něj také zaznamenáno genetické určení pohlaví (Bragg et al. 2000) a karyotyp zatím chybí.

Posledním studovaným druhem je *Coleonyx variegatus*, rozšířený na jihozápadě USA (Utah, Nevada, Arizona, Nové Mexiko a Kalifornie), kde jsou vázáni na suché biotopy. Maximální délka těla (bez ocasu) je 55-77 mm (Seufer et al. 2005) a stejně jako u předchozích druhů rodu *Coleonyx* bylo u tohoto druhu dokumentováno geneticky určené pohlaví (Viets et al. 1994). *Coleonyx variegatus* je jedním ze čtyř druhů čeledi Eublepharidae s popsaným karyotypem. Ten se vyznačuje přítomností 32 akrocentrických chromosomů (Matthey 1933), pohlavní chromosomy však nebyly studovány, jelikož karyologicky byl vyšetřován pouze samec. Čtvrtým druhem s popsaným karyotypem je *Coleonyx switaki*, který ale není zastoupen v našich chovech a nebyl tedy v této práci studován. Pro tento druh byl na základě vyšetření 39 střevních buněk z jednoho samce popsán karyotyp s diploidním

počtem chromosomů  $2n = 24$ , přičemž 22 chromosomů je metacentrických a 2 akrocentrické a karyotyp neobsahuje žádné mikrochromosomy (Murphy 1974).

Tab.1 Údaje o TSD / GSD a popsáném kyryotypu pro druhy čeledi Eublepharidae začleněné do diplomové práce.

| druh                                | TSD / GSD | zdroj   | popis karyotypu | zdroj                     |
|-------------------------------------|-----------|---|-----------------|---------------------------|
| <i>Coleonyx brevis</i>              | GSD       | Viets et al. 1994                                       | ?               |                           |
| <i>Coleonyx elegans</i>             | GSD       | Kratochvíl (vlastní data)                               | ?               |                           |
| <i>Coleonyx mitratus</i>            | GSD       | Bragg et al. 2000                                       | ?               |                           |
| <i>Coleonyx variegatus</i>          | GSD       | Viets et al. 1994                                       | $2n = 32$       | Matthey 1933              |
| <i>Hemitheconyx caudicinctus</i>    | TSD       | Bragg et al. 2000                                       | ?               |                           |
| <i>Holodactylus africanus</i>       | ?         |   | ?               |                           |
| <i>Eublepharis angramainyu</i>      | TSD       | Kratochvíl (vlastní data)                               | ?               |                           |
| <i>Eublepharis macularius</i>       | TSD       | Viets et al. 1993; Bragg et al. 2000; Rhen & Crews 2000 | $2n = 38$       | Gorman 1973; De Smet 1981 |
| <i>Goniurosaurus araneus</i>        | ?         |   | ?               |                           |
| <i>Goniurosaurus lichtenfelderi</i> | GSD       | Kratochvíl (vlastní data)                               | ?               |                           |
| <i>Goniurosaurus luii</i>           | GSD       | Kratochvíl (vlastní data)                               | ?               |                           |
| <i>Goniurosaurus splendens</i>      | ?         |   | ?               |                           |

## 2. Cíl práce

Provést základní popis karyotypů a dalších chromosomových charakteristik pro jednotlivé druhy čeledi Eublepharidae dostupnými cytogenetickými metodami a

a) zhodnotit vhodnost použitých preparačních technik chromosomů u dané skupiny zejména s ohledem na nedestruktivnost postupů

b) kombinací s poznanými fylogenetickými vztahy a zjištěnými karyotypovými poměry rekonstruovat možný trend diferenciací karyotypů

c) testovat hypotézu, zda objevené GSD mechanismy u zástupců rodu *Coleonyx* a *Goniurosaurus* souvisí s diferenciací heteromorfních pohlavních chromosomů.

### 3. Materiál a metodika

#### 1. Materiál

Do studie bylo zahrnuto 94 jedinců dvanácti studovaných druhů čeledi Eublepharidae (Gekkota; Squamata), jmenovitě: *Coleonyx brevis*, *C. elegans*, *C. mitratus*, *C. variegatus*, *Eublepharis angramainyu*, *E. macularius*, *Goniurosaurus lichtenfelderi*, *G. luii*, *G. splendens*, *Hemitheconyx caudicinctus*, *Holodactylus africanus*.

Všechna zvířata použitá v této studii pocházejí z akreditovaného chovu (číslo akreditace: 18847/2003-1020) a byla chována ve standardních podmínkách. Zvířata byla chována při konstantní teplotě (27 °C) a vlhkosti (50-60%). Byla umístěna v teráriích odpovídajících normám pro chov plazů, jejichž velikost závisí na velikosti a počtu jedinců v nich umístěných. Terária byla opatřena vhodným substrátem a dostatečným množstvím úkrytů, podle nároků daného druhu. Všechna zvířata byla pravidelně krmena přiměřeným množstvím krmného hmyzu a spolu s potravou a vodou jim byly dodávány potřebné vitamíny a minerály. V závislosti na paralelních experimentech prováděných na studovaných zvířatech byli někteří jedinci začleněni do reprodukce.

Tab.2 Přehled studovaných druhů; počty použitých jedinců a hodnocených metafází

| druh                                | počet samic | počet hodnocených metafází | počet samců | počet hodnocených metafází |
|-------------------------------------|-------------|----------------------------|-------------|----------------------------|
| <i>Coleonyx brevis</i>              | 1           | 3                          | 0           | 0                          |
| <i>Coleonyx elegans</i>             | 8           | 21                         | 13          | 56                         |
| <i>Coleonyx mitratus</i>            | 8           | 9                          | 4           | 6                          |
| <i>Coleonyx variegatus</i>          | 1           | 2                          | 1           | 4                          |
| <i>Hemitheconyx caudicinctus</i>    | 3           | 9                          | 3           | 4                          |
| <i>Holodactylus africanus</i>       | 1           | 2                          | 1           | 2                          |
| <i>Eublepharis angramainyu</i>      | 4           | 17                         | 2           | 2                          |
| <i>Eublepharis macularius</i>       | 5           | 11                         | 5           | 6                          |
| <i>Goniurosaurus araneus</i>        | 2           | 4                          | 2           | 3                          |
| <i>Goniurosaurus lichtenfelderi</i> | 3           | 6                          | 2           | 2                          |
| <i>Goniurosaurus luii</i>           | 9           | 24                         | 10          | 22                         |
| <i>Goniurosaurus splendens</i>      | 4           | 12                         | 2           | 10                         |

## 2. Příprava chromosomových preparátů

Jelikož pro drobné šupinaté plazy neexistuje žádná standardizovaná metoda pro přípravu chromosomových preparátů, jako je například preparace kostní dřene z drobných druhů savců, bylo nutné vyzkoušet několik různých metod. Hlavním kritériem pro výběr metod bylo, aby tyto techniky byly pokud možno nedestruktivní k pokusným zvířatům, jelikož tito jedinci byli zároveň zařazeni do jiných pokusů nebo se jednalo o zástupce poměrně vzácných a ohrožených druhů.

### *a) kultivace fibroblastů*

Primární kultura fibroblastů může být založena z malého vzorku tkáně odebraného dospělému zvířeti. Mohou být použity všechny typy tkání bohaté na fibroblasty (v tomto případě kousek svalů z ocasu). Při kultivaci fibroblastů je využito schopnosti nediferencovaných buněk se za vhodných podmínek opakovaně dělit (Popescu et al. 2000).

Práce probíhala ve sterilním aseptickém boxu („flow-box“) a byl brán zřetel taktéž na opakovanou sterilizaci rukou během přípravy kultur. Špička ocasu byla sterilně uštěpena a povrchově vysterilizována opláchnutím v 70 % etanolu, 1 % roztoku chlornanu sodného a opět v 70 % etanolu a přenesena na Petriho misku s kompletním kultivačním médiem. To bylo složeno z 20 % roztoku telecího fetálního séra (Baria; S 0125) v komerčně dodávaném médiu L-15 (Sigma-Aldrich; L5520), s přidáním 0,5 % antibiotické-antimykotické směsi (Sigma-Aldrich; A5955) a 1 % L-glutaminu (Sigma-Aldrich; G7513). Toto médium musí být před použitím vždy přefiltrováno přes speciální filtry (Millex Millipore; SLGP R 25 LS). V kultivačním médiu byla tkáň rozstříhána pomocí sterilních nástrojů na kousky cca 2 mm<sup>3</sup> velké. Ty pak byly přeneseny sterilní očkovací kličkou na dno kultivační lahvičky (Nunc; 163371) a bylo přidáno 0,7 ml kompletního kultivačního média a kultivace pak probíhala v některých případech při teplotě 28 °C, později však bylo za vhodnější teplotu stanoveno 30 °C. Druhý den bylo médium doplněno na 3 ml a vyměňováno každý třetí den. Současně byla pod inverzním mikroskopem prováděna kontrola růstu buněk. Přibližně po třech až čtyřech týdnech byly kultury sklizeny: do kultivační lahvičky byly přikápnuty dvě kapky 0,1% roztoku kolchicinu (Serva; 77120) na dobu 45 minut. Poté bylo médium i s kolchicinem odsáto a tkáň byla opláchnuta 2 ml PBS pufru, nakonec byl přidán 1 ml PBS pufru a 0,7 ml 1 % roztoku trypsinu. Doba působení trypsinu byla nejdéle 2 minuty a jeho účinek byl zastaven přidáním kultivačního média. Očkovací kličkou byly ze dna kultivační lahvičky oškrábány fibroblasty, které rostou přichycené ke speciálně upravenému dnu kultivační lahvičky a

spolu s médiem přeneseny do centrifugační zkumavky o objemu 10 ml. Po centrifugaci (10 minut / 1200 otáček) byl odsát supernatant a buňky byly hypotonizovány 10 minut v 5 ml 0,075M KCl. Po centrifugaci byl odsát supernatant a probíhala fixace 20 minut ve fixační směsi (methanol: kyselina octová, 3:1) při 4 °C. Fixace se opakovala třikrát a poté byla suspenze nakapána na podložní sklo.

#### *b) kultivace leukocytů*

Metoda kultivace leukocytů je založená na mitotickém působení lektinu fytohemaglutininu na T-lymfocytární populace buněk v krvi. Tato metoda se standardně používá, je-li možné odebrat ze zvířete větší množství krve (více než 1 ml) a v takovém případě se kultivuje pouze leukocytární složka krve vyizolovaná pomocí centrifugace (Freshney 2005). Je to ovšem i metoda používaná ke získání chromosomových preparátů z drobných živočichů, a v takovémto případě se kultivuje standardně přibližně 100 µl plné krve (Ezaz et al. 2005).

V této práci byla metoda použita i na velmi malé druhy gekončků, ze kterých není možné odebrat více než 30 µl krve. Krev byla odebrána do sterilní heparinované injekční stříkačky a ve sterilním „flow-boxu“ byla přenesena do 5 ml kompletního kultivačního média. Kompletní kultivační médium pro kultivaci leukocytů se skládá z 10 % roztoku telecího fetálního séra (Baria; S 0125) v komerčně dodávaném médiu T199 (Sigma-Aldrich; M2154) s přidáním 0,5 % antibiotické - antimykotické směsi (Sigma-Aldrich; A5955), 1 % roztoku kynamycinu (Sigma-Aldrich; K1377), 0,2 % fytohemaglutininu HA 15 (Biomedica; H654710), 1 % lipopolysacharidu (Sigma-Aldrich; L4005) a 0,175 µl 10 % roztoku mercaptoetanolu (ředí se destilovanou vodou) / 100 ml kompletního média. Po centrifugaci (10 minut / 1200 otáček) byl sediment odsát sterilní Pasteurovou pipetou a přenesen do nové centrifugační zkumavky s kultivačním médiem. Tento krok se označuje „omytí buněk“. Obě zkumavky pak byly položeny šikmo na podložku a umístěny do termostatu nastaveného na 30 °C. Po sedmi dnech byly kultury sklizeny. Do každé kultury bylo přidáno 5 µl 0,1 % roztoku kolchicinu. Jako optimální doba působení kolchicinu bylo zjištěno 45 minut. Po centrifugaci byl odsát supernatant a sediment byl resuspendován v 5 ml hypotonického roztoku (0,075M KCl). Doba hypotonie byla 10 minut. Po opětovné centrifugaci probíhala třikrát po sobě fixace metanol-octovou fixací při 4 °C a následovalo kapání suspenzí na podložní sklo.

### c) *přímá preparace z regenerujícího ocasu*

Tato metoda je založena na mnohonásobném dělení buněk během regenerace v místě poškození tkáně. Umožňuje pracovat s poměrně malým množstvím odebraného materiálu, je nedestruktivní a úsporná ke spotřebovanému laboratornímu materiálu. Jedná se o metodu preparace chromosomů z regenerující ploutve ryb vyvinutou Völkerem (2006) pro drobné druhy halančíků (Notobranchiidae), přepracovanou následně pro použití u drobných druhů plazů s regenerujícím ocasem.

Zvířeti byla uštěržena špička ocasu, jakmile tkáň začala viditelně regenerovat, bylo odebráno malé množství této regenerující tkáně (cca 2 mm<sup>3</sup>). Tato tkáň byla umístěna do Petriho misky s roztokem NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, NaHCO<sub>3</sub> a kolchicinu (zásobní roztok: 7,48 g NaCl + 0,18 g KCl + 0,2 g CaCl<sub>2</sub> + 0,016 g NaHCO<sub>3</sub> / 1000 ml destilované vody; na 100 ml kultivačního roztoku použít 14,3 ml zásobního roztoku + 85,7 ml destilované vody + 0,025 g kolchicinu). V tomto roztoku se tkáň inkubovala při teplotách optimálních pro život zvířete (tzn. ve 27-28 °C pro gekončíky). Doba inkubace musela být zjištěna experimentálně, jelikož během inkubace působí na tkáň současně kolchicin i hypotonický roztok. Pro gekončíky byla tato doba stanovena na 45 min. Po uplynutí této doby bylo k inkubačnímu roztoku přidáno malé množství čerstvě připravené fixace a Petriho miska se vzorkem byla přenesena do 4 °C. Po 30 minutách byl roztok vyměněn za čerstvou fixaci a tento krok se opakoval ještě dvakrát. Následně byla tkáň přenesena na jemné kovové sítko umístěné na čisté Petriho misce. Tkáň bylo třeba zakápnout 40 % kyselinou octovou a zahnutou pinzетkou byla přes sítko rozdrcena na jednotlivé buňky. Vzniklá suspenze byla umístěna do mikrozkuřavky typu Eppendorf. Vyčištěná podložní skla byla připravena na topné plotýnce nastavené na 45 °C. Na tato skla bylo kapáno vždy 40 µl suspenze do jednoho místa, po 20 vteřinách byl zbytek kapky odsát a takovýmto způsobem byly na jedno sklo umístěny tři kapky.

### d) *přímá preparace (varlata, střevo, kostní dřev)*

Během práce na tomto tématu bylo v několika případech přistoupeno také k metodám přímé preparace chromosomů, jejichž nutnou součástí bylo usmrcení studovaných jedinců. To bylo ve všech případech provedeno osobou, která je nositelem oprávnění k těmto úkonům. Celkově byli usmrceni 4 samci (preparace z kostní dřevě, střeva a varlat) a 3 samice (preparace z kostní dřevě a střeva) druhu *Coleonyx elegans*.

#### *Preparace chromosomů z kostní dřevě:*

Zvířeti byl intraperitoneálně aplikován 0,1 % roztok kolchicinu v dávce 10 µl na 1 g hmotnosti. Po hodině bylo zvíře usmrceno cervikální dislokací. Byly vypreparovány stehenní

kosti, které byly propláchnuty pomocí tenké jehly (inzulinka) hypotonickým roztokem (0,75M KCl) do připravené zkumavky, suspenze byla doplněna hypotonickým roztokem do 5 ml a doba hypotonie byla 10 minut. Po centrifugaci následovala třikrát opakovaná fixace po 20 minutách při 4 °C. Poté následovalo kapání na sklo klasickým způsobem.

#### *Preparace chromosomů z tenkého střeva:*

Po hodinovém působení kolchicinu, jež byl aplikován intraperitoneálně a po usmrcení zvířete, bylo vypreparováno tenké střevo, jež bylo odstřiženo na jedné straně od duodena a na druhé od tlustého střeva. Střevo bylo podélně rozstřiženo a vloženo do 10 ml hypotonického roztoku na dobu 15 minut. Poté byl hypotonický roztok vyměněn za fixaci. Celková doba fixace trvala přibližně 2 hodiny, přičemž fixativum bylo několikrát vyměněno. Konečně bylo fixativum nahrazeno 45 % kyselinou octovou, v níž bylo střevo ponecháno přes noc. Druhý den bylo střevo přeneseno na podložní sklo, zakápnuto kyselinou octovou z původní zkumavky a ostrým skalpelem byl naplocho oškrábán vnitřní epitel střeva po celé jeho ploše. Zbytek střeva byl odstraněn a suspenze vytvořená na podložním skle z něj byla splachována 45 % kyselinou octovou do původní zkumavky, dokud nebylo sklo čisté. Po centrifugaci (1200 otáček/10 minut) byla kyselina octová nahrazena čerstvě připravenou fixací a po několika výměnách fixativa kapána na podložní sklo standardním způsobem. Celá metodika je modifikací protokolu, jež popsali King & Rofe (1976).

#### *Preparace chromosomů z varlat:*

Po hodinovém působení kolchicinu byla vypreparovaná varlata rozdrčena na jemném kovovém sítku v kapce hypotonického roztoku. Takto vzniklá směs buněk byla přenesena do centrifugační zkumavky a doplněna hypotonikem na 5 ml. Hypotonie trvala 10 minut. Poté byla suspenze centrifugována (1200 otáček / 10 minut) a hypotonikum nahrazeno fixací; ta se měnila třikrát vždy po 20 minutách a následně byla suspenze v optimální hustotě kapána na podložní skla stejným způsobem jako ve všech předchozích metodách.

#### *Modifikace přímé preparace chromosomů pro zvířata čerstvě po smrti:*

Všechny jmenované metody přímé preparace byly také v několika případech modifikovány pro použití u zvířat krátce po smrti (bez předchozího ošetření kolchicinem). V případě kostní dřeně byly kosti propláchnuty fyziologickým roztokem (0,67 % NaCl), do něj bylo umístěno i tenké střevo po preparaci a stejně tak v něm byla rozdrčena vypreparovaná varlata. Do takto vzniklých suspenzí byl přidán 0,1 % roztok kolchicinu v objemu 1  $\mu$ l / 1 ml suspenze na 45 minut. Po centrifugaci byl fyziologický roztok s kolchicinem nahrazen hypotonickým roztokem na 10 minut a následovala trojí fixace po 20 minutách při 4 °C a kapání na podložní sklo popsaným způsobem.



### 3. Barvení

#### *a) konvenční barvení*

*Barvení chromosomů Giemsovým barvivem:*

Principem barvení chromosomů Giemsovým barvivem je schopnost tohoto barviva vázat se na fosfátovou skupinu DNA, a tím vizualizovat chromosomy v metafázi buněčného dělení. Před barvením je třeba nechat preparáty zcela uschnout. Barvení se provádí 10 minut v 3 % roztoku Giemsy (Merck; 1092040500) v Sørensenově pufru (4,5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 4,7 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  / 1000 ml destilované vody, pH = 6,8). Poté jsou preparáty důkladně opláchnuty destilovanou vodou.

#### *b) diferenciální barvení*

Diferenciální barvení vyvolává na chromosomech příčné sekvence proužků s různou intenzitou zbarvení. Vzniklé vzory jsou dědičné, stabilní a reprodukovatelné a umožňují mimo jiné identifikovat homologické chromosomy, správně sestavit chromosomové páry a srovnávat karyotypy mezi jednotlivými druhy.

*C- pruhování:*

Toto barvení je používáno k vizualizaci konstitutivního heterochromatinu na chromosomech, který je většinou lokalizovaný v centromerických oblastech, v pohlavních chromosomech a někdy tvoří celá ramena autosomů. Je to metoda založená na postupném působení kyseliny, zásady a renaturaci DNA v pufru při vyšších teplotách. Tímto způsobem je selektivně odstraňován euchromatin a výsledně se intenzivněji barví konstitutivní heterochromatin. Na chromosomy na skle necháme působit 0,2 N HCl, (nejčastěji 20 minut), potom jsou preparáty opláchnuty destilovanou vodou. Po jejich zaschnutí ponoříme skla do denaturačního roztoku hydroxidu barnatého (5,3 g  $\text{Ba}(\text{OH})_2$  / 100 ml destilované vody) vytemperovaného na 33 °C (doba působení se zjišťuje experimentálně; nejčastěji však v rozmezí 3 – 6 minut). Poté skla opláchneme v 0,2 N HCl, opláchneme destilovanou vodou a necháme uschnout. Dále skla ponoříme do renaturačního pufru 2x SSC (17,53 g NaCl + 8,82 g citronanu sodného / 500 ml destilované vody) vytemperovaného na 65 °C. Doba inkubace chromosomů v 2x SSC je třeba zjistit experimentálně; pro plazy je doporučována jedna hodina. Po opláchnutí skel destilovanou vodou a jejich zaschnutí barvíme 10 minut Giemsou. Postup je modifikací protokolu popsáno v Haaf a Schmid (1984). Metoda C- pruhování byla testována pro všechny studované druhy gekončků s cílem získat specifický vzor na chromosomech, jehož by bylo využito při sestavování karyotypu.

### *Vizualizace organizátorů jádérka:*

Mezi použité metodiky diferenciálního barvení patří také metody sloužící k identifikaci oblastí genů ribosomální DNA, tzv. organizátorů jádérka (NOR, obecně užívaná zkratka z anglického termínu „nucleolar organizer region“). Jsou to místa důležitých a evolučně konzervativních genů; změny jejich polohy a počtu tedy nesou významnou fylogenetickou informaci (Phillips et al. 1989). Nukleolární organizátory leží v místech tzv. sekundárních achromatických konstrikcí nebo v místech, která zůstávají po obarvení Giemsovým barvivem nezbarvená v důsledku odlišné konfigurace a spiralizace.

### Barvení stříbrem:

Tato metoda využívá vlastnosti oblastí organizátorů jádérka vázat na sebe stříbrné ionty. Stříbrné ionty však nevizualizují přímo úseky ribosomální DNA, ale komplex residuálních kyselých proteinů, které na ni zůstaly navázány po expresi hlavních ribosomálních genů v předcházející interfázi. Jedná se tedy v zásadě o zviditelnění aktivních genů (např. Goodpasture & Bloom 1975; Howell et al. 1975). Na preparát předem obarvený Giemsou jsou nakápnuty 2 kapky 1 % roztoku želatiny (1g želatiny / 100 ml destilované vody + 2 ml kyseliny mravenčí) a 4 kapky 50 % roztoku  $\text{AgNO}_3$ . Preparát se přikryje krycím sklem o rozměrech 24 x 60 mm a inkubuje se na topné plotně při 40 °C. Vývoj barvení se kontroluje vizuálně; optimální je, když roztok pod krycím sklem získá tmavší cibulovou barvu. Poté se krycí sklo spláchne vodou, preparát se důkladně opláchne destilovanou vodou a nechá uschnout. Metodika je převzata z práce Howell and Black (1981).

### Fluorescenční diferenciální barvení pomocí Chromomycinu A3:

Chromomycin A3 je antibiotikum, které se přednostně váže na úseky bohaté GC bázemi (Behr et al. 1969), konkrétně do malého žlábků DNA (Gao & Patel 1989). Na chromosomech vyšších obratlovců bylo prokázáno, že tyto fluorochromy vizualizují R-pruhy, tj. pruhy intenzitou zbarvení reverzní ke G-pruhům, které se dají získat digescí trypsinem (van de Sande et al. 1977). Schmid a Guttenbach (1988) zjistili, že u savců a ptáků se po aplikaci těchto fluorochromů tvoří klasické R-pruhy, zatímco u ryb a obojživelníků se vizualizují pouze místa, kde lze nalézt organizátory jádérka po barvení stříbrem. U některých skupin plazů lze pak tímto barvením vizualizovat NORy a u jiných získat R-pruhy nebo jejich náznaky. Intenzita zbarvení GC specifických signálů se zvýší a doba fluorescence se prodlouží kombinací s barvením chromosomů AT specificky vázajícími se fluoreskujícími látkami typu DAPI nebo nefluoreskujícími látkami jako je metylénová zeleň (Schnedl et al. 1977).

