

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovatelů.

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra genetiky a mikrobiologie**

**Evoluce karyotypu u pavouků čeledí Atypidae a Pholcidae  
(Araneae)**

Evolution of the karyotype in two spider families, Atypidae and  
Pholcidae (Araneae)

Diplomová práce

**Markéta Pastuchová**

Praha 2009

Vedoucí práce: RNDr. Jiří Král, Ph.D