Postup:

Skla je třeba odvodnit vzestupnou řadou vymražených etanolů (70 %, 90 %, 100 %). Dále probíhá inkubace skel v McIlvainově pufru s  $MgCl_2$  (1000 ml McIlvainova pufru je připraveno smísením 823,5 ml 0,2 M  $Na_2HPO_4$ , 176,5 ml 0,1 M kyseliny citrónové doplněno do 1000 ml; pro přípravu McIlvainova pufru s  $MgCl_2$  je třeba na 100 ml McIlvainova pufru přidat 0,2 g  $MgCl_2$ , pH = 7) 10 minut při laboratorní teplotě. Dále je třeba pracovat v šeru, přímé světlo snižuje intenzitu výsledných signálů. Sklo se umístí do vlhké komůrky a napipetuje se na něj 150  $\mu$ l roztoku Chromomycinu A3 (Serva; 17148.01; běžně užívaná koncentrace: 5 mg/10 ml McIlvainova pufru; v této práci byla použita i 5x vyšší koncentrace). Preparát se překryje krycím sklem po celé délce a Chromomycin A3 se nechá působit 15 minut (v této práci byla v některých experimentech doba působení zvýšena až na 2 hodiny). Po odstranění krycího skla se preparát krátce opláchne v McIlvainově pufru a umístí se do roztoku metylénové zeleně (Serva; 29295.01; 35 mg metylénové zeleně / 100 ml McIlvain). Doba působení je 15 minut. Následuje opět oplach v McIlvainově pufru a na sklo je pipetou přidán 1 ml roztoku DAPI (5  $\mu$ l DAPI / 1 ml McIlvain) a opět je překryto krycím sklem. Doba syčení je 20 minut. Po opláchnutí v McIlvainově pufru je na preparát osušený filtračním papírem nanášeno 40  $\mu$ l montovacího média (směs glycerolu s 2,5 % propylgalátu) a preparát je překryt krycím sklem, jehož okraje se lemuje lakem, aby nedošlo k vysychání a smísení montovacího média s imerzním olejem při mikroskopování. Celý postup je modifikací protokolu popsaného v Sola et al. (1992).

#### 4. Hybridizační techniky

*Hybridizace s pantelomerickou sondou StarFISH Cambio:*

Jedná se o typ fluorescenční *in situ* hybridizace, kdy je detekována specifická sekvence nukleotidů DNA či mRNA pomocí komplementární oligonukleotidové či polynukleotidové označené sondy. Při detekci telomerických sekvencí se jedná o pro obratlovce konzervovaný motiv (TTAGGG) $_n$ . Fluorescenční *in situ* hybridizace je metoda, při které dochází k hybridizaci DNA sondy s inkorporovanými fluorescenčně značenými nukleotidy s chromosomy či s jádry obarvenými jiným fluorochromem viditelným v jiné části spektra.

Postup:

Suchá skla se ponoří na 30-60 minut do roztoku 2x SSC pufru (viz. výše) ve vodní lázni vytemperované na 37 °C. Následně se skla odvodní vzestupnou řadou etanolů.

Skla prochází vymraženým 70 %, 90 % a 100 % etanolem, vždy po 2 minutách. Suchá skla se umístí na topnou destičku nebo do speciálního termobločku na 15 minut při 65 °C. Tento krok zajistí lepší přilnavost chromosomového materiálu při další manipulaci. Po vychladnutí se skla umístí na 10 minut do acetonu a následně se nechají uschnout. 200 µl roztoku RNasy (TopBio; D106) v 2x SSC o koncentraci 100 µg/ml se napipetuje na sklo a překryje krycím sklíčkem o rozměru 24 x 60 mm. Takto skla inkubujeme 1 hodinu při 37 °C. Tento krok je nezbytný k odstranění RNA, která by mohla způsobovat nespecifické pozadí při prohlížení a fotografování výsledných preparátů. Následuje odstranění krycího skla a dva oplachy po 5 minutách v 2x SSC za laboratorní teploty. Dalším krokem je inkubace skel v PBS pufru 5 minut za laboratorní teploty (PBS: 5g NaCl + 1,125g KCl + 1,125g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0,72g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> v 500 ml destilované vody). Smícháme 1 ml 10 mM HCl (která musí být uchovávána v lednici) s 0,5 µl pepsinu (AppliChem; A4289; koncentrace zásobního roztoku je 1 mg/ml), promícháme a na každé sklo napipetujeme 200 µl, překryjeme krycím sklem a necháme působit 2 minuty. Je velmi důležité, aby tato doba nebyla překročena. Následuje inkubace 5 minut v PBS a série vymražených etanolů, kdy jsou skla v 70 %, 90 %, 100 % vymraženém etanolu vždy 2 minuty. Když jsou skla suchá, následuje denaturace v 70 % deionizovaném formamidu (Sigma-Aldrich; F7503; ředí se puftrem 2x SSC), 2 minuty při 70 °C. Ihned po denuraci jsou skla umístěna do vymraženého 70 % etanolu na 2 minuty a následuje opět etanolová série. Skla se nechají uschnout. Od tohoto kroku je třeba pracovat v šeru, následuje totiž příprava sondy a hybridizace. Komerčně vyráběná telomerická sonda (Cambio; 1696-Cy3-02), jež se uchovává při -20 °C se předejde v termostatu 5 minut při 37 °C a promíchá se. 11,5 µl hybridizačního pufru (Cambio; 1696-Cy3-02) se smísí s 1 µl koncentrované sondy. Takto připravenou sondu je třeba denaturovat 10 minut v 85 °C a poté ihned umístit do ledové tříště. Celý objem se nanese na sklo, překryje se krycím sklem, jehož okraje se zalepí pomocí speciálního lepidla (Marabu Fixogum Dispenser), aby se roztok sondy během hybridizace neodpařoval. Hybridizace pak probíhá 16 hod při 36 °C ve vlhké komůrce a ve tmě. Po hybridizaci se odstraní krycí sklo a následují dva oplachy po 5 minutách v 2x SSC při 37 °C a další tři oplachy po 3 minutách v 0,5x SSC při 42 °C. Sklo nesmí po tomto postupném opláchnutí zcela uschnout. Následuje samotná detekce, kdy se na částečně usušené preparáty napipetuje 40 µl směsi DAPI (detekční souprava pro sondy značené FIC a Cy3 pro přímé pozorování; Cambio; 1124-MD-50). Skla se překryjí krycím sklem a rámují pomocí laku. Takto připravené preparáty je možné skladovat v lednici a prohlížet pod mikroskopem. Sonda byla v mém případě značena červenou fluorescenční barvou Cy3; pozorování obou použitých fluorochromů bylo prováděno s příslušným filtrem.

Metoda hybridizace telomerickou sondou, fluorescenční diferenciální barvení pomocí Chromomycinu A3 nebo impregnace stříbrem byly přednostně používány u druhu *Coleonyx elegans*, jelikož byl běžným barvením Giemsovým barvivem v karyotypu samců tohoto druhu objeven velký metacentrický chromosom (karyotyp samic se skládá jen z akrocentrických chromosomů). Jmenované metodiky byly použity s cílem odhalit původ tohoto chromosomu.

#### *Komparativní genomová hybridizace:*

Cílem komparativní genomové hybridizace je vizualizace rozdílů v genomech dvou jedinců opačného pohlaví, případně dvou příbuzných druhů či jejich hybridů (Pinkel et al. 1988; Traut & Marec 1996). Metoda spočívá v přípravě celogenomové sondy a její hybridizaci s mitotickými chromosomy stejného jedince (jedince stejného pohlaví, druhu atd.) za použití kompetitorové DNA (jež hybridizuje se všemi shodnými úseky chromosomální DNA) vyizolované z jedince opačného pohlaví, popřípadě druhu. Touto metodou se tedy dají odhalit pohlavní chromosomy, přestože běžným barvením jsou neidentifikovatelné, jako rozdíl v genomu samce a samice vizualizovaný specificky navázanou sondou (Pinkel et al. 1988; Ezaz et al. 2005). V této práci byla komparativní genomová hybridizace použita u druhu *Coleonyx elegans*, kde samci mají v karyotypu velký metacentrický chromosom (pravděpodobně Y chromosom fúzovaný s autosomem), s cílem vizualizovat pohlavně specifickou oblast na tomto chromosomu.

#### Postup komparativní genomové hybridizace:

Před samotnou hybridizací bylo potřeba vyizolovat DNA, která musí být pro použití v této metodě ve vysoké koncentraci a kvalitě. DNA byla proto izolována metodou fenol – chloroform – isoamylalkohol. Izolace byla prováděna opakovaně z tkání 3 samic a 3 samců usmrcených v předchozích experimentech (preparace chromosomů z kostní dřeně, varlat a střeva) a uchovávaných v 96% čistém etanolu. Jako výchozí materiál pro izolaci byla použita svalová tkáň a tkáň jater. Přibližně 100 mg tkáně bylo umístěno do 1 ml TNES-U pufru (10 mM Tris-HCL + 125 mM NaCl + 10 mM EDTA + 0,5 % SDS + 4 M močovina). Po protřepání bylo přidáno 15 µl proteinasy K (o koncentraci 20 mg/ml v 50 % glycerolu). Po mírném promíchání byla takto připravená tkáň umístěna do „termobločku“ při 55 °C přes noc. Poté bylo přidáno 500 µl fenolu a po opatrném promíchání následovala centrifugace (14 000 otáček / 10 minut). Během centrifugace došlo k oddělení vodní a fenolové fáze. Vodní část byla opatrně pipetou odebrána a umístěna do nové mikrozkušavky. Byl k ní přidán 1 ml směsi chloroform – isoamylalkohol (v poměru 24 : 1) a po šetrném promíchání

následovala opět centrifugace (14 000 otáček / 10 minut). Opět došlo k oddělení fází, horní fáze byla odebrána do prázdné mikrozkušavky a objem mikrozkušavky byl doplněn vymraženým 96 % čistým etanolem. V této fázi došlo k vysrážení DNA a následovalo její přečištění. Prvním krokem byla centrifugace (1 200 otáček / 5 minut), po ní byl etanol odsát a nahrazen 200  $\mu$ l vymraženého 70% čistého etanolu, po protřepání následovala opět centrifugace a výměna etanolu. Tento krok byl opakován ještě jednou nebo v některých případech dvakrát, načež byl všechn etanol z mikrozkušavky odstraněn. Sediment byl po jeho odstranění usušen (otevřené mikrozkušavky několik minut ve „flow-boxu“) a rozpuštěn v 25 – 50  $\mu$ l TE pufru (10 mM Tris-HCl pH = 8,0 + 1 mM EDTA). Takto připravená DNA byla před použitím skladována při 4 °C.

Pro komparativní genomovou hybridizaci byla použita dvě skla s chromosomy samce *Coleonyx elegans* (získané metodou kultivace leukocytů) a dvě skla samice tohoto druhu (kultivace leukocytů; preparace z kostní dřeně), pro přípravu sond byla použita celogenomová DNA vyizolovaná ze svalů (obou pohlaví) a jako kompetitorová DNA byla použita fragmentovaná DNA vyizolovaná z jater (obou pohlaví). Aby nedošlo k snížení intenzity výsledných signálů, bylo nutné všechny kroky metody provádět v šeru.

Prvním krokem je značení sondy. Byly připravovány dvě sondy: jedna samčí a druhá samičí. Pro přípravu sond byl použit 1  $\mu$ g DNA příslušného pohlaví. Do mikrozkušavky byl umístěn objem DNA v TE pufru, pomocí známé koncentrace, měřené na spektrofotometru (DyNA Quant 200 Fluorometer; Amersham Biosciences), vypočítaný tak, aby množství DNA bylo 1  $\mu$ g. K tomuto objemu byl přidán 1  $\mu$ l směsi nukleotidů (složení zásobní směsi nukleotidů: 3,5  $\mu$ l dATP + 3,5  $\mu$ l dGTP + 1  $\mu$ l dTTP + 3,5  $\mu$ l dCTP + 337,5  $\mu$ l vody pro PCR; TopBio; P141; P042); 0,7  $\mu$ l roztoku nukleotidů značených červenou fluorescenční barvou Cy3-dUTP (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited; 25005442) a 4  $\mu$ l směsi enzymů DNA polymerázy I a DNázy I „Nick Translation Mix“ (Roche Molecular Biochemicals; 11 745 808 910). Takto připravená směs byla doplněna vodou pro PCR do objemu 20  $\mu$ l. Značící reakce pak probíhala přes noc při 16 °C.

Metoda značení sondy s použitím uvedené směsi enzymů je založená na schopnosti DNázy I v nízké koncentraci a v přítomnosti  $MgCl_2$  provádět náhodně distribuované zlomy DNA. DNA polymeráza I přitom syntetizuje, s dodáním příslušných nukleotidů, komplementární řetězce k intaktnímu vlákně (ve směru 5'→3'), přičemž používá 3'-OH konce zlomů jako primery. Jelikož se ve směsi vyskytují fluorescenčně značené nukleotidy, DNA polymeráza I je začleňuje do syntetizovaných řetězců, a tím dojde k označení celogenomové DNA (Klett et al. 1968; Kelly et al. 1970; Rigby et al. 1977).

Druhý den byla značící reakce zastavena přidáním 1  $\mu$ l pufru EDTA (0,5 M EDTA: 18,6 g chelaton II / 100 ml destilované vody, pH = 8,0). Poté byla směs rychle promíchána (vortex) a inkubována 10 minut při 65 °C ve vodní lázni. Velikost fragmentů značené sondy byla zjištěna pomocí elektroforézy s použitím 1 % agarosového gelu a 100 ng značené sondy. Výsledná délka úseků (přibližně 500 párů bazí) odpovídala doporučení v protokolu.

Dalším krokem byla příprava hybridizační směsi a její denaturace. Jelikož byly hybridizační směsi připravovány na dvě skla od každého pohlaví a jelikož doporučené množství DNA připravené jako sonda je 500 ng na sklo, byl objem obou značených sond rozdělen na dvě poloviny. Ke každé byla přidána sonikovaná DNA opačného pohlaví v koncentraci 10x vyšší než je koncentrace DNA připravené jako sonda (sonikace: nalámání řetězců DNA pomocí ultrazvuku na úseky o přibližně stejné délce 100 párů bazí, prováděná na přístroji Bandelin Sonopuls HD 2070; Bandelin electronic). Dále bylo do směsi pro každé sklo přidáno 25  $\mu$ g sonikované DNA z lososích spermií (Fluka; 31149-10G-F), která slouží jako kompetitor nebo blokátor, tj. jejím účelem je navázat se na místa, na která by se jinak nespecificky (díky svému negativnímu náboji) navázala sonda a signál by tak byl na všech chromosomech po celé délce. Po promíchání byla přidána 1/10 objemu 3 M Na-Acetátu a 2,5 objemu 100 % vymraženého etanolu. V této fázi dochází k vysrážení DNA. Po promíchání (vortex) byla směs umístěna na 1 hodinu do -80 °C. Následovala centrifugace (14 000 otáček / 15 minut při 4 °C). Supernatant byl odstraněn a nahrazen 200  $\mu$ l vymraženého 70 % etanolu. Po další centrifugaci (14 000 otáček / 10 minut při 4 °C) byl znovu odstraněn supernatant a sediment byl usušen (otevřené mikrozkušavky 3 minuty při 37 °C v termobločku). Poté byl sediment rozpouštěn v 5  $\mu$ l 100 % deionizovaného formamidu (Sigma-Aldrich; F7503) předeřátého na 37 °C, 30 minut při 37 °C ve speciálním termobločku za stálého míchání. Dále bylo přidáno 5  $\mu$ l 20 % dextran sulfátu (Fluka; 31403; ředěného 4 x SSC pufrům) předeřátého na 37 °C a směs byla promíchána (vortex). Poslední fází přípravy hybridizační směsi byla její denaturace, která probíhala 5 minut při 90 °C ve vodní lázni. Bylo nutné dodržet přesně dobu denaturace a hybridizační směs okamžitě umístit do ledové tříště. Takto byla hybridizační směs připravená pro aplikaci na skla.

Během doby, kdy byla hybridizační směs 1 hodinu v -80 °C, byla provedena příprava a denaturace skel. Podložní skla s nakapanými suspenzemi byla po zaschnutí skladována přibližně 1 měsíc při -20 °C. Po jejich rozmrazení bylo nutné skla odvodnit vzestupnou řadou vymražených etanolů (70 %, 80 %, 100 %; v každém byla skla 30 vteřin). Po zaschnutí skel (minimálně 10 minut schnutí na vzduchu za pokojové teploty) probíhala denaturace chromosomální DNA. Na každé sklo bylo umístěno 100  $\mu$ l 70 % deionizovaného formamidu

(ředí se 2x SSC pufrém), sklo bylo přikryto krycím sklem po celé délce a umístěno do speciálního termobločku (Thermomixer 5355; Eppendorf) na 3,5 minuty při 68 °C. V tomto kroku bylo velmi důležité nepřekročit čas denaturace. Po uplynutí 3,5 minut bylo ihned odstraněno krycí sklo a preparát byl rychle umístěn do vymraženého 70 % etanolu na 2 minuty. Následovalo 30 vteřin v 80 % a 100 % vymraženém etanolu a minimálně 10 minut schnutí na vzduchu za laboratorní teploty.

Dalším krokem byla samotná hybridizace. Na každé sklo bylo umístěno 10  $\mu$ l hybridizační směsi. Sklo bylo překryto velkým krycím sklem po celé délce a lemováno speciálním lepidlem (Marabu Fixogum Dispenser). Na skla s chromosomy pocházejícími od samce byla umístěna směs se značenou sondou ze samčí celogenomové DNA a neznačenou kompetitorovou DNA samice v 10x vyšší koncentraci. Analogicky bylo postupováno u skel se samičími chromosomy. Všechna skla byla umístěna do vlhké komůrky (na dně komůrky byla vrstva 2x SSC pufru) a hybridizace probíhala 3 dny při 37 °C.

Po třech dnech hybridizace byla odstraněna krycí skla a preparáty byly rychle opláchnuty v 1 % roztoku Triton X-100 (Sigma-Aldrich; T9284; rozpuštěného v 0,1x SSC pufru) a dále inkubovány 5 minut ve stejném roztoku při 62 °C a nakonec 2 minuty v 1 % roztoku Triton X-100 (rozpuštěného v 2x SSC pufru) při 25 °C. Skla byla opatrně osušena pomocí filtračního papíru a bylo na ně nanášeno 25  $\mu$ l směsi DAPI (detekční souprava pro sondy značené FIC a Cy3 pro přímé pozorování; Cambio; 1124-MD-50). Preparáty byly překryty krycím sklem po celé délce a rámovány pomocí laku. Při této metodě se nedoporučuje prohlížet preparáty ihned po jejich dokončení. Před prohlížením byly tedy umístěny v temné krabici při 4 °C. Druhý den byly chromosomy prohlíženy a fotografovány za pomoci příslušných filtrů na fluorescenčním mikroskopu.

## 5. Zpracování obrazového materiálu

Preparáty byly prohlíženy na mikroskopu Olympus BX-51 a Provis AX 70 Olympus. Vybrané metafáze byly zachyceny CDD kamerami (Olympus; DP30BW) nainstalovanými na mikroskopu Provis AX 70. Obraz byl komplexně zpracován v programu Microimage. Sestavování karyotypu bylo prováděno ve specializovaných karyotypovacích programech Ikaros a Isis firmy Metasystems.



## 6. Klasifikace chromosomů

Chromosomy byly klasifikovány do jednotlivých kategorií: metacentrické (m), submetacentrické (sm), subtelocentrické (st) a akrocentrické (a), na základě délky chromosomových ramen a polohy centromery, podle systému navrženého Levanem et al. (1964). Pro další charakterizaci karyotypů byl též použit parametr počtu chromosomových ramen (tzv. hodnota NF - nombre fondamental), které zachycují počet centrických fúzí podle Matthey (1945).

## 4. Výsledky

### 1. Použité cytogenetické metody

#### **Preparace chromosomů**

##### *a) kultivace fibroblastů*

Metoda kultivace fibroblastů se ukázala jako metoda poskytující výsledky v dostačující kvalitě, ale v zanedbatelné kvantitě. Přestože totiž práce probíhala s největším zřetelem na zabránění kontaminace, ve většině případů se jí zabránit nepodařilo a kultury byly zničeny bakteriální, popř. kvasinkovou kontaminací.

##### *b) kultivace leukocytů*

Metoda kultivace leukocytů poskytuje u většiny druhů možnost získat počítatelné metafáze. Kvalita bývá dostačující a kvantita v některých případech také. Její výhodou je relativně krátká doba kultivace, což poskytuje možnost tuto metodu opakovat častěji než ostatní metody, dobrá odolnost vůči kontaminacím a také šetrnost ke studovaným jedincům. Většina publikovaných prací udává jako minimální množství krve použitelné na kultivaci 100  $\mu$ l. Zejména u menších druhů gekončků není možné při zachování kvality života zvířete tento objem odebrat. Při řešení této práce jsem tedy pracovala s objemy daleko nižšími (do 40  $\mu$ l). Několik experimentů bylo zaměřeno na zjištění optimální doby kultivace s ohledem na kvantitu buněk v mitóze, kdy kultury od stejného druhu gekončika (*Goniurosaurus luii*) byly sklizeny vždy po 4 vzorcích od 4 zvířat postupně 3. - 10. den po nasazení kultur. Jako optimální doba sklizně kultur se byl stanoven 7. den po začátku kultivace. Podobným způsobem byla zjišťována i optimální teplota kultivace. Podle získané kvantity dělicích se buněk pak byla jako optimální stanovena teplota 30 °C.

##### *c) přímá preparace z regenerujícího ocasu*

Tato metoda se těší vzrůstající oblibě pro svou jednoduchost a použitelnost pro malá zvířata bez nutnosti studované jedince usmrtit. Při jejím použití u gekonů podává u téměř každého studovaného jedince nějaké výsledky, ovšem kvantita a zejména kvalita takto získaných metafází není, na rozdíl od použití této metody, např. u ryb (Völker 2006; vlastní pozorování), příliš vysoká. Metafáze jsou často neúplné a jednotlivé chromosomy jeví známky poškození. Nevýhodou pro použití u gekončků je, že doba regenerace špičky ocasu je přibližně tři týdny až měsíc a pro některé druhy se silným ocasem (zejména jedná-li

se o jedince, kteří mají několik měsíců nebo let starý regenerát) je zcela nepoužitelná, jelikož po odstřížení špičky ocasu se rána brzy zahojila, ale nebylo možné odebrat žádné dělící se buňky.

#### *d) přímá preparace (varlata, střevo, kostní dřev)*

Nevýhodou všech těchto metod je, že vyžadují usmrcení studovaných jedinců. Protože většina vyšetřovaných jedinců byla zařazena do jiných paralelně probíhajících pokusů, byly tyto metody použity jen v několika případech.

#### *Preparace chromosomů z kostní dřevě*

Tato metoda se ve většině případů osvědčila. Poskytovala metafáze v poměrně dobré kvalitě a v některých případech i v dostatečné kvantitě, ta však s největší pravděpodobností závisela na individuálním stavu každého zvířete.

#### *Preparace chromosomů z tenkého střeva*

Účinnost této metody závisí na nutričním stavu zvířete. Je možné pomocí ní získat v některých případech velké množství metafází, které jsou ale často neúplné a mnohdy obtížně hodnotitelné, jelikož chromosomy jsou často poškozeny nebo těsně nahloučeny. Hodnocení také komplikuje nadměrné množství buněk na preparátu. Takto získané preparáty se podle původního protokolu nehodí pro všechny typy diferenciationálního barvení, protože použití kyseliny octové má nepříznivý vliv na vlastnosti chromosomů (King & Rofe 1976). Přes všechna úskalí je to metoda, která může přinést sice malé, ale jisté procento kvalitních metafází, použitelná zejména pro velmi malé druhy plazů.

#### *Preparace chromosomů z varlat*

I tato metoda závisí na individuálním stavu každého jedince. Je však velmi jednoduchá a téměř ve všech případech přinesla požadované výsledky. Množství mitotických i meiotických chromosomů takto získaných je značné. Často jsou sice mitozy i meiozy neúplné, ale jinak bývají preparáty kvalitní a vždy bylo možné nalézt na skle několik velmi kvalitních a dobře hodnotitelných mitoz a meioz.

#### *Modifikace přímé preparace chromosomů pro zvířata čerstvě po smrti*

Výsledky tohoto postupu samozřejmě závisí zejména na časovém odstupu mezi smrtí a preparací. Pokud byla tato doba krátká bylo dosaženo srovnatelných výsledků jako při použití nemodifikovaných metod, tedy při aplikaci kolchicinu živému zvířeti.

## Barvení chromosomů

### *C- pruhování*

Tato metoda barvení byla použita pro všechny studované druhy na poměrně velkém počtu preparátů (celkově 28 preparátů). Bylo experimentováno s dobou denaturace i renaturace. V žádném z experimentů se však nepodařilo vizualizovat heterochromatin a získat tak na chromosomech specifický vzor.

### *Vizualizace NOR*

Impregnace stříbrem byla použita pro samce a samice druhu *Coleonyx elegans*. Celkově bylo tímto způsobem vyšetřeno přibližně 30 metafází čtyř jedinců obou pohlaví tohoto druhu. Ve většině případů byly organizátory jadérka touto metodou vizualizovány, a to v místech sekundárních konstrikcí na chromosomech.

Fluorescenční barvení pomocí Chromomycinu A3 bylo ve většině případů použito v kombinaci s barvením DAPI. Tato barvicí metoda byla použita u druhu *Coleonyx elegans*. S pomocí fluorochromu DAPI je možné vizualizovat sekundární konstriktce, jako místa negativních signálů. Chromomycin A3, který se standardně váže na GC bohaté oblasti chromosomální DNA, nevytvářel na chromosomech gekončíků tohoto druhu žádné specifické vzory, přestože byla, vzhledem k doporučovaným hodnotám, jeho koncentrace zvýšena stejně jako doba syčení. Celkově byla tato metoda testována na 55 metafázích šesti jedinců obou pohlaví druhu *Coleonyx elegans*.

## Hybridizační techniky

### *Hybridizace s pantelomerickou sondou StarFISH Cambio*

Tato hybridizační metoda byla použita u samečů druhu *Coleonyx elegans*. Postup nebyl nijak modifikován. Sonda hybridizovala specificky s telomerickými sekvencemi na chromosomech.

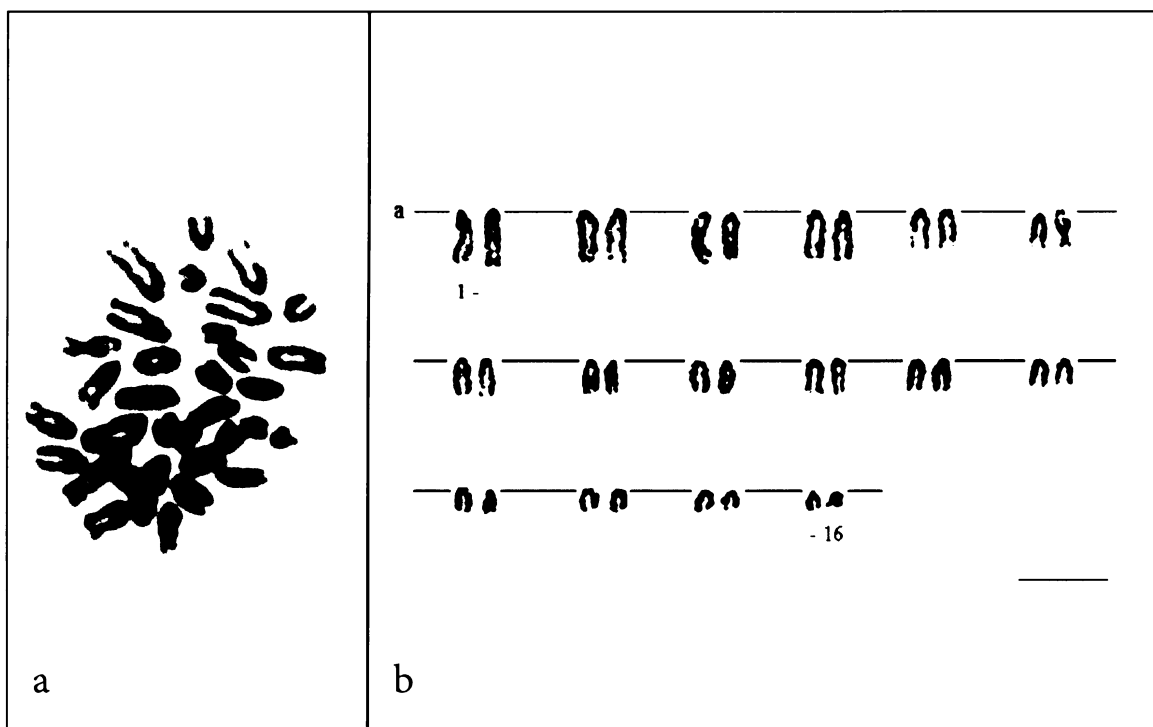
### *Komparativní genomová hybridizace*

Tato metoda byla použita na preparáty obou pohlaví druhu *Coleonyx elegans*. Na preparátech samic nebylo po provedení metody možno nalézt žádné chromosomy, přestože před hybridizací byly prohlíženy pod fázovým kontrastem a bylo na nich dostatečné množství metafází ve velice dobré kvalitě. Zřejmě tedy došlo k nějaké nespecifické chybě v postupu. U samčích preparátů byly nalezeny signály, které však nebyly pouze na metacentrickém chromosomu, ale i na ostatních chromosomech, což by z metodického hlediska mohlo nasvědčovat problému s nevyváženou koncentrací kompetitorové DNA a sondy.

## 2. Popis karyotypu jednotlivých druhů čeledi Eublepharidae

### 2.1. *Coleonyx brevis*

Diploidní počet chromosomů samice *Coleonyx brevis* byl  $2n = 32$ , karotyp byl tvořen výlučně akrocentrickými chromosomy postupně klesající velikosti, kde ovšem první tři páry jsou zřetelně větší (Obr. 2). Karyotyp samce nebyl popsán, jelikož se během řešení tématu diplomové práce nepodařilo sehnat žádné jedince tohoto pohlaví. Karyotyp byl studován pouze u jediné samice, která byla jediným zástupcem tohoto druhu v našich chovech. Stejně jako u samců se nepodařilo za dobu studia sehnat žádné další jedince. Metodou preparace chromosomů z regenerující tkáně ocasu byly získány tři hodnotitelné metafáze, jež se shodují v počtu a morfologii chromosomů.



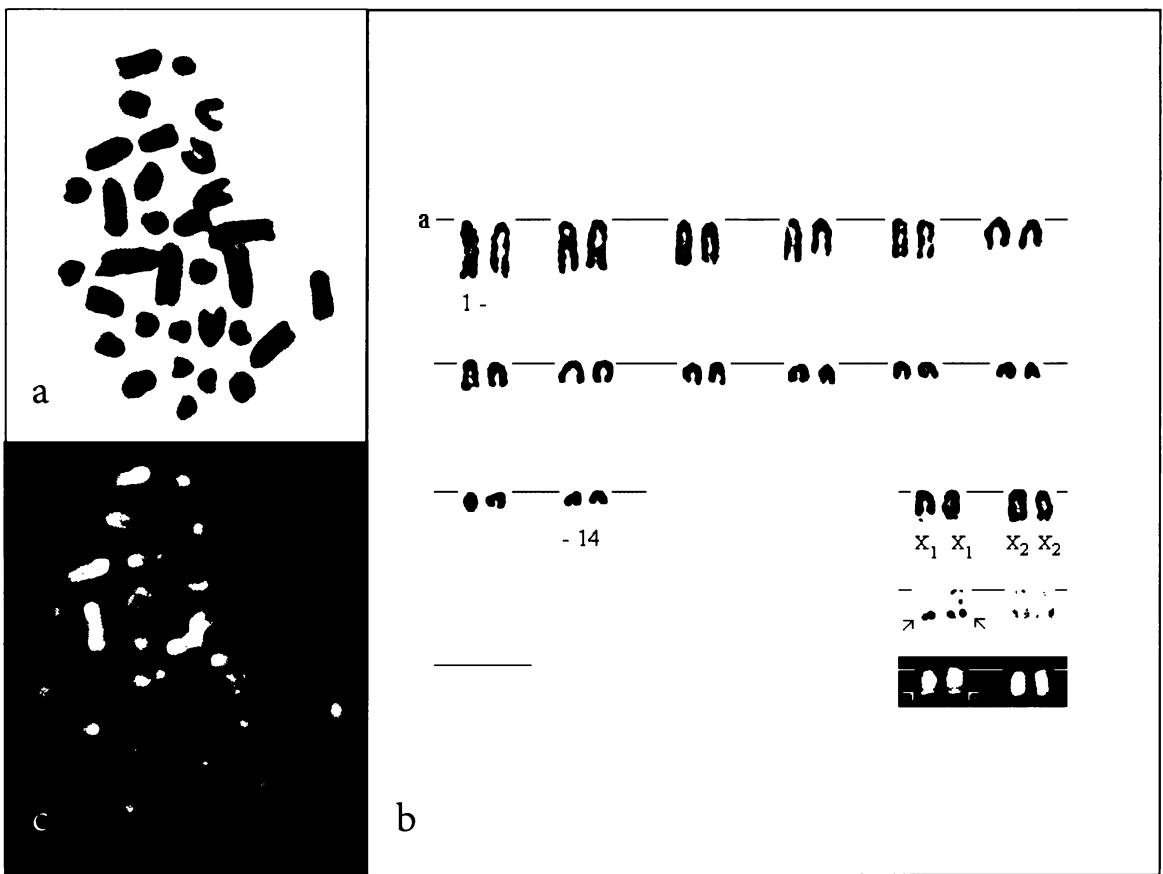
Obr. 2 Metafázní chromosomy (a) a odpovídající karyotyp sestavený z chromosomů barvených Giemsovým barvivem (b) samice *Coleonyx brevis*; a - akrocentrické chromosomy; měřítko (vpravo dole na b) je 10  $\mu\text{m}$

## 2.2. *Coleonyx elegans*

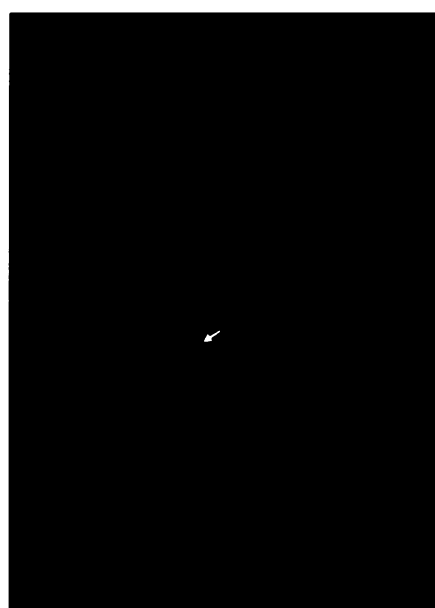
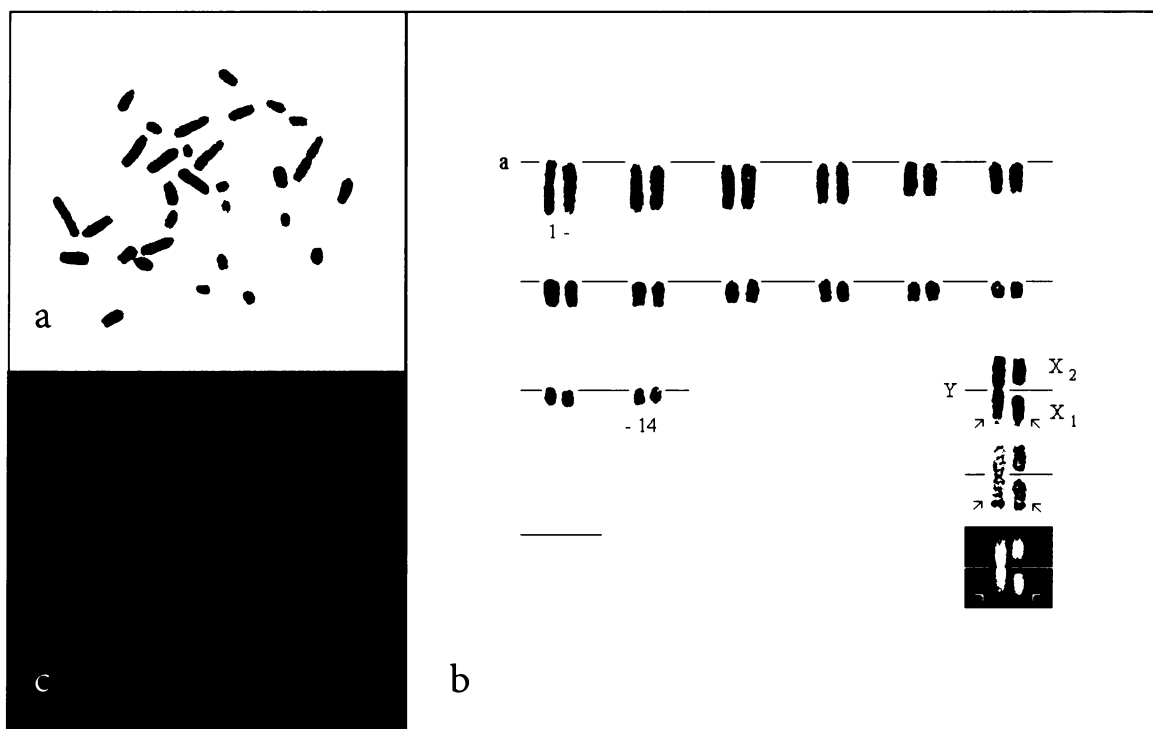
Diploidní počet chromosomů samice druhu *Coleonyx elegans* byl  $2n = 32$  (Obr. 3). Všechny chromosomy byly akrocentrické a jejich velikost se postupně snižovala; první tři chromosomové páry však byly zřetelně větší. Samci měli v diploidním stavu počet chromosomů  $2n = 31$  (Obr. 4). Karyotyp byl tvořen jedním velkým metacentrickým chromosomem (velikost je přibližně 9  $\mu\text{m}$ ) a 30 akrocentrickými chromosomy, jejichž velikost se od největšího páru k nejmenšímu postupně snižovala, přičemž stejně jako v karyotypu samic byly první tři páry zřetelně větší. Při barvení Giemsovým barvivem (Obr. 4b) byla na jednom rameni metacentrického chromosomu a na jednom akrocentrickém chromosomu střední velikosti patrná sekundární konstriktce. Tato konstriktce byla identifikovatelná taktéž při barvení DAPI (Obr. 4b výřez). Po impregnaci stříbrem ( $\text{AgNO}_3$ ) bylo prokázáno, že tato oblast je místem aktivních organizátorů jadérka (Obr. 4b výřez). U samice byly prostřednictvím impregnace stříbrem identifikovány na jednom páru chromosomů střední velikosti organizátory jadérka (Obr. 3b výřez) v místech sekundárních konstriktcí patrných při barvení DAPI (Obr. 3b výřez). Jelikož je u tohoto druhu pozorováno genetické určení pohlaví (Kratochvíl – vlastní data) a byl zjištěn markantní rozdíl v karyotypu samců a samic, byl metacentrický chromosom nalezený u samců označen jako pohlavní chromosom Y, který je s největší pravděpodobností výsledkem evolučně zafixované centrické fúze Robertsonovského typu. Celkový počet chromosomových ramen byl  $\text{NF} = 32$ . V některých případech mohou mít takto vzniklé chromosomy zbytky telomerických sekvencí v oblasti centromer. Vyšetření telomerickou sondou (TTAGGG) $_n$  však prokázalo signály pouze v telomerických oblastech chromosomů a žádné intersticiální signály (Obr. 4d). Barvení Chromomycinem A3 (Obr. 4c), který se váže na GC bohaté oblasti, nepřineslo žádný specifický vzor (vzor homologický R-puhům jako u savců a ptáků) a nevizualizovalo ani místa organizátorů jadérka odhalená pomocí impregnace stříbrem (jak je běžné u ryb a obojživelníků; Slijepcevic 1998). Při použití metody komparativní genomové hybridizace (Obr. 4e) bylo očekáváno, že značená sonda ze samčí celogenomové DNA bude hybridizovat pouze v úseku metacentrického chromosomu v karyotypu samce, kde v důsledku pohlavních rozdílů nehybridizovala kompetitorová samiččí DNA. Signály však nebyly pouze v tomto chromosomu, ale v silně heterochromatinizovaných oblastech všech chromosomů v karyotypu (tedy v oblastech centromer), kde vytvářely vzor specifický pro daný chromosomový pár a umožnily tak sestavit karyotyp s jasnými chromosomovými páry a odhalit akrocentrický chromosom homologický k polovině metacentrického

chromosomu (Obr. 4e), k níž nebylo možné homolog přiřadit žádnou z předem použitých barvicích metod. Na Obr. 5a, b, dokumentujícím metafázi prvního meiotického dělení, je jasně identifikovatelný trivalent, tvořený metacentrickým chromosomem Y a dvěma akrocentrickými chromosomy X. Obr. 5a, b ilustrují, že místa chiasmat se u trivalentu druhu *C. elegans* vyskytují nejčastěji v subterminální (Obr. 5b) nebo v terminální (Obr. 5a) oblasti. Obr. 5c, zachycující druhé meiotické dělení, dokumentuje rozchod chromosomů do sesterských jader, přičemž je patrné, že jedna gameta dědí 14 chromosomů + 1 metacentrický Y chromosom a druhá 14 chromosomů + 2 akrocentrické X chromosomy (jež nejsou v této fázi identifikovatelné).

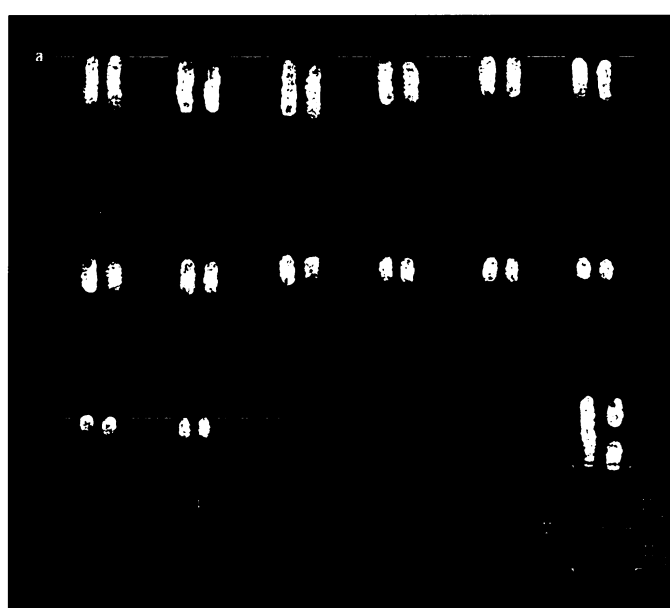




Obr. 3 Metafázní chromosomy (a) a odpovídající karyotyp sestavený z chromosomů barvených Giemsovým barvivem (b) samice *Coleonyx elegans*; ve výřezu (b) pohlavní chromosomy po impregnaci stříbrem a barvené DAPI; šipky upozorňují na místa sekundárních konstrikcí a organizátorů jadérka; barvení Chromomycinem A3 (c); a - akrocentrické chromosomy; měřítko (vlevo dole na b) je 10  $\mu\text{m}$



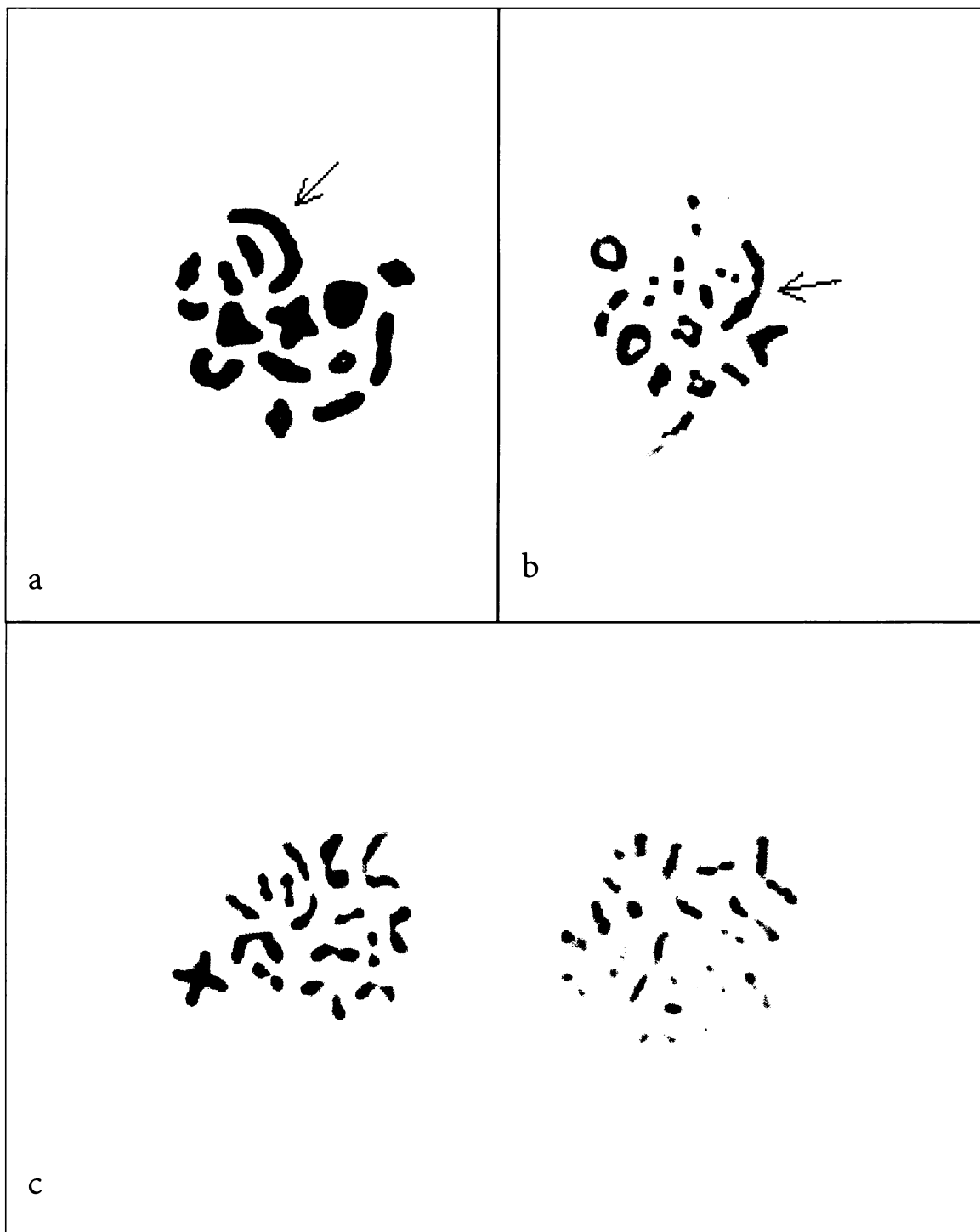
d



e

Obr. 4 Metafázní chromosomy (a) a odpovídající karyotyp sestavený z chromosomů barvených Giemsovým barvivem (b) samce (a, b) *Coleonyx elegans*; ve výřezu (b) pohlavní chromosomy po impregnaci stříbrem a barvené DAPI, šipky upozorňují na místa sekundárních konstrikcí a organizátorů jadérka; fluorescenční barvení Chromomycinem A3 (c); FISH se specifickou telomerickou sondou (TTAGGG)<sub>n</sub>, šipka upozorňuje na metacentrický chromosom Y, karyotyp sestavený z metafázních chromosomů barvených DAPI (e, horní řádek) a odpovídajících chromosomů po komparativní genomové hybridizaci (e, spodní řádek), šipky upozorňují na místa sekundárních konstrikcí;

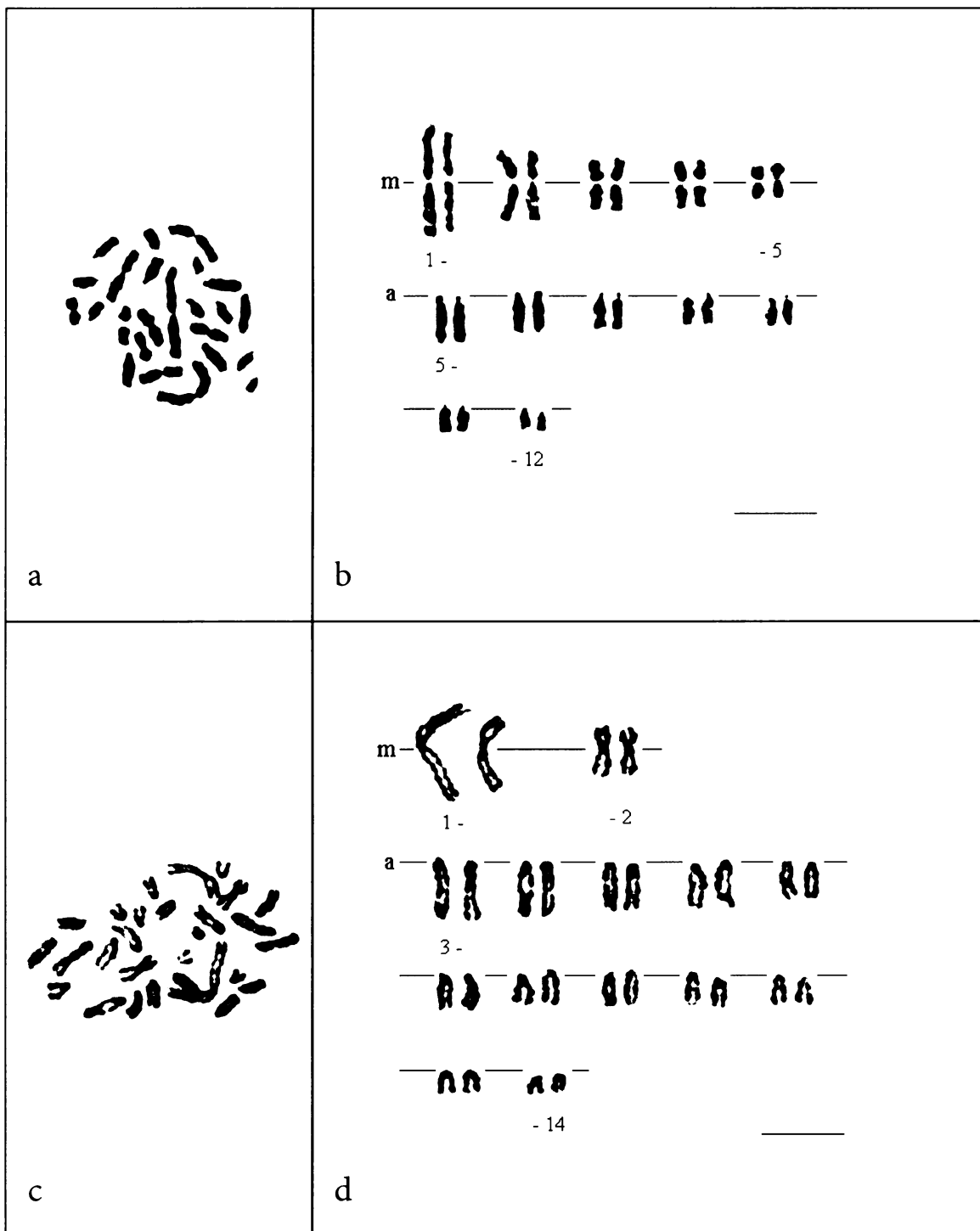
a - akrocentrické chromosomy; měřítko (vlevo dole na b, e) je 10 μm



Obr. 5 Meiotické chromosomy (a, b, c) barvené Giesmovým barvivem samce *Coleonyx elegans*; diakineze I. meiotického dělení (a, b), šipka upozorňuje na trivalent tvořený pohlavními chromosomy  $X_1X_2Y$ s terminálními (a) a subterminálními (b) chiasmaty; metafáze II. meiotického dělení (c), sesterská jádra, vlevo 14 chromosomů + Y (na okraji metafázního jádra), vpravo 14 +  $X_1X_2$

### 2.3. *Coleonyx mitratus*

Variabilita v počtu chromosomů a kvalita preparátů neumožňovala jednoznačný popis karyotypu druhu *Coleonyx mitratus*. Byli studováni 4 samci a 8 samic. Celkový počet získaných metafází je 22. Některé jsou zjevně neúplné, nicméně několik metafází se shoduje v počtu chromosomů. U 5 metafází samce a 5 metafází samice byl počet chromosomů v rozmezí 23 – 24 chromosomů. U jedné metafáze samce byl počet stanoven na 28 chromosomů a u 4 metafází samic bylo napočítáno taktéž 28 chromosomů. V karyotypu samců i samic se vyskytuje jeden metacentrický chromosom, který svou velikostí přesahuje velikost v pořadí největších chromosomů. Dále jsou v karyotypu zastoupeny metacentrické a akrocentrické chromosomy, postupně se snižující velikosti. Obr. 6b, d dokumentují karyotyp dvou jedinců samičího pohlaví. V prvním případě byl diploidní počet chromosomů  $2n = 24$  (Obr. 6a, b). Karyotyp byl tvořen pěti páry metacentrických chromosomů a sedmi páry akrocentrických chromosomů. Pár č. 1 byl výrazně větší než zbývající páry chromosomů, přičemž jeden chromosom z tohoto páru svou velikostí přesahoval druhý největší. Dále se velikost metacentrických i akrocentrických chromosomů snižovala postupně. Počet chromosomových ramen byl  $NF = 34$ . Ve druhém případě (Obr. 6c, d) byl počet chromosomů v diploidním stavu  $2n = 28$ . Karyotyp byl tvořen dvěma páry metacentrických a dvanácti páry akrocentrických chromosomů. Mezi chromosomy prvního páru byl výrazný rozdíl ve velikosti. Stejně tak byl velikostní rozdíl mezi prvním párem a ostatními chromosomovými páry, jejichž velikost klesala postupně. Počet chromosomových ramen byl  $NF = 32$ .

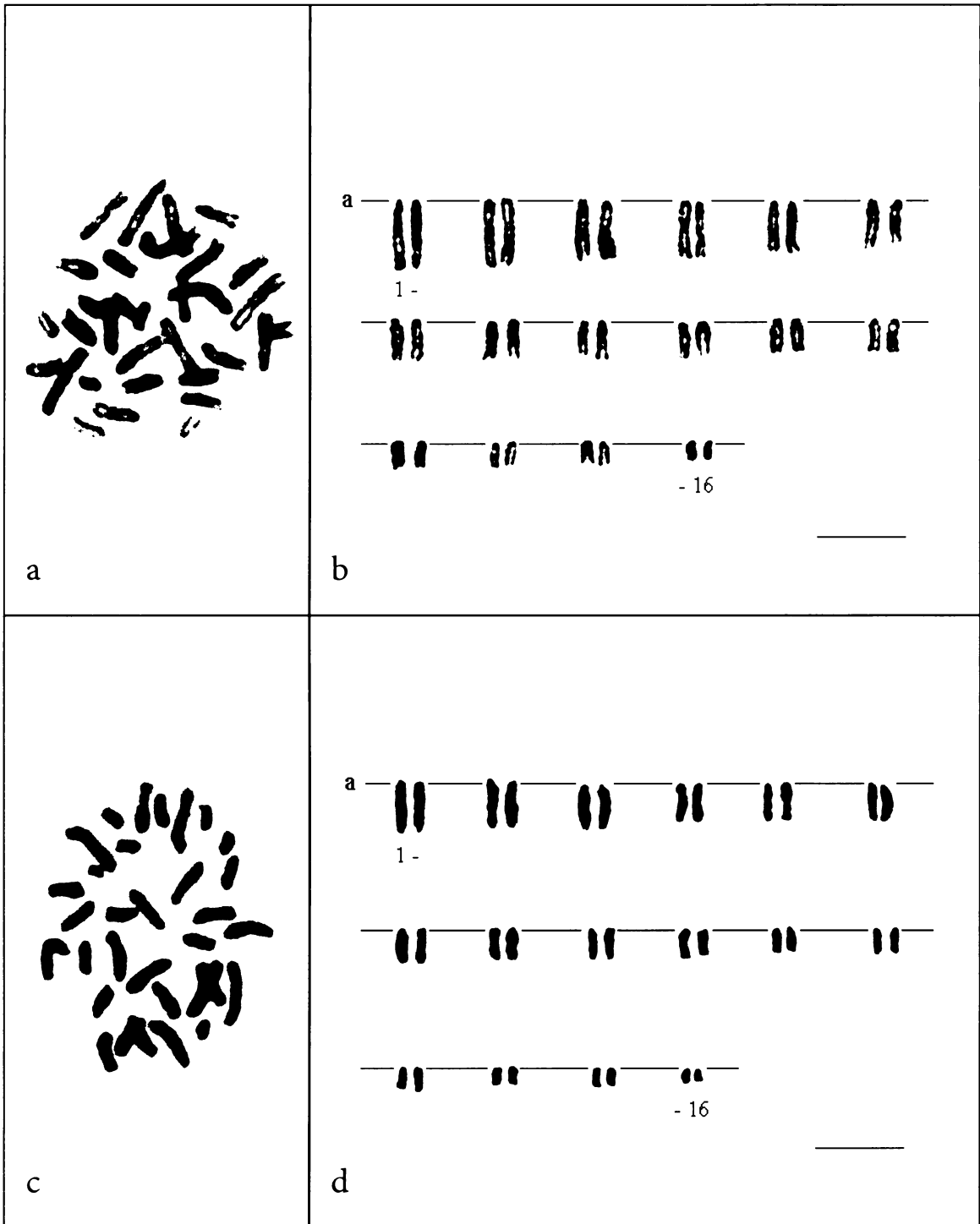


Obr. 6 Metafázní chromosomy (a, c) a odpovídající karyotypy sestavené z chromosomů barvených Giemsovým barvivem (b, d) dvou jedinců (a, b; c, d) samičího pohlaví *Coleonyx mitratus*;

m - metacentrické chromosomy; a - akrocentrické chromosomy; měřítko (vpravo dole na b, d) je 10  $\mu\text{m}$

#### 2.4. *Coleonyx variegatus*

Diploidní počet chromosomů byl u všech studovaných jedinců  $2n = 32$  (Obr. 7). Všechny chromosomy byly akrocentrické. Velikost se od prvního páru k poslednímu postupně snižovala, první tři páry však byly zřetelně větší. Popis karyotypu se shodoval s již publikovaným popisem karyotypu samce tohoto druhu (Matthey 1933). Přestože pohlaví je u druhu *Coleonyx variegatus* určeno pomocí genetických faktorů (Viets et al. 1994), nebyly s pomocí běžných cytogenetických metod nalezeny žádné morfologicky rozlišené pohlavní chromosomy. Studovaný počet jedinců byl u tohoto druhu nedostatečný, kvalita získaných preparátů však umožňovala jednoznačný popis karyotypu.

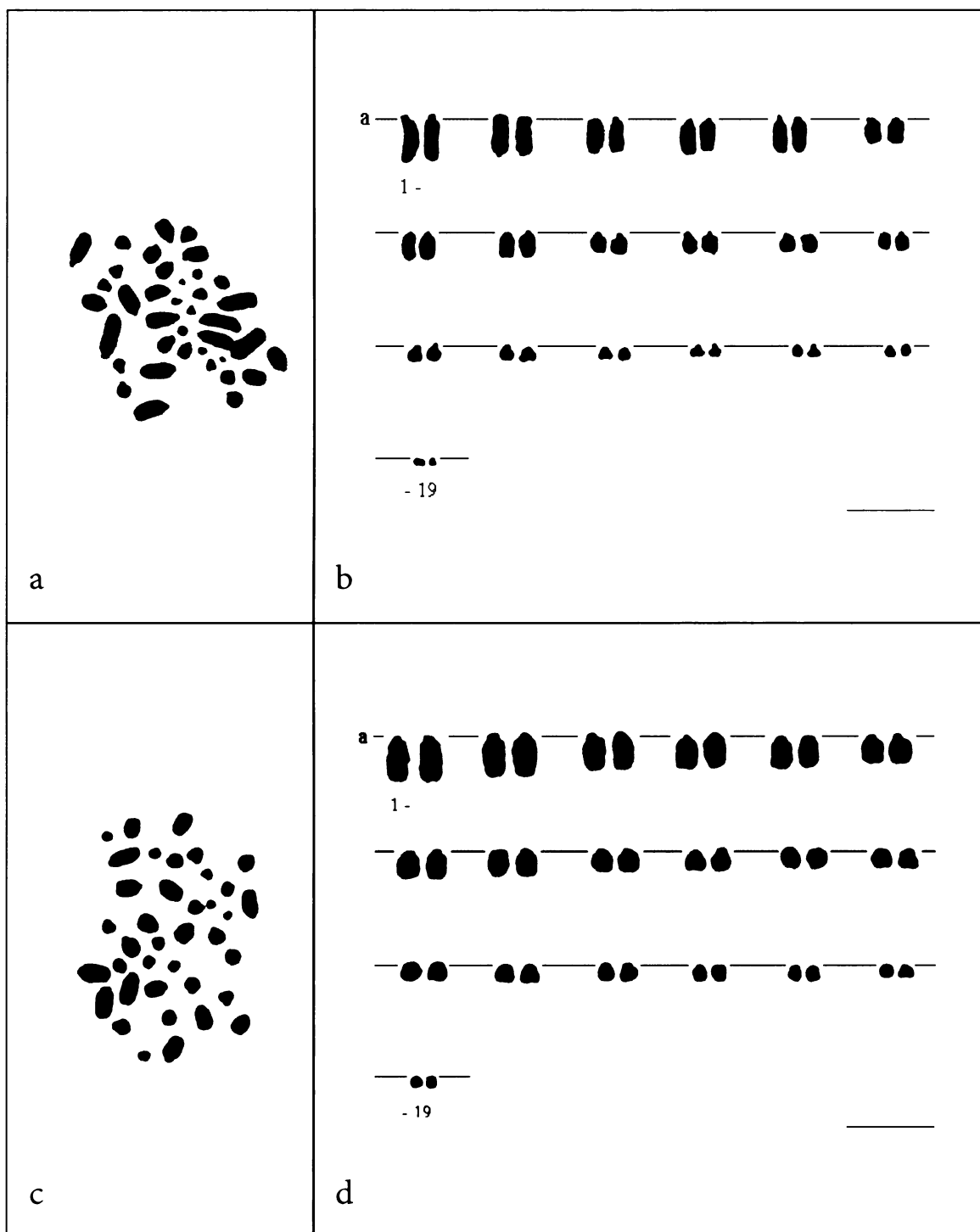


Obr. 7 Metafázní chromosomy (a, c) a odpovídající karyotypy sestavené z chromosomů barvených Giemsovým barvivem (b, d) samice (a, b) a samce (c, d) *Coleonyx variegatus*; a - akrocentrické chromosomy; měřítko (vpravo dole na b, d) je 10  $\mu\text{m}$

## 2.5. *Hemitheconyx caudicinctus*

Vyšetření jedinci měli shodně diploidní počet chromosomů  $2n = 38$  (Obr. 8). Karyotyp byl složen z 19 párů akrocentrických chromosomů. Jejich velikost postupně klesala, bez ostré hranice mezi makrochromosomy a mikrochromosomy. Konvenčním barvením Giemsovým barvivem nebyly odhaleny žádné rozdíly mezi pohlavími.



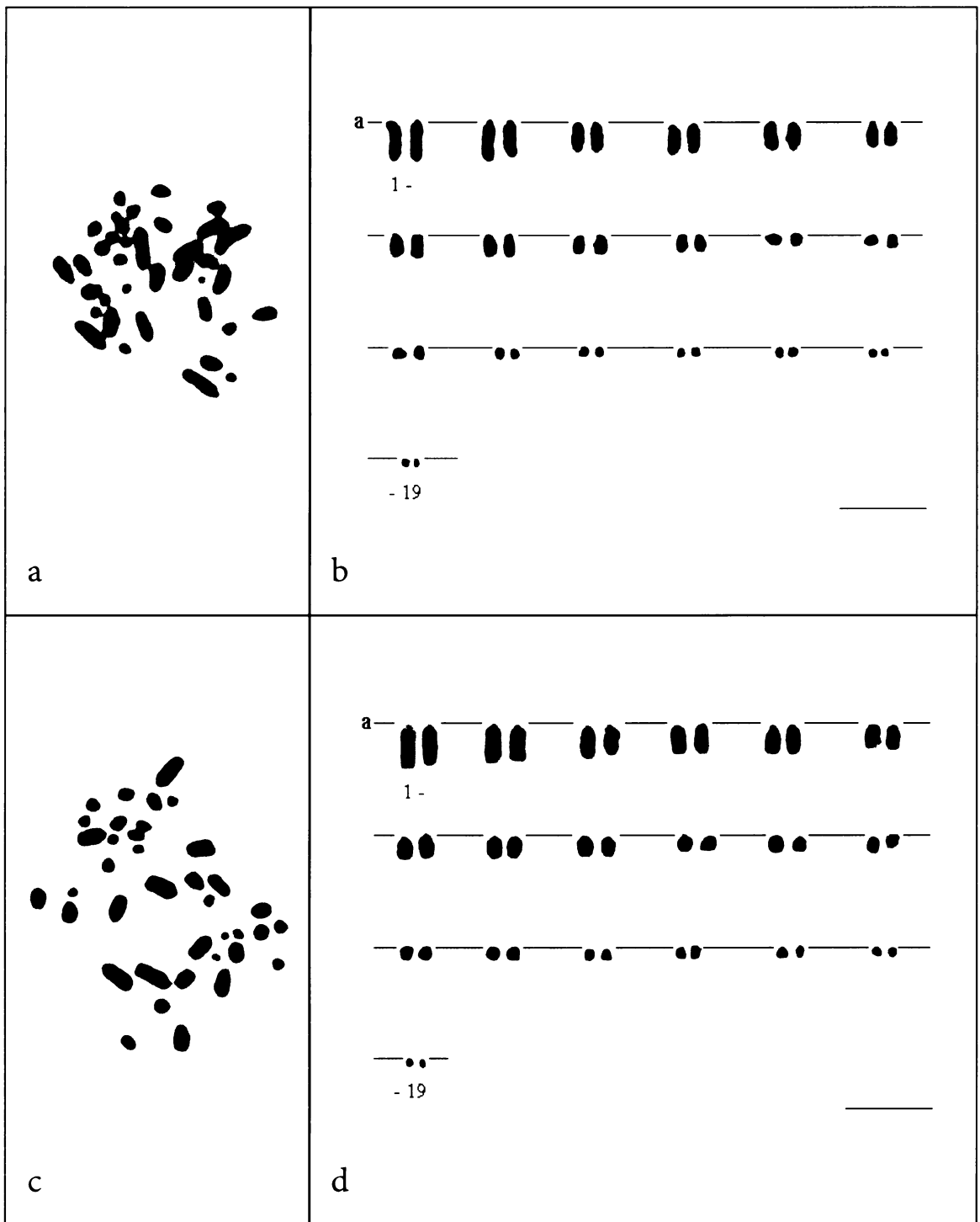


Obr. 8 Metafázní chromosomy (a, c) a odpovídající karyotypy sestavené z chromosomů barvených Giemsovým barvivem (b, d) samice (a, b) a samce (c, d) *Hemitheconyx caudicinctus*;

a - akrocentrické chromosomy; měřítko (vpravo dole na b, d) je 10  $\mu\text{m}$

## 2.6. *Holodactylus africanus*

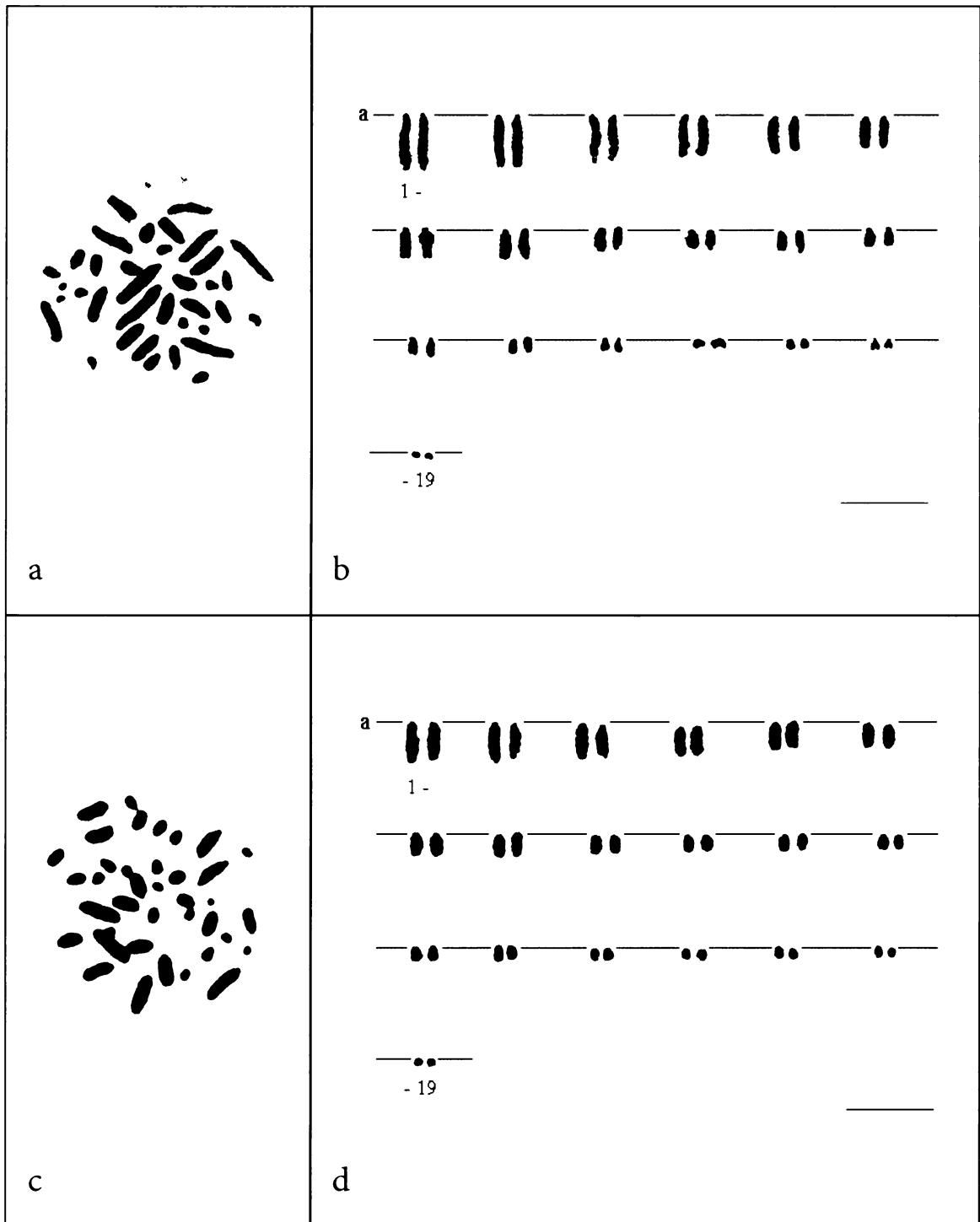
Obě pohlaví druhu *Holodactylus africanus* měla shodně diploidní počet chromosomů  $2n = 38$  (Obr. 9). Všechny chromosomy v karyotypu byly akrocentrické. Velikost se postupně snižovala. Konvenčním barvením Giemsovým barvivem nebyly nalezeny žádné pohlavní rozdíly v karyotypu. Ačkoli se nepodařilo nashromáždit dostatečný počet hodnotitelných metafází od většího počtu jedinců, kvalita získaných preparátů (4 metafáze) byla natolik vysoká, že umožňovala spolehlivý popis karyotypu.



Obr. 9 Metafázní chromosomy (a, c) a odpovídající karyotypy sestavené z chromosomů barvených Giemsovým barvivem (b, d) samice (a, b) a samce (c, d) *Holodactylus africanus*; a - akrocentrické chromosomy; měřítko (vpravo dole na b, d) je 10  $\mu\text{m}$

## 2.7. *Eublepharis angramainyu*

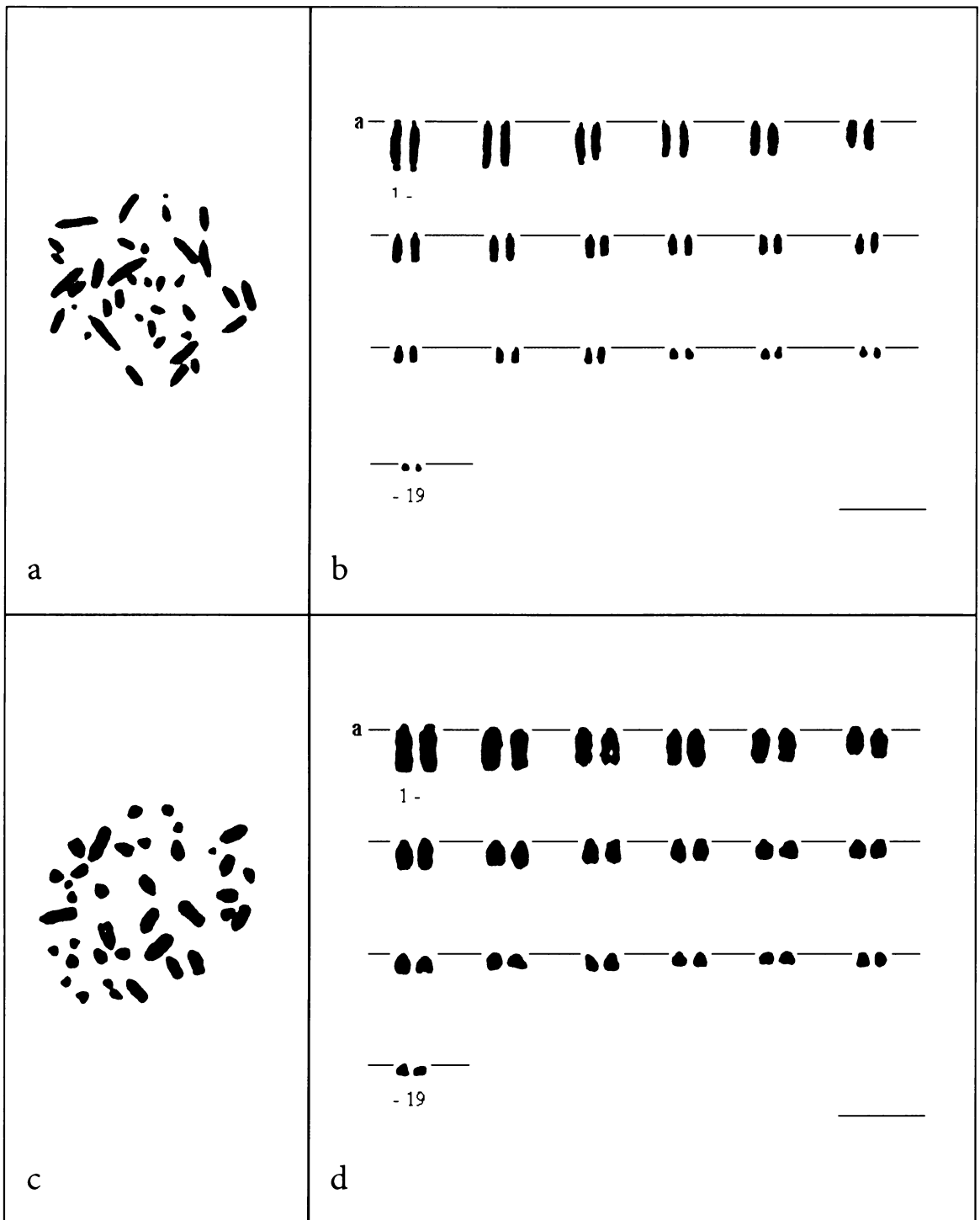
Vyšetření jedinci ze známých populací a lokalit odchyty měli shodně diploidní stav chromosomů  $2n = 38$  (Obr. 10). Karyotyp byl tvořen 19 páry akrocentrických chromosomů. Velikost se postupně snižovala bez ostrého přechodu mezi makrochromosomy a mikrochromosomy. Mezi karyotypy obou pohlaví nebyly nalezeny žádné rozdíly, stejně tak jako mezi karyotypy syrské a íránské populace tohoto druhu, jež se liší zbarvením a některými folidotickými znaky (Kratochvíl – ústní sdělení).



Obr. 10 Metafázní chromosomy (a, c) a odpovídající karyotypy sestavené z chromosomů barvených Giemsovým barvivem (b, d) samice (a, b) a samce (c, d) *Eublepharis angramainyu*; a - akrocentrické chromosomy; měřítko (vpravo dole na b, d) je 10  $\mu\text{m}$

## 2.8. *Eublepharis macularius*

Všichni studovaní jedinci měli diploidní počet chromosomů  $2n = 38$  (Obr. 11). Všechny chromosomy byly akrocentrické, jejich velikost postupně klesala. Popis karyotypu se shodoval s již publikovaným popisem u tohoto druhu (Gorman 1973). Nebyly nalezeny žádné rozdíly v karyotypu samic a samců.

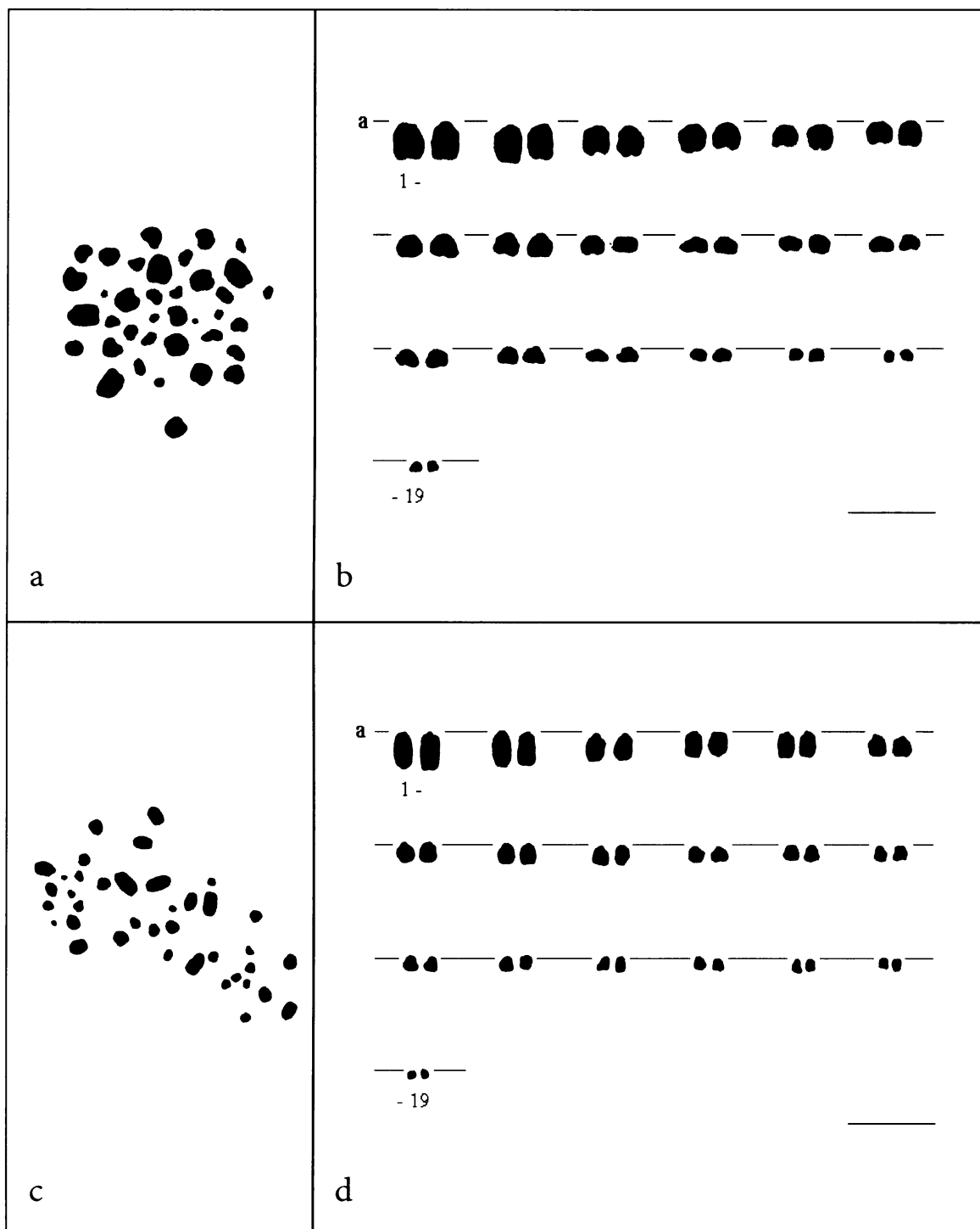


Obr. 11 Metafázní chromosomy (a, c) a odpovídající karyotypy sestavené z chromosomů barvených Giemsovým barvivem (b, d) samice (a, b) a samce (c, d) *Eublepharis macularius*; a - akrocentrické chromosomy; měřítko (vpravo dole na b, d) je 10  $\mu\text{m}$

## 2.9. *Goniurosaurus araneus*

Diploidní počet chromosomů u druhu *Goniurosaurus araneus* byl  $2n = 38$  (Obr. 12). Všechny chromosomy byly akrocentrické. Velikost od prvního páru k poslednímu postupně klesala. Rozdíly v karyotypu samců a samic nebyly s použitím konvenčního barvení nalezeny.

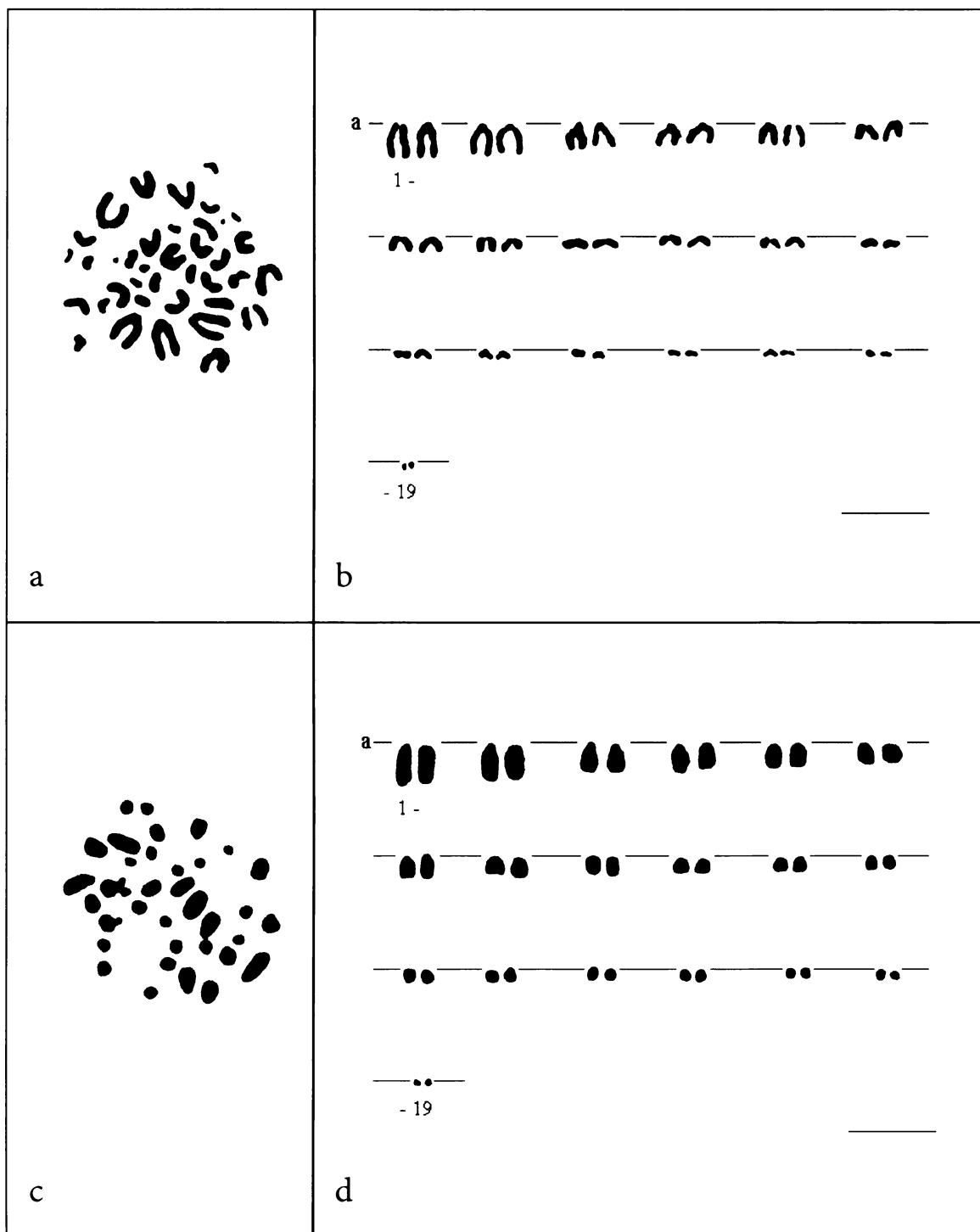




Obr.12 Metafázní chromosomy (a, c) a odpovídající karyotypy sestavené z chromosomů barvených Giemsovým barvivem (b, d) samice (a, b) a samce (c, d) *Goniurosaurus araneus*; a - akrocentrické chromosomy; měřítko (vpravo dole na b, d) je 10  $\mu$ m

## 2.10. *Goniurosaurus lichtenfelderi*

Všichni studovaní jedinci měli diploidní počet chromosomů  $2n = 38$  (Obr. 13). Karyotyp byl tvořen 19 páry akrocentrických chromosomů. Jejich velikost se postupně snižovala bez výrazného přechodu od makrochromosomů k mikrochromosomům. Pohlavní rozdíly v karyotypu nebyly běžným barvením pozorovány, přestože u tohoto druhu rozhodují o pohlaví genetické faktory (Kratochvíl - vlastní data).

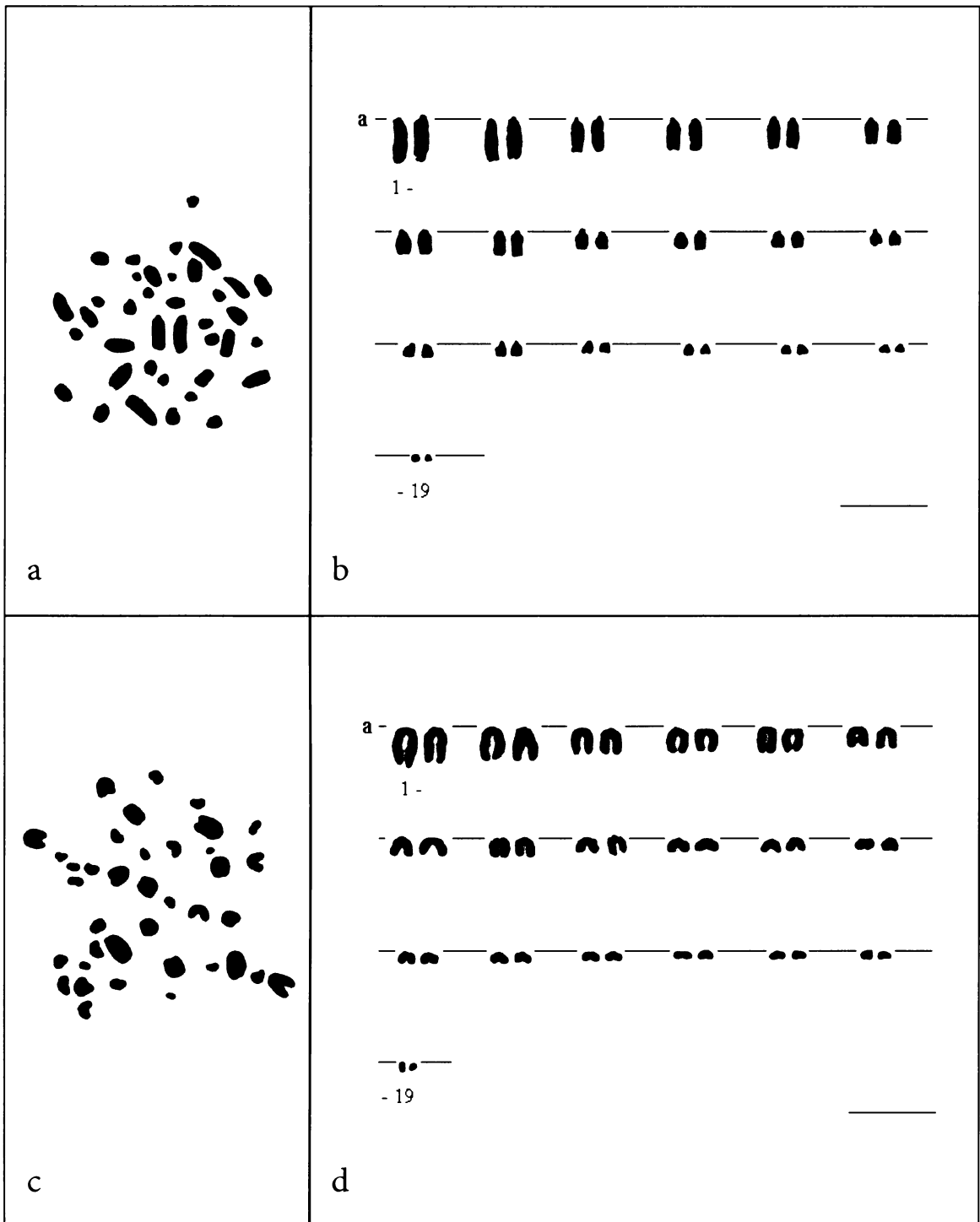


Obr.13 Metafázní chromosomy (a, c) a odpovídající karyotypy sestavené z chromosomů barvených Giemsovým barvivem (b, d) samice (a, b) a samce (c, d) *Goniurosaurus lichtenfelderi*;

a - akrocentrické chromosomy; měřítko (vpravo dole na b, d) je 10  $\mu\text{m}$

### 2.11. *Goniurosaurus luii*

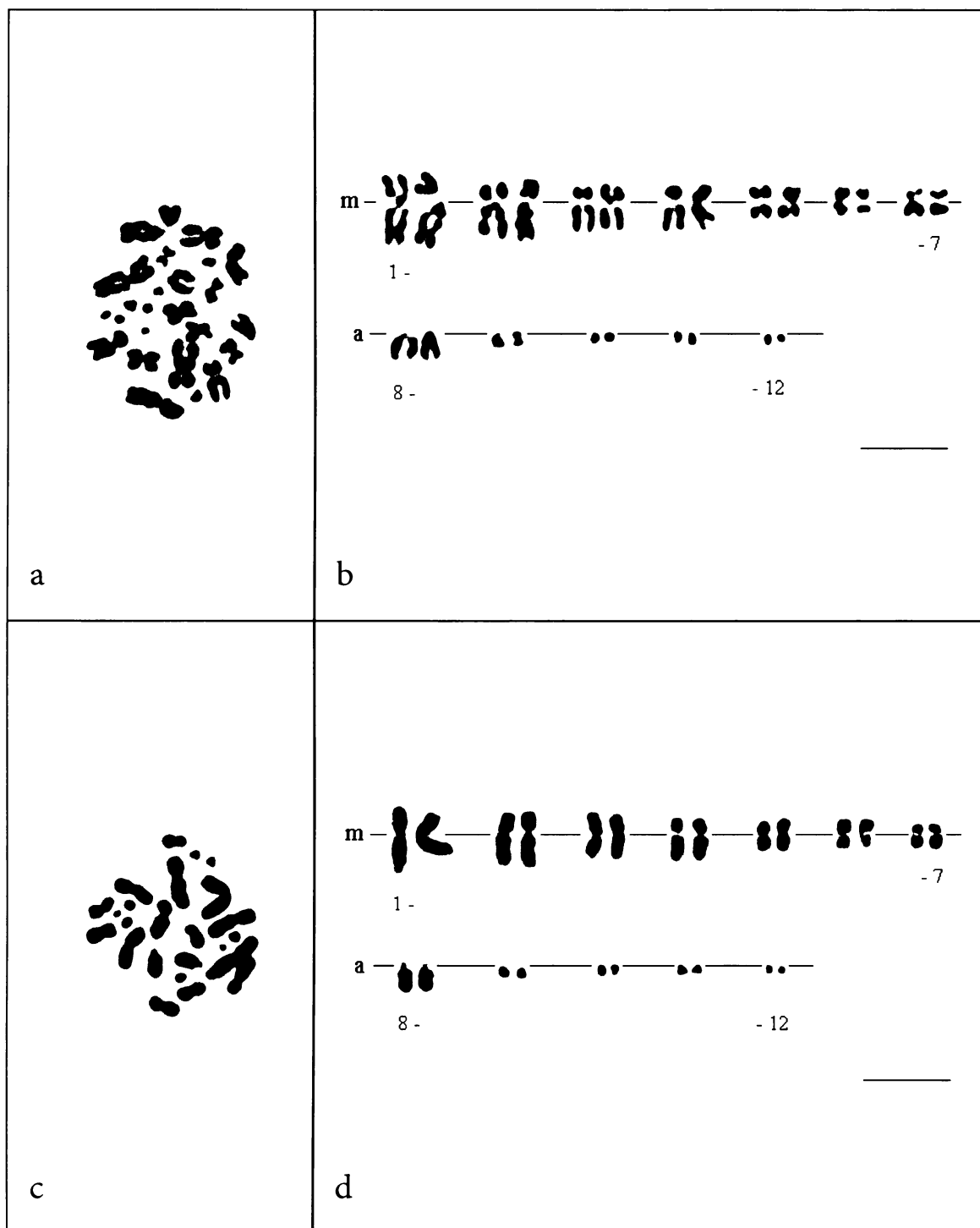
U všech studovaných jedinců byl diploidní počet chromosomů  $2n = 38$  (obr. 14). Všechny chromosomy byly akrocentrické. Velikost se od prvního páru k poslednímu postupně snižovala. Stejně jako u předchozího druhu rodu *Goniurosaurus* i druhu *G. luii* bylo s pomocí pokusů s inkubační teplotou pozorováno genetické určení pohlaví (Kratochvíl – vlastní data). Pohlavní chromosomy však nebyly běžným barvením odhaleny.



Obr. 14 Metafázní chromosomy (a, c) a odpovídající karyotypy sestavené z chromosomů barvených Giemsovým barvivem (b, d) samice (a, b) a samce (c, d) *Goniurosaurus luii*; a - akrocentrické chromosomy; měřítko (vpravo dole na b, d) je 10  $\mu\text{m}$

## 2.12. *Goniurosaurus splendens*

U všech studovaných jedinců byl diploidní počet chromosomů  $2n = 24$  (Obr.15). Karyotyp byl tvořen 7 páry metacentrických chromosomů a 5 páry akrocentrických chromosomů. Akrocentrické chromosomy byly tvořeny jedním párem (pár č. 8) střední velikosti, srovnatelné s velikostí páru č. 5 nebo páru č. 6 a čtyřmi páry mikrochromosomů. Pohlavní rozdíly v karyotypu nebyly běžným barvením pozorovány. Počet chromosomových ramen byl  $NF = 38$ .



Obr. 15 Metafázní chromosomy (a, c) a odpovídající karyotypy sestavené z chromosomů barvených Giemsovým barvivem (b, d) samice (a, b) a samce (c, d) *Goniurosaurus splendens*; m - metacentrické chromosomy; a - akrocentrické chromosomy; měřítko (vpravo dole na b, d) je 10  $\mu\text{m}$

## 5. Diskuse

### 1. Zhodnocení použitých cytogenetických metod

V průběhu řešení diplomové práce bylo testováno několik cytogenetických technik s cílem nalézt a optimalizovat takovou metodu, jež by umožňovala získávání kvalitních chromosomových preparátů z drobných druhů plazů pokud možno nedestruktivním způsobem. Těmto požadavkům po zkušenostech nejlépe odpovídala metoda kultivace leukocytů, jejíž podmínky se podařily optimalizovat i na velice malé množství použité periferní krve. Pro zástupce taxonu Gekkota tato metoda není používána. V rámci plazů byla použita pro získání metafázních chromosomů u agamy bradaté (*Pogona vitticeps*) a dlouhokrčky australské (*Chelodina longicollis*) (Ezaz et al. 2005; Ezaz et al. 2006). V obou případech však autoři použili více než 100  $\mu$ l periferní krve. Také čas a teplota kultivace musí být pro každou skupinu optimalizována.

Dobrých výsledků bylo mnohdy dosaženo i preparací chromosomů z regenerující tkáně. Je to metoda, která u plazů byla patrně použita k získání chromosomových preparátů vůbec poprvé. Její modifikace testovaná v této práci umožňuje získat chromosomové preparáty zejména z velmi drobných druhů gekončků, u nichž je odběr krve pro účely kultivace velmi obtížný. Metoda byla dosud s velmi dobrými výsledky použita pro získání chromosomových preparátů z regenerující ploutve ryb (Völker 2006). Pro použití u zástupců čeledi Eublepharidae bylo nutné oproti původnímu protokolu výrazně zkrátit dobu působení kultivačního roztoku na malý kousek odebrané tkáně.

Kvalitní preparáty je možno získat také preparací chromosomů z různých typů tkání (zejména z kostní dřevě a z varlat). Tyto metody však vyžadují usmrcení pokusných jedinců, takže nevyhovují zcela nárokům kladených v této práci na metodický aparát. V cytogenetice plazů jsou však tyto metody nejrozšířenější a jejich použití je ve většině případů technicky nenáročné. V rámci studia chromosomů u taxonu Gekkota se setkáváme téměř výhradně s metodami preparace z kostní dřevě (McBee et al. 1987; Moritz 1987; Ota & Hikida 1989; Matthey 1933; Ota et al. 1987), z tenkého střeva (King 1976; King & Rofe 1976; King 1982; King et al. 1982; King 1983; King 1984; Moritz 1987; Murphy 1974) nebo z varlat (King & Rofe 1976; King 1976; Werner 1956).

Z jednotlivých testovaných metod diferenciálního barvení se velice dobře osvědčila impregnace stříbrem, jež vizualizovala stejné chromosomové úseky téměř u všech vyšetřovaných metafází. Naopak vizualizace konstitutivního heterochromatinu



prostřednictvím C-pruhů nebylo dosaženo ani v jednom případě, přestože bylo experimentováno s časy denaturace i renaturace chromosomového materiálu. Podobně pokusy s diferenciálním barvením pomocí Chromomycinu A3 u druhu *Coleonyx elegans* nezpůsobily na chromosomech žádné jednoznačné vzory. Z několika případů je zřejmé, že Chromomycin A3 jeví tendenci vázat se na heterochromatinizovaná místa na chromosomech (tedy do oblastí centromer; viz Obr. 3c). Tyto signály jsou ale velmi slabé a ve většině případů nejsou na chromosomech patrné žádné specificky vizualizovatelné oblasti. U zástupců čeledi Eublepharidae byly k vyšetření chromosomů metody barvení pomocí Chromomycinu, DAPI a C-pruhování použity poprvé. C-pruhování však bylo použito u některých zástupců příbuzných linií. Metodika těchto prací se v zásadě shoduje s metodikou použitou v této práci. V případě citovaných prací však C-pruhování vytvářelo na chromosomech gekonů rodu *Gehyra*, *Phyllodactylus* a *Nactus* očekávaný vzor (King & Rofe 1976; King 1984; Moritz 1987). Telomerická sonda hybridizovala na chromosomech samce druhu *Coleonyx elegans* specificky na telomerické sekvence, aniž by vizualizovala jakékoli intersticiální signály v metacentrickém chromosomu, jež je součástí karyotypu samců tohoto druhu. Celogenomová sonda připravená z DNA samce při použití DNA samice jako kompetitorové DNA nehybridizovala pouze v oblasti pohlavního chromosomu, ale nasedala patrně na heterochromatinizované úseky chromosomů. Jmenované hybridizační techniky nebyly na chromosomech zástupců čeledi Eublepharidae dosud nikdy testovány. Komparativní genomová hybridizace, stejně jako kultivace leukocytů, byla u plazů použita u druhů *Pogona vitticeps* a *Chelodina longicollis*, u kterých umožnila identifikovat pohlavní chromosomy, u těchto druhů běžnými cytogenetickými metodami neodhalitelné (Ezaz et al. 2005; Ezaz et al. 2006).

## 2. Karyotypová evoluce v čeledi Eublepharidae

Do této chvíle byl karyotyp popsán přibližně pro 167 z celkového počtu více než 975 druhů skupiny Gekkota (Olmo 2005). Ve skupině Eublepharidae byl karyotyp předešlými autory popsán pro čtyři druhy (*Eublepharis macularius*  $2n = 38$ ; *Coleonyx variegatus*  $2n = 32$ ; *Coleonyx switaki*  $2n = 24$ ; *Goniurosaurus splendens*  $2n = 24$ ). V této práci se podařilo popsat karyotyp dalších 9 druhů, které dosud nebyly cytogeneticky studovány. U dvou druhů (*Eublepharis macularius* a *Coleonyx variegatus*) byly výsledky předchozích studií ověřeny a doplněny. U druhů *Eublepharis macularius*, *E. angramainyu*, *Hemitheconyx caudicinctus*, *Holodactylus africanus*, *Goniurosaurus araneus*, *G. lichtenfelderi* a *G. luii* byl diploidní počet chromosomů v karyotypu obou pohlaví  $2n = 38$ . Velikost chromosomů se postupně snižuje bez zřetelného přechodu mezi makrochromosomy a mikrochromosomy. Morfologicky podobný karyotyp byl pozorován i u jiných druhů skupiny Gekkota a je označován za typický „gekoní“ karyotyp, tedy karyotyp tvořený 32 – 46 akrocentrickými nebo subtelocentrickými chromosomy (Gorman 1973; King 1990). Na základě informací o karyotypech v čeledi Eublepharidae získaných při řešení této práce není možné jednoznačně určit ancestrální typ karyotypu. Vzhledem k tomu, že i u ostatních příbuzných linií se často vyskytuje popsáný typ karyotypu, je možné usuzovat, že i pro gekončíky by mohl být takový karyotyp původní. Velké metacentrické chromosomy jsou v karyotypech zástupců taxonu Gekkota spíše vzácností (Gorman 1973; King 1990).

Nicméně v karyotypu některých zástupců studované čeledi byly velké metacentrické chromosomy nalezeny. Karyotyp druhu *Goniurosaurus splendens* je tvořen sedmi páry metacentrických chromosomů, jedním akrocentrickým párem střední velikosti a čtyřmi páry mikrochromosomů, rozdíl v karyotypu mezi pohlavími nebyl nalezen. Stejný karyotyp byl popsán i u velmi blízce příbuzného druhu *Goniurosaurus kuroiwae* (Ota et al. 1987). Počet chromosomových ramen u obou druhů je  $NF = 38$ , tedy stejný jako u ostatních studovaných zástupců rodu a sesterské afroasijské linie (oba studované druhy rodu *Eublepharis*, *Hemitheconyx caudicinctus*, *Holodactylus africanus*). Takový stav jasně poukazuje na vznik odvozeného karyotypu japonských druhů rodu *Goniurosaurus* prostřednictvím sedmi evolučně fixovaných centrických fúzí Robertsonovského typu (Slijepcevic 1998). V obou případech se jedná o druhy s pravděpodobně omezeným areálem (ostrovy). Podle teorie, kterou navrhl Qumsiyeh (1994), je snižování počtu chromosomů evolučně výhodné spíše u druhů žijících ve stabilním prostředí umožňujícím vznik koadaptovaných genomů a osidlujících úzké ekologické niky v malém geografickém

rozsahu. K fixaci karyotypových změn pak může docházet v malých populacích driftem. U společného předka *G. kuroiwae* a *G. splendens* tedy mohl vzniknout odvozený karyotyp zafixováním centrických fúzí po průniku malé populace do nového prostředí na ostrovech. Driftem zafixované změny karyotypu by pak mohly sloužit jako reprodukčně izolační bariéra (King 1993).

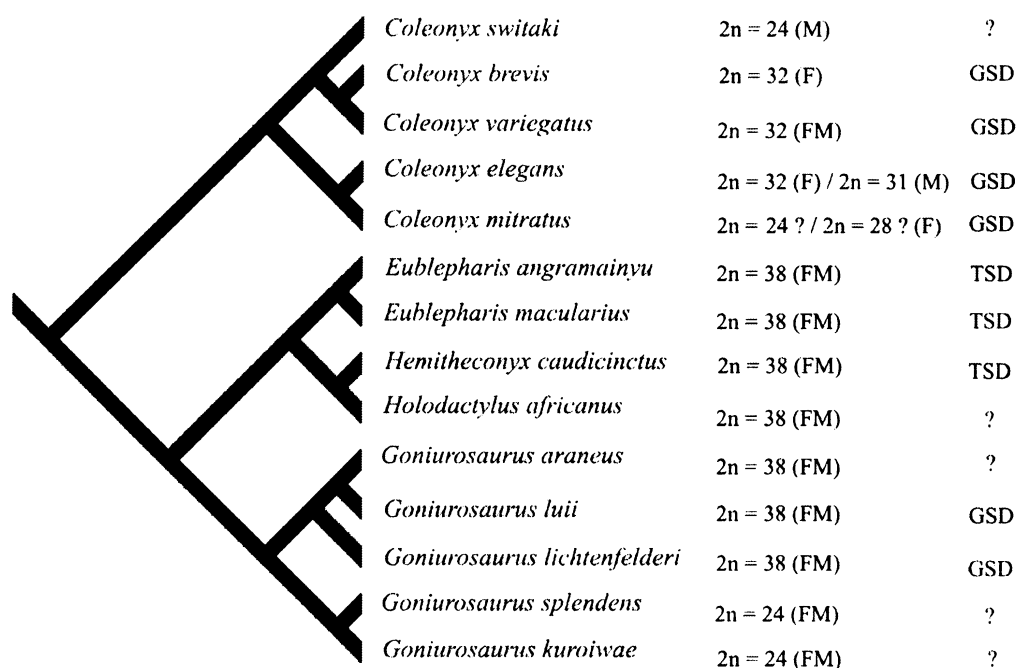
V rámci rodu *Coleonyx* byly nalezeny v zásadě dvě formy karyotypu. První z nich je karyotyp s diploidním počtem chromosomů  $2n = 32$ , vyskytující se u druhů *C. brevis* a *C. variegatus* patřících do severoamerické skupiny gekončků osidlujících aridní biotopy. Tento typ karyotypu byl nalezen i u druhu *C. elegans*, který je součástí středoamerické tropické linie. V obou skupinách se vyskytují také druhy s nižším počtem chromosomů. V průběhu evoluce mohlo tedy docházet k redukci počtu chromosomů prostřednictvím fúzí, stejně jako ke zvyšování jejich počtu chromosomovým štěpením. Na základě porovnání výsledků počtu chromosomů u jednotlivých druhů s fylogenetickým stromem čeledi je však možné usuzovat, že diploidní počet chromosomů  $2n = 32$  je s větší pravděpodobností původním stavem pro rod *Coleonyx*.

V předchozích studiích byl popsán karyotyp pro druh *Coleonyx variegatus* (Matthey 1933) a *Coleonyx switaki* (Murphy 1974). Matthey (1933) u druhu *Coleonyx variegatus* studoval pouze samce, počet chromosomů stanovil na  $2n = 32$ . V této práci byl studován karyotyp samce i samice tohoto druhu a u obou pohlaví byl počet chromosomů v diploidním stavu  $2n = 32$ . U druhu *Coleonyx switaki* byl popsán karyotyp s diploidním počtem chromosomů  $2n = 24$ . Podle popisu obsahuje karyotyp čtyři páry velkých metacentrických chromosomů, jeden pár akrocentriků střední velikosti a sedm párů drobných metacentrických chromosomů (Murphy 1974). Počet chromosomových ramen je tedy v tomto případě  $NF = 46$ . Pokud by tedy tento typ karyotypu vznikl z původního počtu  $2n = 32$  (kdy všechny chromosomy jsou akrocentrické), nevznikl pouze Robertsonovskými translokacemi. Na základě obrázku dokumentujícího karyotyp u *C. switaki* v původní práci však není jednoznačné, zda sedm drobných metacentrických párů jsou skutečně metacentrické chromosomy. Pokud by to totiž bylo sedm párů akrocentrických chromosomů, byl by počet chromosomových ramen  $NF = 32$  a velké metacentrické chromosomy by byly výsledkem zafixovaných centrických fúzí; takovou interpretaci však autor nepřipouští. Nicméně podle dosud publikovaných údajů nebyly zatím u žádného jiného druhu taxonu Gekkota objeveny takto drobné metacentrické chromosomy (Olmo 2005). K jednoznačnému rozřešení této situace je nezbytné nové cytogenetické vyšetření zástupců druhu *C. switaki*; získat jedince tohoto druhu je však nesmírně obtížné.

V této práci byl nalezen velký matacentrický chromosom také u dalšího zástupce rodu *Coleonyx*, a to konkrétně u samce druhu *Coleonyx elegans* ( $2n = 31$ ). Tento chromosom byl identifikován jako pohlavní chromosom Y vzniklý prostřednictvím centrické fúze původního akrocentrického chromosomu Y s akrocentrickým autosome (viz níže).

Během řešení diplomové práce se však nepodařilo jednoznačně vyřešit situaci pozorovanou u druhu *Coleonyx mitratus*, který je sesterským druhem k druhu *Coleonyx elegans*. Obr. 6 dokumentuje, že u některých jedinců tohoto druhu stejného pohlaví byl nalezen různý počet chromosomů. U pěti metafází samce a pěti metafází samice byl počet chromosomů v rozmezí 23 – 24 chromosomů. U jedné metafáze samce byl počet stanoven na 28 chromosomů a u čtyř metafází samice bylo napočítáno taktéž 28 chromosomů. Velikost studovaného vzorku nebyla příliš vysoká a kvalita chromosomových preparátů samců neumožnila jednoznačný popis morfologie chromosomů. Nicméně v karyotypu samců i samic byl ve většině případů nalezen jeden metacentrický chromosom, který svou velikostí přesahuje velikost v pořadí dalších největších chromosomů. Karyotyp jedné ze samic (Obr. 6a, b) obsahuje diploidní počet chromosomů  $2n = 24$ . Je tvořen pěti páry metacentrických chromosomů a sedmi páry akrocentrických chromosomů. Pár č. 1 byl výrazně větší než zbývající páry chromosomů, přičemž i v rámci tohoto páru je patrný výrazný velikostní rozdíl, dále se velikost metacentrických i akrocentrických chromosomů snižovala postupně. Počet chromosomových ramen byl  $NF = 34$ . Ve druhém případě (Obr. 6c, d) byl počet chromosomů v diploidním stavu  $2n = 28$ . Karyotyp byl tvořen dvěma páry metacentrických a dvanácti páry akrocentrických chromosomů. Mezi chromosomy prvního páru byl výrazný rozdíl ve velikosti. Stejně tak byl velikostní rozdíl mezi prvním párem a ostatními chromosomovými páry, jejichž velikost klesala postupně. Počet chromosomových ramen byl  $NF = 32$ . V obou případech byly od stejného jedince zachyceny ještě další dvě metafáze se stejným počtem chromosomů. V případě karyotypu se dvěma metacentrickými páry a počtem chromosomových ramen  $NF = 32$  se nabízí jako možné vysvětlení vzniku tohoto typu karyotypu z původních 32 akrocentrických chromosomů Robertsonská fúze. V případě druhého typu karyotypu s celkovým počtem chromosomových ramen  $NF = 34$  však není toto vysvětlení dostačující a na vzniku takového karyotypu se muselo podílet patrně více typů chromosomových přestaveb. Na základě těchto výsledků je však zřejmé, že uvnitř druhu *C. mitratus* existuje jistá variabilita v počtech chromosomů, aniž by byla pozorována variabilita v morfologii nebo behaviorálních znacích. Podobná situace byla pozorována mnohokrát u mnoha taxonů a v řadě případů upozornila na do té doby neviděné rozdíly mezi dvěma karyotypovými formami, jež v důsledku vedly

k popisu samostatných druhů. Všichni jedinci druhu *C. mitratus* studovaní v této práci byli zakoupeni jako terarijní zvířata a o jejich původu neexistují žádné spolehlivé informace. Z ústního sdělení prodejce však vyplývá, že někteří jedinci by mohli být původem z lokality v Hondurasu a jiní z Panamy. Nicméně aktuální rozšíření tohoto druhu je v současnosti známé značně nepřesně (Seufer et al. 2005). Pro rozřešení situace uvnitř tohoto druhu jsou nezbytné další cytogenetické studie (zejména vyšetření karyotypu samců), případně další typy pokusů, např. test, zda se mezi sebou jednotlivé karyotypové formy kříží.



Obr. 16 Fylogenetický strom podle Starostové (ústní sdělení) a Grismera (1988) s vnesenými zjištěními a publikovanými daty o karyotypech a způsobu determinace pohlaví. (M) popis karyotypu samce; (F) popis karyotypu samice (FM) popis karyotypu obou pohlaví

Na základě výsledků o počtech chromosomů u studovaných druhů čeledi Eublepharidae je možné uvažovat o směru přechodů mezi jednotlivými typy karyotypu. Fylogenetickými metodami jsou však takové závěry nezachytitelné, jelikož tyto metody nemohou posoudit rysy individuálních karyotypových znaků. Ancestrálním stavem pro monofylum rodů *Eublepharis*, *Hemitheconyx* a *Holodactylus* je diploidní počet chromosomů  $2n = 38$  (viz Obr. 16), stejně jako pro gekončíky rodu *Goniurosaurus*. Jelikož podle výsledků fylogenetické analýzy evoluce ještěřů čeledi Eublepharidae založené na kombinaci morfologických a molekulárních dat (Starostová- vlastní data; Grismer 1988) jsou k sobě jmenovaná monofyla sesterská, je možné konstatovat, že pro celé toto monofylum

je původním stavem diploidní počet chromosomů  $2n = 38$ . Jak je patrné z Obr. 2, 3, 4 a 6 společným rysem karyotypů zástupců rodu *Coleonyx* s  $2n = 31$  nebo  $2n = 32$  je zřetelný rozdíl ve velikosti prvních tří párů chromosomů vzhledem ke čtvrtému chromosomovému páru. Taková skutečnost naznačuje, že v evoluci mohlo docházet k snižování počtu chromosomů prostřednictvím tandemových fúzí. Nejznámějším příkladem snižování počtu chromosomů tímto způsobem je bezesporu situace popsána u rodu muntžak. Např. u druhu *Muntiacus reevesi* je diploidní počet chromosomů  $2n = 46$ . Na rozdíl od toho u muntžaků *M. muntiacus vaginalis* ( $2n = 6/7$ ) a *M. crinifrons* ( $2n = 8/9$ ) je počet chromosomů značně redukován. Srovnáním různých pruhovacích metod a zejména výsledků metod molekulární cytogenetiky (mapování telomerických a centromerických sekvencí, hybridizace s chromosomově specifickými sondami nebo mapování sekvencí genomové knihovny) bylo prokázáno, že všechny tandemové fúze způsobující výraznou karyotypovou diferenciaci vznikaly fúzí v oblasti centromery na jedné straně a telomery na straně druhé (Huang et al. 2006). K ověření původu karyotypu u rodu *Coleonyx* je bezesporu nutné podrobit jednotlivé druhy tohoto rodu studiu pomocí pokročilých technik molekulární cytogenetiky. Pokud by ale v evoluci tohoto taxonu docházelo k tandemovým fúzím, bylo by možné se domnívat, že původním stavem pro celou čeleď Eublepharidae je diploidní počet chromosomů  $2n = 38$ . O ancestrálním karyotypu čeledi Eublepharidae však není možné jednoznačně rozhodnout. K rozřešení této situace by napomohlo zařazení outgroup se známým karyotypem do fylogenetického stromu. Fylogeneticky nejbližším taxonem je čeleď Gekkonidae (Han et al. 2004). Uvnitř této skupiny jsou však fylogenetické vztahy dosud nerozřešeny. V počtu a morfologii chromosomů panuje v této skupině poměrně vysoká variabilita ( $2n = 36 - 46$ ). V řadě případů je však karyotyp tvořen akrocentrickými chromosomy, jejichž velikost postupně klesá (Gorman 1973; Olmo 2005).

### 3. Pohlavní chromosomy, jejich evoluce a jejich souvislost s pohlavně determináčními mechanismy

Ve skupině Gekkota nalézáme dobře dokumentovanou variabilitu v pohlavně determináčních mechanismech (Pokorná & Kratochvíl, nepubl. rukopis). U mnohých druhů však informace o způsobu určení pohlaví stále schází. Dosud pouze pět studovaných druhů čeledi Diplodactylidae má shodně teplotně určené pohlaví (Harlow 2004); z čeledi Pygopodidae byly studovány dva druhy a oba mají pohlaví určeno geneticky a to s vysoce diferencovanými pohlavními chromosomy typu XX/XY (Gorman & Gress 1970; King 1990). Typ pohlavní determinace u druhů čeledi Carphodactylidae dosud studován nebyl. Uvnitř čeledí Gekkonidae a Eublepharidae jsou zastoupeny druhy s teplotním i s genetickým určením pohlaví (Bragg et al. 2000; Rhen & Crews 2000; Viets et al. 1993; Viets et al. 1994; Kratochvíl - vlastní data). Celkově byl způsob determinace pohlaví studován u 45 druhů skupiny Gekkota. V rámci skupiny byly u některých GSD druhů nalezeny pohlavní chromosomy typu XY a u jiných typu ZW (Olmo 2005). Pohlavní chromosomy byly dosud identifikovány u 16 z celkového počtu více než 975 druhů tohoto taxonu. V čeledi Eublepharidae, kde nacházíme GSD i TSD druhy nebyly dosud pohlavní chromosomy studovány.

V této práci se podařilo nashromáždit údaje o karyotypech pro 12 druhů gekončků. U druhů, u nichž byl pokus s poměrem pohlaví při inkubaci vajec ve škále konstantních teplot nalezen při všech studovaných teplotách vyrovnaný poměr pohlaví mláďat, a je tedy předpokládáno GSD, byl kladen důraz na odhalení pohlavních rozdílů v karyotypu. U většiny druhů však takové rozdíly nalezeny nebyly a karyotyp samce a samice se nelišil. U druhů *Coleonyx variegatus*, *Goniurosaurus lichtenfelderi* a *G. luii*, kde bylo GSD pozorováno (Viets et al. 1994; Kratochvíl - vlastní data), jsou pohlavní chromosomy s největší pravděpodobností homomorfní, a tedy běžnými cytogenetickými metodami neodhalitelné. Jelikož druh *G. araneus* je sesterským druhem ke *G. luii*, u něhož bylo zjištěno GSD, je možné se na základě podobnosti karyotypu i komplexní podobnosti těchto druhů domnívat, že i u druhu *G. araneus* jsou v karyotypu přítomny homomorfní pohlavní chromosomy, přestože způsob determinace pohlaví u tohoto druhu nebyl dosud studován. V této práci byli studiu karyotypu obou pohlaví podrobeni i zástupci druhu *Holodactylus africanus*, u kterého nejsou o způsobu determinace pohlaví žádné záznamy. V karyotypu nebyl nalezen žádný pohlavní rozdíl. Nejbližším příbuzným druhem zastoupeným v souboru druhů studovaných v této práci je *Hemitheconyx caudicinctus*, u něž bylo pozorováno TSD (Bragg et al. 2000).

Součástí této práce je i popis karyotypu tohoto a dvou dalších TSD druhů (*Eublepharis angramainyu*; *Eublepharis macularius*). Stejně jako u GSD druhů byla studována obě pohlaví. Podle očekávání nebyly nalezeny žádné rozdíly v karyotypech samic a samců.

Předpokládá se, že je po vzniku oddělených pohlaví výhodné, aby byly geny pro určení obou pohlaví nesené odlišnými chromosomy, mezi nimiž by nedocházelo ke crossing-overu, který by mohl zapříčinit vznik inersexů (Charlesworth & Charlesworth 2000; Charlesworth 2002). Tento jev způsobuje, že budou preferovány mechanismy vedoucí k diferenciaci vznikajících pohlavních chromosomů uvnitř páru. Homomorfní pohlavní chromosomy tedy podle tohoto modelu vznikly v evoluci poměrně nedávno a my pozorujeme jejich diferenciaci v počátečních stádiích (Charlesworth 2002). Takové pohlavní chromosomy je možné odhalit pomocí citlivějších metod molekulární cytogenetiky, např. pomocí komparativní genomové hybridizace. V této práci však druhy s homomorfními pohlavními chromosomy touto metodou z technických a finančních důvodů studovány nebyly. U druhu *G. kuroiwae*, u něhož nebyly prováděny pokusy na zjištění způsobu určení pohlaví, autoři nepozorovali žádné rozdíly v karyotypu samců a samic (Ota et al. 1987). I během řešení této práce nebyl nalezen žádný pohlavní rozdíl v karyotypu u druhu *G. splendens*, jež je blíže příbuzný druhu *G. kuroiwae* a u něhož rovněž není znám způsob pohlavní determinace.

Protože způsob determinace pohlaví je dosti fylogeneticky konzervativní, je možné předpokládat, že u druhů rodu *Goniurosaurus* a *Coleonyx*, u nichž nebyl dosud studován způsob determinace pohlaví, bude v budoucích studiích nalezen genetický způsob určení pohlaví, jež byl pozorován u jejich sesterských druhů, zatímco u druhu *Holodactylus africanus* by to mohl být ze stejného důvodu způsob teplotní. Z fylogenetické analýzy evoluce pohlavně determinačních mechanismů pro šupinaté plazy vyplývá, že ancestrálním stavem pro celou čeleď Eublepharidae stejně jako pro celý taxon Gekkota je TSD (Pokorná & Kratochvíl, nepubl. rukopis). GSD tedy pravděpodobně vzniklo v rodu *Goniurosaurus* a *Coleonyx* nezávisle, a tedy i pohlavní chromosomy v těchto liniích by mohly vzniknout nezávisle. Toto tvrzení by mohlo být testováno studiem pohlavních chromosomů pomocí mezidruhových hybridizačních technik, bude-li však možné u druhů s homomorfními pohlavními chromosomy identifikovat konkrétní chromosomový pár, jež nese pohlavně specifické sekvence.

Konvenčním barvením se během řešení této práce podařilo odhalit pohlavní chromosomy u druhu *Coleonyx elegans*. Samci tohoto druhu mají v karyotypu jeden velký metacentrický chromosom a jejich diploidní počet chromosomů je  $2n = 31$ . Samice mají v karyotypu diploidní počet chromosomů  $2n = 32$  a všechny chromosomy jsou akrocentrické.

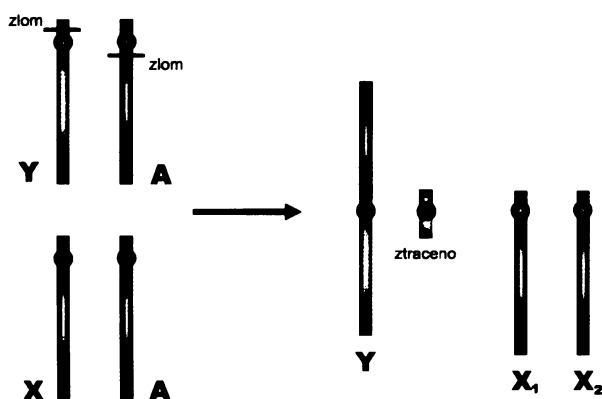


Jelikož celkový počet chromosomových ramen samčího karyotypu je  $NF = 32$ , poukazuje takový stav jasně na to, že původ metacentrického chromosomu je dán zafixovanou centrickou fúzí mezi původním Y chromosomem a jedním z autosomů. V rámci celého taxonu Gekkota byl do současnosti takový typ pohlavních chromosomů popsán pouze u jediného druhu, a to u *Lialis burtonis* z čeledi Pygopodidae (Gorman & Gress 1970), která je však fylogeneticky dosti vzdálená od čeledi Eublepharidae. Nicméně v rámci šupinatých plazů byl tento způsob zaznamenán i u některých druhů leguánů čeledi Phrynosomatidae a Polychrotidae (De Smet 1981).

Již při běžném barvení Giemsovým barvivem byla v karyotypu samce *Coleonyx elegans* patrná sekundární konstriktice na jednom rameni metacentrického chromosomu a na jednom akrocentrickém chromosomu střední velikosti. S pomocí impregnace stříbrem bylo prokázáno, že tyto konstriktice jsou oblastmi organizátorů jadérka. Jelikož byly stříbrné signály nalezeny pouze na polovině metacentrického chromosomu a jednom chromosomu akrocentrickém, jež velikostí odpovídá polovině metacentriku, můžeme konstatovat, že tyto chromosomy jsou pravděpodobně původní Y chromosom a původní X. U samic tohoto druhu byly sekundární konstriktice neleženy na dvou chromosomech střední velikosti. Fluorescenčním barvením pomocí DAPI byly ve stejných oblastech patrné negativní signály stejně jako v místech těchto konstrikcí u samců. Jelikož DAPI se váže přednostně na AT bohaté sekvence, je zřejmé, že oblasti sekundárních konstrikcí nejsou na tyto sekvence bohaté. Po impregnaci stříbrem byly v týchž místech na jmenovaných dvou chromosomech samic identifikovány organizátory jadérka. Tento jev spolu s faktem, že organizátor jadérka leží u samce na pohlavním chromosomu, umožňuje tento pár homologizovat a označit za původní pár samičích pohlavních chromosomů X. U některých druhů taxonu Gekkota byly chromosomy vyšetřovány na přítomnost organizátorů jadérka pomocí impregnace stříbrem. Ve většině případů však byly stříbrné signály nalezeny na více než jednom páru chromosomů (dos Santos et al. 2003; Olmo 2005; Yonenaga-Yassuda 1999). Organizátory jadérka (NOR) jsou místa intenzivní transkripce ribozomální RNA, jež tvoří společně s jadernými proteiny ribosomy. NOR tedy přímo zodpovídá za vznik jadérka, jež je místem vzniku ribozomů. Počet organizátorů jadérka v jádře je druhově specifický a u vyšších eukaryot má ve většině případů stejnou stavbu (Phillips et al. 1989). Vyšetření metafázních chromosomů obou pohlaví druhu *Coleonyx elegans* pomocí sycení Chromomycinem A3, jež se váže na GC bohaté oblasti chromosomů, nevytvořilo na chromosomech žádný specifický vzor. Chromomycin A3 vytváří na chromosomech savců a ptáků standartně klasické R-pruhy, zatímco u ryb a obojživelníků se vizualizují pouze místa, kde lze nalézt

organizátory jadérka po barvení stříbrem (Schmid & Guttenbach 1988). Jelikož byla během experimentů s tímto barvením mnohonásobně zvýšena koncentrace Chromomycinu A3, stejně jako doba sycení chromosomů tímto antibiotikem a nebyl v žádném z případů nalezen specifický vzor, je možné se domnívat, že se nejednalo o chybně provedený postup. To, že se Chromomycin A3 nenařádal na žádné specifické sekvence, vede k závěru, že chromosomy druhu *Coleonyx elegans* zřejmě neobsahují místa s nahromaděnými GC bohatými sekvencemi. Ve stavbě organizátorů jadérka jsou u eukaryotických organismů tyto sekvence obvykle bohatě zastoupeny. Výsledky této práce tedy naznačují, že u gekončíka *C. elegans* by se mohly nalézat odlišnosti ve stavbě organizátorů jadérka. Tyto spekulace je možné testovat sekvenční analýzou DNA v oblasti NOR.

Metafázní chromosomy samce byly dále podrobeny hybridizaci s telomerickou sondou s cílem zjistit, zda v oblasti centromery nově vzniklého metacentrického chromosomu nezůstaly jako důsledek centrické fúze intersticiální telomerické signály dokumentované u některých obratlovců (de Almeida-Toledo et al. 2000; Slijepcevic 1998). Jak je zřejmé z Obr. 4d, nově vzniklý Y chromosom žádné takové signály neobsahuje a sonda hybridizovala pouze s oblastmi telomer. Telomerické oblasti byly tedy během fúze patrně ztraceny, jak bylo dokumentováno např. u většiny savců nebo některých ryb (de Almeida-Toledo et al. 2000; Slijepcevic 1998). Tato zjištění dovolují vytvořit model vzniku  $X_1X_2Y$  systému pohlavních chromosomů (Obr. 17). Podle něj dochází během fúze ke ztrátě telomerických sekvencí obou chromosomů zapojených do fúze a jedné centromerické oblasti; na schématu se jedná o centromeru autosomu. Mohlo však dojít také ke ztrátě centromerické oblasti Y chromosomu. Jelikož však okolí centromery může být místem pohlavně specifických genů, jejichž ztráta by s sebou nesla vážné následky pro determinaci pohlaví, je tato možnost méně pravděpodobná. Možné vysvětlení je i to, že nedošlo ke ztrátě centromerické oblasti, ale pouze k inaktivaci funkce jedné z centromer.



Obr. 17 Pravděpodobné schéma vzniku  $X_1X_2Y$  pohlavních chromosomů prostřednictvím centrické fúze, zahrnující ztrátu centromerické sekvence autosomu (A) a telomerických sekvencí obou chromosomů zapojených do fúze.

U druhu *Coleonyx elegans* byly dále chromosomy vyšetřovány pomocí komparativní genomové hybridizace. Metafázní chromosomy samce hybridizovaly s celogenomovou sondou stejného pohlaví za přítomnosti kompetitorové DNA samice v koncentraci mnohem vyšší, než byla značená sonda. Očekávala jsem, že značená sonda se bude vázat pouze na pohlavně specifické sekvence, jež nebyly vyplněny kompetitorovou samičí DNA a odhalí tak místa pohlavně specifických genů (Ezaz et al. 2005; Traut & Marec 1996). Fluorescenčně značená sonda se však pravděpodobně navázala na všechna místa s vysokým obsahem repetitivních sekvencí (zejména v centromerách), a to na chromosomu Y i na autosomech. Tento výsledek naznačuje, že pohlavní chromosomy, přestože jsou po zafixování centrické fáze morfologicky výrazně odlišené, se genetickým obsahem zřejmě příliš neliší. Takovému tvrzení by nasvědčovala i skutečnost, že u ostatních studovaných GSD druhů čeledi se pohlavní chromosomy nepodařilo odhalit. Pohlavní chromosomy GSD druhů gekončků včetně *C. elegans* se tedy co do genového obsahu liší zřejmě jen velmi malým nerekombinujícím pohlaví determinujícím úsekem, jež nemusí být identifikovatelný ani za použití komparativní genomové hybridizace. Jedná se však zatím o první výsledek a následující studie budou nepochybně vyžadovat další experimenty s koncentracemi kompetitorové DNA a sondy. Nicméně aplikace této metody u druhu *Coleonyx elegans* umožnila homologizovat jednotlivé chromosomové páry; sonda na chromosomech totiž vytvářela specifický vzor. Díky tomu bylo možné identifikovat chromosom  $X_2$ , jež byl s použitím všech předchozích barvicích technik nerozpoznatelný a v karyotypu barveném Giemsovým barvivem byl začleněn do trojice pohlavních chromosomů pouze na základě velikosti. Stejně tak byl přiřazen k jasně identifikovaným chromosomům  $X_1X_1$  druhý pár pohlavních chromosomů ( $X_2X_2$ ) v karyotypu samice, kde se experiment s komparativní genomovou hybridizací nezdařil.

Preparace chromosomů z varlat samců *Coleonyx elegans* umožnila jasně identifikovat trivalent tvořený chromosomy  $X_1X_2Y$  v diaknezi I. meiotického dělení (Obr. 5a, b). V některých případech byla chiasmata (místa po prodělaném crossing-overu) v subterminální (Obr. 5b), v jiných případech v terminální pozici (Obr. 5a). Intersticiální poloha chiasmata nebyla zaznamenána. V metafázi II. meiotického dělení (Obr. 5c), kdy dochází k disociaci sesterských chromatid, které jsou však stále spojeny centromerou, jsou zřetelně vidět dvě nově vznikající jádra pohlavních buněk, přičemž jedno z nich dědí 14 chromosomů + metacentrický chromosom Y a druhé 14 chromosomů + dva akrocentrické chromosomy  $X_1$  a  $X_2$ . Ve většině pozorovaných metafází II. meiotického dělení u samců *Coleonyx elegans* se metacentrický chromosom Y nacházel na vnějším okraji metafáze.

U druhu *Coleonyx variegatus*, u něhož bylo pozorováno GSD, nebyly běžnými cytogenetickými metodami pohlavní chromosomy identifikovány a karyotyp samce i samice tohoto druhu vykazuje shodně diploidní počet chromosomů  $2n = 32$ . Pohlavní chromosomy jsou tedy s největší pravděpodobností homomorfní. Vzhledem k tomu, že pohlavní chromosom u *C. elegans* vznikl centrickou fúzí, jedná se patrně o pokročilejší stádium diferenciaci (viz Charlesworth & Charlesworth 2000; Charlesworth 2002), které je apomorfií tohoto druhu. Zdá se tedy, že homomorfní pohlavní chromosomy jsou pro celý rod *Coleonyx* původním stavem. Jelikož i druhy bez diferencovaných pohlavních chromosomů vykazují genetické určení pohlaví a v jejich genomu se tedy pravděpodobně vyskytuje specifický gen determinující pohlaví, je velmi pravděpodobné, že u druhu *C. elegans* není pohlaví určováno vlastní existencí centrické fúze, ale přítomností jiných pohlavně determinačních faktorů na pohlavních chromosomech.

Uvnitř čeledi Eublepharidae nepochybně docházelo k diferenciaci karyotypu. Další studium chromosomových přestaveb může v budoucnu přinést zajímavá zjištění, která bude možné dát do souvislosti s již navrženými hypotézami o evolučních souvislostech změn karyotypu. Studium pohlavních chromosomů ve skupině, která zahrnuje GSD i TSD druhy může naopak přinést hodnotné informace, které napomohou lepšímu pochopení způsobu diferenciaci pohlavních chromosomů a evolučních procesů, které k diferenciaci vedou. Zejména pokud by bylo možné homologizovat pár pohlavních chromosomů mezi jednotlivými GSD druhy anebo nalézt homologie mezi pohlavním chromosomem u GSD druhů a párem autosomů TSD druhů. A to zvláště v situaci, kdy neexistují žádné informace o vrcholu kaskády determinující pohlaví u TSD druhů. Pro lepší pochopení mechanismů určení pohlaví je také nezbytné pokusit se identifikovat pohlavně specifické geny na pohlavních chromosomech a porovnat takové informace s již známými údaji o genech určení pohlaví u ostatních skupin obratlovců.

## 6. Závěr

Během řešení diplomové práce byl studován karyotyp u dvanácti druhů čeledi Eublepharidae. Na základě výsledků je možné konstatovat, že v rámci této skupiny docházelo k diferenciaci karyotypu prostřednictvím fixace Robertsonovských fúzí a s největší pravděpodobností i tandemových fúzí, a to v rámci rodů *Coleonyx* a *Goniurosaurus*. Porovnáním výsledků se známými fylogenetickými vztahy uvnitř čeledi jsem dospěla k závěru, že ancestrálním stavem je pravděpodobně diploidní počet chromosomů  $2n = 38$ , kde všechny chromosomy jsou akrocentrické a jejich velikost se postupně snižuje. Karyotypy, v nichž došlo k redukci počtu chromosomů, jsou tedy apomorfií jednotlivých skupin (v rodech *Goniurosaurus* a *Coleonyx*). Vyšetření karyotypu byly podrobeny druhy s teplotním i s genetickým určením pohlaví. Pohlavní chromosomy byly nalezeny pouze u jednoho GSD druhu (*Coleonyx elegans*). U ostatních GSD druhů není rozdíl v karyotypu mezi pohlavími a pohlavní chromosomy jsou s největší pravděpodobností homomorfní. U druhu *Coleonyx elegans* byly nalezeny pohlavní chromosomy typu  $X_1X_1X_2X_2 / X_1X_2Y$ , kde chromosom Y vznikl fixací centrické fúze Robertsonovského typu původního Y chromosomu s autosomem. Na základě vizualizace organizátorů jadérka bylo možné identifikovat původní pár pohlavních chromosomů u obou pohlaví. Po provedení fluorescenční *in situ* hybridizace se specifickou telomerickou sondou nebyly odhaleny žádné intersticiální signály v oblasti centromery metacentrického chromosomu Y. To znamená, že telomerické sekvence původního Y chromosomu a autosomu byly pravděpodobně ztraceny při jejich fúzi. Pomocí komparativní genomové hybridizace bylo možné identifikovat i nově vzniklý X chromosom v karyotypu samce. Vyšetřením meiotických chromosomů byl identifikován trivalent tvořený chromosomy  $X_1X_2Y$  v diakinezi I. meiotického dělení a byl dokumentován rozchod sesterských jader v metafázi II. meiotického dělení.

Výsledky diplomové práce umožnily zhodnotit vhodnost použitých preparačních technik chromosomů u dané skupiny zejména s ohledem na nedestruktivnost postupů. Kombinací s poznanými fylogenetickými vztahy a zjištěnými karyotypovými poměry bylo možné rekonstruovat možný trend diferenciaci karyotypů zejména uvnitř rodů *Goniurosaurus* a *Coleonyx*. Na základě výsledků studia pohlavních chromosomů pak bylo možné odvodit původní stav tohoto znaku v čeledi Eublepharidae a vytvořit model vzniku pohlavních chromosomů u druhu *Coleonyx elegans*.

## 7. Literatura

- Anderson SC (1999) *The lizards of Iran*. Society for the Study of Amphibians and Reptiles
- Ashley T (2002) X-Autosome translocations, meiotic synapsis, chromosome evolution and speciation. *Cytogenetic and Genome Research* 96:33-39
- Baker RJ, Bickham JW (1986) Speciation by monobrachial centric fusions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:8245-8248
- Baroiller JF, Chourrout D, Fostier A, Jalabert B (1995) Temperature and sex chromosomes govern sex ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. *Journal of Experimental Zoology* 273:216-223
- Baroiller JF, Guigen Y, Fostier A (1999) Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55:910-931
- Barr ML, Bertram LF (1949) A morphological distinction between neurones of the male and female and the behavior of the nucleolar satellite during accelerated nucleoprotein synthesis. *Nature* 163: 676-677
- Barton NH, Charlesworth B (1998) Why sex and recombination? *Science* 281:1986-1990
- Basolo AL (1994) The dynamics of fisherian sex-ratio evolution - Theoretical and experimental investigations. *The American Naturalist* 144:473-490
- Behr W, Honikel K, Hartmann G (1969) Interaction of the RNA polymerase inhibitor chromomycin with DNA. *European Journal of Biochemistry* 9:82-92
- Bickham JW, Baker RJ (1979) Canalization model of chromosomal evolution. *Bulletin of Carnegie Museum of Natural History* 13:70-84
- Bickham JW, Bull JJ, Legler JM (1983) Karyotypes and evolutionary relationships of Trionychoid Turtles. *Cytologia* 48:177-183
- Bickham JW, Carr JL (1983) Taxonomy and phylogeny of the higher categories of cryptodiran turtles based on a cladistic analysis of chromosomal data. *Copeia* 1983:918-932
- Blacburn DG, Kleis-San Francisco S, Callard IP (1998) Histology of abortive egg sites in the uterus of a viviparous, placentotrophic lizard, the skink *Chalcides chalcides*. *Journal of Morphology* 235:97-108
- Bradley RD, Wichman HA (1994) Rapidly evolving repetitive DNAs in a conservative genom: a test of factors that affect chromosomal evolution. *Chromosome Research* 2:354-360
- Bragg WK, Fawcett JD, Bragg TB, Viets BE (2000) Nest-site selection in two eublepharid gecko species with temperature-dependent sex determination and one with genotypic sex determination. *Biological Journal of the Linnean Society* 69:319-332
- Braverman JM, Hudson RR, Kaplan NL, Langley ChH, Stephan W (1995) The hitchhiking effect on the site frequency spectrum of DNA polymorphisms. *Genetics* 140:783-796
- Bull JJ (1980) Sex determination in reptiles. *The Quarterly Review of Biology* 55:3-21

- Bull JJ (1983) *Evolution of sex determining mechanisms*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, INC., Menlo Park
- Bull JJ (1987) Temperature-dependent sex determination in Reptiles - Validity of sex diagnosis in hatchling lizards. *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne de Zoologie* 65:1421-1424
- Burger J, Zappalorti RT (1988) Effects of incubation temperature on sex ratios in pine snakes: differential vulnerability of males and females. *The American Naturalist* 132:492-505
- Burt DW (2002) Origin and evolution of avian microchromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* 96:97-112
- Carrel L, Willard HF (2005) X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. *Nature* 434:400-404
- Charlesworth B (1991) The evolution of sex chromosomes. *Science* 251:1030-1033
- Charlesworth B (2002) The evolution of chromosomal sex determination. *Genetics and Biology of Sex Determination* 244:207-224
- Charlesworth B (2003) The organization and evolution of the human Y chromosome. *Genome Biology* 4:226
- Charlesworth B, Charlesworth D (2000) The degeneration of Y chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 355:1563-1572
- Charlesworth B, Guttman DS (1996) Reductions in genetic variation in *Drosophila* and *E.coli* caused by selection at linked sites. *Journal of Genetics* 75:49-61
- Charnov EL (1982) *The theory of sex allocation*. Princeton University Press, Princeton
- Charnov EL, Bull JJ (1977) When is sex environmentally determined? *Nature* 266:828-830
- Chow JC, Brown CJ (2003) Forming facultative heterochromatin: silencing of an X chromosome in mammalian females. *Cellular and Molecular Life Sciences* 60:2586-2603
- Cohen MM, Gans C (1970) The chromosomes of the order Crocodylia. *Cytogenetics* 9:81-105
- Colombo DO, Grandi G (1996) Histological study of the development and sex differentiation of the gonad in the European eel. *Journal of Fish Biology* 48:493-512
- Conover DO (1984) Adaptive significance of temperature-dependent sex determination in a fish. *The American Naturalist* 123:297-313
- Conover DO (2004) Temperature-dependent sex determination in fishes. In: Valenzuela N, Lance VA (eds) *Temperature-dependent sex determination in vertebrates*. Smithsonian Books, Washington, pp 11-20
- Contreras LC, Torres-Mura JC, Spotorno AE (1990) The largest known chromosome number for a mammal in a South American desert rodent. *Experientia* 46:506-508
- Cook LG (2000) Extraordinary and extensive karyotypic variation: A 48-fold range in chromosome number in the gall-inducing scale insect *Apiomorpha* (Hemiptera: Coccidea: Eriococcidae). *Genome* 43:255-263

- da Silva EB, Margarido VP (2005) An  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  multiple sex chromosome system in a new species of the genus *Gymnotus* (Pisces, Gymnotiformes). *Environmental Biology of Fishes* 73: 293-297
- de Almeida-Toledo LF, Daniel-Silva MFZ, Lopes CE, de A. Toledo-Filho S (2000) Sex chromosome evolution in fish. II. Second occurrence of an  $X_1X_2Y$  sex chromosome system in Gymnotiformes. *Chromosome Research* 8:335-340
- De Smet WHO (1981) Description of the orcein stained karyotypes of 27 lizard species (Lacertilia Reptilia) belonging to the Families Iguanidae, Agamidae, Chameleonidae and Gekkonidae (Ascalabota). *Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia* 76:35-72
- Deeming DC (2005) Prevalence of TSD in Crocodylians. In: Valenzuela N, Lance VA (eds) *Temperature-dependent sex determination in vertebrates*. Smithsonian Books, Washington, pp 33-41
- Devlin RH, Nagahama Y (2002) Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* 208:191-364
- dos Santos RML, Bertolotto CEV, Pellegrino KCM, Rodrigues MT, Yonenaga-Yassuda Y (2003) Chromosomal studies on sphaerodactyl lizards of genera *Gonatodes* and *Coleodactylus* (Squamata, Gekkonidae) using differential staining and fragile sites analyses. *Cytogenetic and Genome Research* 103:128-134
- Dournon C, Houillon C, Pieau C (1990) Temperature sex-reversal in amphibians and reptiles. *International Journal of Developmental Biology* 34:81-92
- El Mouden EH, Znari M, Pieau C (2001) Effects of incubation temperature on embryonic development and sex determination in the north African Agamid Lizard, *Agama impalearis*. *Herpetological Journal* 11:101-108
- Ellegren H (2000) Evolution of the avian sex chromosomes and their role in sex determination. *Trends in Ecology & Evolution* 15:188-192
- Ellegren H, Fridolfsson AK (1997) Male-driven evolution of DNA sequences in birds. *Nature Genetics* 17:182-184
- Ewert MA, Nelson CE (1991) Sex Determination in turtles - diverse patterns and some possible adaptive values. *Copeia* 1:50-69
- Ewert MA, Nelson CE (2003) Metabolic heating of embryos and sex determination in the american alligator, *Alligator mississippiensis*. *Journal of Thermal Biology* 28:159-165
- Ewulonu UK, Haas R, Turner BJ (1985) A multiple sex chromosome system in the annual killifish, *Nothobranchius guentheri*. *Copeia* 1985:503-508
- Ezaz T, Quinn AE, Miura I, Sarre D, Georges A, Graves JAM (2005) The dragon lizard *Pogona vitticeps* has ZZ/ZW micro-sex chromosomes. *Chromosome Research* 13:763-776
- Ezaz T, Valenzuela N, Grützner F, Miura I, Georges A, Burke RL, Graves JAM (2006) An XX/XY sex microchromosome system in a freshwater turtle, *Chelodina longicollis* (Testudines: Chelidae) with genetic sex determination. *Chromosome Research* 14:139-150



- Fisher RA (1958) *The genetical theory of natural selection*. Dover Publications, New York
- Foster JW, Brennan FE, Hampikian GK, Goodfellow PN, Sinclair AH, Lovell-Badge R, Selwood L, Renfree MB, Cooper DW, Graves JAM (1992) Evolution of sex determination and the Y chromosome: SRY - related sequences in marsupials. *Nature* 359:531-533
- Foster JW, Dominigues-Steglich MA, Guioli S, Kwok Ch, Waller PA, Stevanovic M, Wissenbach J, Mansour S, Young ID, Goodfellow PN, Brook JD, Chafer AJ (1994) Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene. *Nature* 372:525-530
- Fredga K, Bulmer MG (1988) Aberrant chromosomal sex-determining mechanisms in mammals, with special reference to species with XY females. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 322:83-95
- Freshney RI (2005) *Culture of animal cells: A manual of basic technique*. Wiley-Liss: A John Wiley and Sons, INC., Publication, New Jersey
- Fridolfsson AK, Cheng H, Copeland NG, Jenkins NA, Liu HCh, Raudsepp T, Woodage T, Chowdhary B, Halverson J, Ellegren H (1998) Evolution of the avian sex chromosomes from an ancestral pair of autosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:8147-8152
- Fry BG, Vidal N, Norman JA, Vonk FJ, Scheib H, Ramjan SFR, Kuruppu S, Fung K, Hedges SB, Richardson MK, Hodgson WC, Ignjatovic V, Summerhayes R, Kochva E (2006) Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature* 439:584-588
- Galián J, Hogan JE, Vogler AP (2002) The origin of multiple sex chromosomes in tiger beetles. *Molecular Biology and Evolution* 19:1792-1796
- Ganesh S, Mohanty J, Raman R (1997) Male-biased distribution of the human Y chromosomal genes *SRY* and *ZFY* in the lizard *Calotes versicolor*, which lacks sex chromosomes and temperature-dependent sex determination. *Chromosome Research* 5:413-419
- Gao X, Patel DJ (1989) Solution structure of the chromomycin-DNA complex. *Biochemistry* 28:751-762
- García-Moreno J, Mindell DP (2000) Rooting phylogeny with homologous genes on opposite sex chromosomes (gametologs): A case study using avian CHD. *Molecular Biology and Evolution* 17:1826-1832
- Goodpasture C, Bloom SE (1975) Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma* 53:37-50
- Gorelick R (2003) Evolution of dioecy and sex chromosomes via methylation driving Muller's ratchet. *Biological Journal of the Linnean Society* 80:353-368
- Gorman GC (1973) The Chromosomes of the Reptilia, a cytotoxic interpretation. In: Chiarelli AB, Capanna E (eds) *Cytotaxonomy and vertebrate evolution*. Academic Press, Inc., New York, pp 349-424
- Gorman GC, Gress F (1970) Sex chromosomes of a pygopodid *Lialis burtonis*. *Experientia* 26:206-207

- Gorman GC, Stamm B (1975) The anolis lizard of Mona, Redonda, and La Blanquilla: Chromosomes, relationships, and natural history notes. *Journal of Herpetology* 9:197-205
- Graves JAM (1995) The origin and function of the mammalian Y-chromosome and Y-borne genes - An evolving understanding. *Bioessays* 17:311-320
- Graves JAM (2000) Human Y chromosome, sex determination, and spermatogenesis - A feminist view. *Biology of Reproduction* 63:667-676
- Graves JAM (2005) Recycling the Y chromosome. *Science* 307:50-51
- Graves JAM, Shetty S (2001) Sex from W to Z: evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. *Journal of Experimental Zoology* 290:449-462
- Graves JAM, Watson JM (1991) Mammalian sex-chromosomes - Evolution of organization and function. *Chromosoma* 101:63-68
- Green DM (1988) Cytogenetics of the endemic New Zealand frog, *Leiopelma hochstetteri*: extraordinary supernumerary chromosome variation and a unique sex-chromosome system. *Chromosoma* 97:55-70
- Griffiths R, Daan S, Dijkstra C (1996) Sex identification in birds using two CHD genes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 263:1251-1256
- Grismer LL (1988) The phylogeny, taxonomy, classification and biogeography of eublepharid geckos (Reptilia: Squamata). In: Estes R, Pregill J (eds) *Phylogenetic relationships within Squamata*. Stanford University Press, Stanford, California pp 369-469
- Grützner F, Ashley T, Rowell DM, Graves JAM (2006) How did the platypus get its sex chromosome chain? A comparison of meiotic multiples and sex chromosomes in plants and animals. *Chromosoma* 115:75-88
- Grützner F, Rens W, Tsend-Ayush E, El Mogharbel N, O'Brien PCM, Jones RC, Ferguson-Smith MA, Graves JAM (2004) In the platypus a meiotic chain of ten sex chromosomes shares genes with the bird Z and mammal X chromosomes. *Nature* 432:913-917
- Haaf T, Schmid M (1984) An early stage of ZW/ZZ sex chromosome differentiation in *Poecilia shhenops* var. *melanistica* (Poeciliidae, Cyprinodontiformes). *Chromosoma* 89:37-41
- Han D, Zhou K, Bauer AM (2004) Phylogenetic relationships among gekkotan lizards inferred from C-mos nuclear DNA sequence and a new classification of the Gekkota. *Biological Journal of the Linnean Society* 83:353-368
- Harlow PS (2004) Temperature-dependent sex determination in lizards. In: Valenzuela N, Lance VA (eds) *Temperature-dependent sex determination in vertebrates*. Smithsonian Books, Washington, pp 42-52
- Hayes TB (1998) Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: Genetic and developmental mechanisms. *Journal of Experimental Zoology* 281:373-399
- Hedges SB, Poling LL, Hedge (1999) A molecular phylogeny of reptiles. *Science* 283:998-1001
- Hey J (1999) The neutralist, the fly and the selectionist. *Trends in Ecology & Evolution* 14:35-38

- 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
- Howell WM, Denton TE, Diamond JR (1975) Differential staining of satellite regions of human acrocentric chromosomes. *Experientia* 31:260-262
- Huang L, Wang J, Nie W, Su W, Yang F (2006) Tandem chromosome fusions in karyotypic evolution of *Muntiacus*: evidence from *M. feae* and *M. gongshanensis*. *Chromosome Research* 14:637-647
- Hughes-Schrader S, Schrader F (1961) The kinetochore of the Hemiptera. *Chromosoma* 12:327-350
- Hurley MA, Matthiessen P, Pickering AD (2004) A model for environmental sex reversal in fish. *Journal of Theoretical Biology* 227:159-165
- Imai HT, Maruyama T, Gojobori T, Inoue Y, Crozier RH (1986) Theoretical bases for karyotype evolution. 1. The minimum interaction hypothesis. *The American Naturalist* 128:900-920
- Janzen FJ, Krenz JG (2004) Phylogenetics: Wich Was First, TSD or GSD? In: Valenzuela N, Lance VA (eds) *Temperature-Dependent Sex Determination in Vertebrates*. Smithsonian Books, Washington, pp 121-130
- Janzen FJ, Paukstis GL (1991a) A Preliminary Test of the Adaptive Significance of Enviromental Sex Determination in Reptiles . *Evolution* 45:435-440
- Janzen FJ, Paukstis GL (1991b) Environmental sex setermination in Reptiles: Ecology, evolution, and experimental design. *The Quarterly Review of Biology* 66:149-179
- Janzen FJ, Phillips PC (2006) Exploring the evolution of enviromental sex determination, especially in reptiles. *Journal of Evolutionary Biology* 19:1775-1784
- Kelly RB, Cozzarelli NR, Deutscher MP, Lehman IR, Kornberg A (1970) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotic acid. XXXII. Rplication of duplex deoxyribonucleotic acid by polymerase at a single strand break. *Journal of Biological Chemistry* 245:39-45
- King M (1976) Chromosomal and morphometric variation in the Gekko *Diplodactylus vittatus* (Gray). *Australian Zoologist* 4:75-87
- King M (1982) Karyotypic evolution in *Gehyra* (Gekkonidae, Reptilia). 2. A new species from the Alligator Rivers region in northern Australia. *Australian Journal of Zoology* 30:93-101
- King M (1983) Karyotypic evolution in *Gehyra* (Gekkonidae, Reptilia). 3. the *Gehyra australis* complex. *Australian Journal of Zoology* 31:723-741
- King M (1984) Karyotypic evolution in *Gehyra* (Gekkonidae, Reptilia). 4. Chromosome change and speciation. *Genetica* 64:101-114
- King M (1990) Chromosomal and imunogenetic data: A new perspective on the origin of the Australia's reptiles. In: Olmo E (ed) *Cytogenetics of Amphibians and Reptiles*. Birkhäuser Verlag Basel, Basel, pp 153-180
- King M (1993) *Species evolution. The role of chromosome change*. Cambridge University Press, Cambridge

- King M, Mengden GA, King D (1982) A pericentric inversion, polymorphism and a ZZ/ZW sex chromosome system in *Varanus acanthurus* Boulenger analyzed by G-banding and C-banding and Ag staining. *Genetica* 58:39-45
- King M, Rofe R (1976) Karyotypic variation in the Australian Gekko *Phyllodactylus marmoratus* (Gray) (Gekkonidae: Reptilia). *Chromosoma* 54:75-87
- Klett RP, Cerami A, Reich E (1968) Exonuclease IV. a new nuclease activity associated with *E.coli* DNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 60:943-950
- Kohn M, Kehrer-Sawatzki H, Vogel W, Graves JAM (2004) Wide genome comparisons reveal the origins of the human X chromosome. *Trends in Genetics* 20:598-603
- Komdeur J, Daan S, Tinbergen J, Mateman Ch (1997) Extreme adaptive modification in sex ratio of the Seychelles warbler's eggs. *Nature* 385:522-525
- Krackow S (1992) Sex ratio manipulation in wild house mice: The effect of fetal resorption in relation to the mode of reproduction. *Biology of Reproduction* 47:541-548
- Král J, Musilová J, Šťáhlavský F, Řezáč M, Akan Z, Edwards RL, Coyle FA, Almerje CR (2006) Evolution of the karyotype and sex chromosome systems in basal clades of araneomorph spiders (Araneae: Araneomorphae). *Chromosome Research* 14:859-880
- Lee MSY (1997) Reptile relationships turn turtle. *Nature* 389:245-246
- Levan A, Fredga K, Sanberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52:201-220
- Mank JE, Avise JC (2006) The evolution of reproductive and genomic diversity in ray-finned fishes: insights from phylogeny and comparative analysis. *Journal of Fish Biology* 69:1-27
- Mank JE, Promislow EL, Avise JC (2006) Evolution of alternative sex-determining mechanisms in teleost fishes. *Biological Journal of the Linnean Society* 87:83-93
- Marín I, Siegal ML, Baker BS (2000) The evolution of dosage-compensation mechanisms. *Bioessays* 22:1106-1114
- Matsubara K, Tarui H, Toriba M, Yamada K, Nishida-Umehara Ch, 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 M, Shinomiya A, Kinohita M, Suzuki A, Kobayashi T, Paul-Prasanth B, Lau E, Hamaguchi S, Sakaizumi M, Nagahama Y (2007) *DMY* gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:3865-3878
- Matsunaga S, Isono E, Kejnovsky E, Vyskot B, Dolezel J, Kawano S, Charlesworth D (2003) Duplicative transfer of a *MADS* box gene to a plant Y chromosome. *Molecular Biology and Evolution* 20:1062-1069

- Matthey R (1933) Nouvelle contribution a l'etude des chromosomes chez les Sauriens. *Revue Suisse de Zoologie* 40:281-315
- Matthey R (1945) L' evolution de la formule chromosomiale chez les vertebrees. *Experientia* 1:50-56 and 78-86
- McBee K, Bickham JW, Dixon JR (1987) Male heterogamety and chromosomal variation in Caribbean Geckos. *Journal of Herpetology* 21:68-71
- McQueen HA, McBride D, Miele G, Bird AP, Clinton M (2001) Dosage compensation in birds. *Current Biology* 11:253-257
- Meyer BJ (2000) Sex in the worm: counting and compensating X-chromosome dose. *Trends in Genetics* 16:247-253
- Miller D, Summers J, Silber S (2004) Enviromental versus genetic sex determination: a possible factor in dinosaur extinction? *Fertility and Sterility* 81:954-964
- Moritz C (1987) Parthenogenesis in the tropical gekkonid lizard, *Nactus arnouxii* (Sauria, Gekkonidae). *Evolution* 41:1252-1266
- Moritz C (1990) Patterns and processes of sex chromosome evolution in gekkonid lizards (Sauria: Reptilia). In: Olmo E (ed) *Cytogenetics of Amphibians and Reptiles*. Birkhäuser Verlag Basel, Basel, pp 205-220
- Muller HJ (1948) Evidence of the precision of genetic adaptation. *Harvey Lectures* 43:165-229
- Muller HJ (1964) The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Reseach* 1:2-9
- Murphy RW (1974) A new genus and species of Eublepharine Gecko (Sauria: Gekkonidae) from Baja California, Mexico. *Proceedings of the California Academy of Sciences* 40:87-92
- Nanda I, Zend-Ajusch E, Shan Z, Grützner F, Schartl M, Burt DW, Koehler M, Fowler VM, Goodwin G, Schneider WJ, Mizuno S, Dechant G, Haaf T, Schmid M (2000) Conserved synten between the chicken Z sex chromosome and human chromosome 9 includes the male regulatory gene *DMRT1*: a comparative (re)view on avian sex determination. *Cytogenetic and Genome Research* 89:67-78
- Nelson NJ, Cree A, Thompson MB, Keal SN, Daugherty ChH (2004) Temperature-dependentn sex determination in Tuataras. In: Valenzuela N, Lance VA (eds) *Temperature-dependent sex determination in vertebrates*. Smithsonian Books, Washington, pp 53-58
- Norris TB, Rickards GK, Daugherty CH (2004) Chromosomes of tuatara, *Sphenodon*, a chromosome heteromorphism and an archaic reptilian karyotype. *Cytogenetic and Genome Research* 105:93-99
- Odierna G, Aprea G, Capriglione T (1996) Le colture di sangue come metodo non distruttivo per lo studio dei cromosomi dell'erpetofauna. *Congresso Nazionale della Societas Herpetologica Italica* 293-298
- Odierna G, Heulin B, Guillaume CP, Vogrin N, Aprea G, Capriglione T, Surget-Groba Y, Kupriyanova L (2001) Evolutionary and biogeographical implications of the karyological variations in the oviparous and viviparous forms of the lizard *Lacerta (Zootoca) vivipara*. *Ecography* 24:332-340

- Ohno S (1967) *Sex chromosomes and sex-linked genes*. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. New York, Berlin
- Ohno S (1973) Evolution and the mode of the genetic regulatory mechanisms which determines sex. In: Chiarelli AB, Capanna E (eds) *Cytotaxonomy and Vertebrate Evolution*. Academic Press, New York, pp 659-679
- Olmo E (1984) Genomic composition of Reptiles - evolutionary perspectives. *Journal of Herpetology* 18:20-32
- Olmo E (2005) CHROMOREP: A reptiles chromosome database. <http://www.sienze.univpm.it/professori/chromorep.pdf>
- Olmo E, Capriglione T, Odierna G (2002) Different genomic evolutionary rates in the various reptile lineages. *Gene* 295:317-321
- Ota H, Hikida T (1989) A new triploid *Hemidactylus* (Gekkonidae, Sauria) from Taiwan, with comments on morphological and karyological variation in the *H. garnotii vietnamensis* complex. *Journal of Herpetology* 23:50-60
- Ota H, Matsui M, Hikida T, Tanaka S (1987) Karyotype of a gekkonid lizard, *Eublepharis kuroiwae kuroiwae*. *Experientia* 43:924-925
- Otto SP (2000) Detecting the form of selection from DNA sequence data. *Trends in Genetics* 16:526-529
- Pask A, Renfree MB, Graves JAM (2000) The human sex-reversing *ATRX* gene has a homologue on the marsupial Y chromosome, *ATRY*: Implications for the evolution of mammalian sex determination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97:13198-13202
- Phillips RB, Pleyte KA, Ihssen PE (1989) Patterns of chromosomal nucleolar organizer region (NOR) variation in fishes of the genus *Salvelinus*. *Copeia* 1:47-53
- Pinkel D, Landegent J, Collins C, Fuscoe J, Segraves R, Lucas J, Gray J (1988) Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:9138-9142
- Popescu P, Hayes H, Dutrillaux B (2000) *Techniques in animal cytogenetics*. Springer-Verlag, Berlin
- Qumsiyeh MB (1994) Evolution of number and morphology of mammalian chromosomes. *Journal of Heredity* 85:455-465
- Ráb P, Bohlen J, Rábová M, Flajšhans M, Kalous L (2007) Cytogenetics as a tool in fish conservation: The present situation in Europe. In: Pisano E, Ozouf-Costaz C, Foresti F, Kapoor BG (eds) *Fish cytogenetics*. Science Publishers, Enfield, pp 215-240
- Ray-Chaudhuri SP, Singh L, Sharma T (1971) Evolution of sex-chromosomes and formation of W-chromatin in Snakes. *Chromosoma* 33:239-251

- Raymond ChS, Parker ED, Kettlewell JR, Brown JG, Page DC, Kusz K, Jaruzelska J, Reinberg Y, Flejter WL, Bardwell VJ, Hirsch B, Zarkower D (1999) A region of human chromosome 9p required for testis development contains two genes related to known sexual regulators. *Human Molecular Genetics* 8:989-996
- Rhen T, Crews D (2000) Organization and activation of sexual and agonistic behavior in the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *Neuroendocrinology* 71:252-261
- Rieseberg LH (2001) Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* 16:351-358
- Rigby PWJ, Dieckmann M, Rhoades C, Berg P (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity *in vitro* by nick translation with DNA polymerase I. *Journal of Molecular Biology* 113:237-251
- Rippel O (1999) Turtle origins. *Science* 283:945-946
- Robertson WMRB (1916) Chromosome studies. I. Taxonomic relationships shown in the chromosomes of Tettigidae and Acrididae: V-shaped chromosomes and their significance in Acrididae, Locustidae and Grillidae: chromosomes and variations. *Journal of Morphology* 27: 179-331
- Roldan ERS, Gomendio M (1999) The Y chromosome as a battle ground for sexual selection. *Trends in Ecology & Evolution* 14:52-62
- Rossi MS, Redi CA, Viale G, Massarini AL, Capanna E (1995) Chromosomal distribution of the major satellite DNA of south - african rodents of the genus *Ctenomys*. *Cytogenetics and Cell Genetics* 69:179-184
- Rubin DA (1985) Effect of pH on sex ratio in cichlids and poeciliid (Teleostei). *Copeia* 1985:233-235
- Sarre SD, Georges A, Quinn A (2004) The ends of a continuum: genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles. *Bioessays* 26:639-645
- Scherer G, Schmid M (2001) *Genes and mechanisms in vertebrate sex determination*. Birkhäuser Verlag, Basel
- Schmid M, Feichtinger W, Nanda I, Schakowski R, García RV, Puppo JM, Badillo F (1994) An extraordinarily low diploid chromosome number in the reptile *Gonatodes taniae* (Squamata: Gekkonidae). *Journal of Heredity* 85:255-260
- Schmid M, Guttenbach M (1988) Evolutionary diversity of reverse (R) fluorescent chromosome bands in vertebrates. *Chromosoma* 97:101-114
- Schnedl W, Breitenbach M, Mikelsaar AV, Stranzinger G (1977) Mithramycin and DAPI: A pair of fluorochromes specific for GC- and AT-rich DNA respectively. *Human Genetics* 36:299-305
- Schulz-Schaeffer J (1976) A short history of Cytogenetics. *Biol Zbl.* 95:193-221
- Seufer H, Kaverkin Y, Kirschner A (2005) *The Eyelash Geckos*. Kirschner & Seufer Verlag, Karlsruhe

- Shetty S, Griffin DK, Graves JAM (1999) Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution. *Chromosome Research* 7:289-295
- Shields GF (1982) Comparative avian cytogenetics. *Condor* 84:45-58
- Shine R, Elphick MJ, Donnellan S (2002) Co-occurrence of multiple, supposedly incompatible modes of sex determination in a lizard population. *Ecology Letters* 5:486-489
- Sites JW, Moritz C (1987) Chromosomal evolution and speciation revisited. *Systematic Zoology* 36:153-174
- Slamovits CH, Rossi MS (2002) Satellite DNA: Agent of chromosomal evolution in mammals. A review. *Journal of Neotropical Mammals* 9:297-308
- Slijepcevic P (1998) Telomeres and Mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma* 107:136-140
- Smith CA, Sinclair AH (2004) Sex determination: insights from the chicken. *Bioessays* 26:120-132
- Smith J, Bruley CK, Paton IR, Dunn I, Jones CT, Windsor D, Morrice DR, Law AS, Masabanda J, Sazanov A, Waddington A, Fries D, Burt DW (2000) Differences in gene density on chicken macrochromosomes and microchromosomes. *Animal Genetics* 31:96-103
- Sola L, Rossi AR, Laselli V, Rasch EM, Monaco PJ (1992) Cytogenetics of bisexual unisexual species of *Poecilia*. 2. Analysis of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Poecilia maxicana mexicana* by C-banding and DAPI, quinacrine, chromomycin A3 and silver staining. *Cytogenetics and Cell Genetics* 60:229-235
- Starostová Z, Kratochvíl L, Frynta D (2005) Draft and giant geckos from the cellular perspective: he bigger the animal, the bigger its erythrocytes? *Functional Ecology* 19:744-749
- Stockley P (1999) Sperm Selection and genetic incompatibility: Does relatedness of mates affect male success in sperm competition? *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 266:1663-1669
- Townsend TM, Larson A, Louis E, Macey JR (2004) Molecular phylogenetics of Squamata: The position of snakes, Amphisbaenians, and Dibamids, and the root of the Squamate tree. *Systematic Biology* 53:735-757
- Traut W, Marec F (1996) Sex chromatin in lepidoptera. *The Quarterly Review of Biology* 71:239-256
- Valenzuela N (2004) Temperature-dependent sex determination. In: Deeming DC (ed) *Reptilian incubation: Environment, evolution and behaviour*. Nottingham University Press, Nottingham, pp 211-228
- Valenzuela N, Adams DC, Janzen FJ (2003) Pattern does not equal process: Exactly when is sex environmentally determined? *The American Naturalist* 161:676-683
- van de Sande JH, Lin CC, Jorgenson KF (1977) Reverse banding on chromosomes produced by a guanosine-cytosine specific DNA binding antibiotic: olivomycin. *Science* 195:400-402
- Vidal N, Hedges SB (2005) The phylogeny of squamate reptiles (lizards, snakes, and amphisbaenians) inferred nine nuclear protein-coding genes. *Comptes Rendus Biologies* 328:1000-1008



- Viets BE, Ewert MA, Talent LG, Nelson CE (1994) Sex-determining mechanisms in Squamate Reptiles. *Journal of Experimental Zoology* 270:45-56
- Viets BE, Tousignant A, Ewert MA, Nelson CE, Crews D (1993) Temperature-dependent sex determination in the Leopard Gecko, *Eublepharis macularius*. *Journal of Experimental Zoology* 265:679-683
- Völker ME (2006) Karyotype differentiation in *Chromaphyosemion* killifishes (Cyprinodontiformes, Nothobranchiidae): Patterns, mechanisms and evolutionary implications. pp 1-119. Ph.D. Thesis
- Vorontsov NN (1973) The evolution of the sex chromosomes. In: Chiarelli AB, Capanna E (eds) *Cytotaxonomy and vertebrate evolution*. Academic Press, Inc., Chiarelli, A.B; Capanna, E., pp 619-679
- Wagner T, Wirth J, Meyer J, Zabel B, Held M, Zimmer J, Pasantas J, Bricarelli FD, Keutel J, Hustert E, Wolf U, Tommerup N, Schempp W, Scherer G (1994) Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the *SRY*-related gene *SOX9*. *Cell* 79:1111-1120
- Wallace H, Badawy GMI, Wallace BMN (1999) Amphibian sex determination and sex reversal. *Cellular and Molecular Life Sciences* 55:901-909
- Werner YL (1956) Chromosome numbers of some male Geckos (Reptilia:Gekkonidae). *Israel Genetics Circle* 5B:319
- Wichman HA, Payne CT, Ryder OA, Hamilton MJ, Maltbie M, Baker RJ (1991) Genomic distribution of heterochromatic sequences in equids - implications to rapid chromosomal evolution. *Journal of Heredity* 82:369-377
- Wilkinson M, Thorley J, Benton MJ (1997) Uncertain turtle relationships. *Nature* 387:466
- Wurster DH, Benirschke K (1967) Chromosome studies in some deer, the springbok and the pronghorn, with notes on the placentation in deer. *Cytologia* 32:273-285
- Yonenaga-Yassuda Y (1999) Supernumerary chromosome variation, heteromorphic sex chromosomes and banding patterns in microteiid lizards of the genus *Micrablepharus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Chromosome Research* 7:21-29
- Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT, Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  sexchromosome system in *Calyptommatius* and the karyotypes of *Psilophthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genetics and Molecular Biology* 28:700-709
- Zardoya R, Meyer A (1998) Complete mitochondrial genome suggests diapsid affinities of turtles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:14226-14231
- Zima J (2000) Chromosomal evolution in small mammals (Insectivora, Chiroptera, Rodentia). *Hystrix* 11:5-15
- Zima J, Fedyk S, Fredga K, Hausser J, Mishta A, Searle JB, Volobouev VT, Wójcik JM (1996) The list of the chromosome races of the common shrew (*Sorex araneus*). *Hereditas* 125:97-107
- Zima J, Wójcik JM, Horáková M (1988) The number of karyotypic variants in the common shrew (*Sorex araneus*). *Acta Theriologica* 33:467-475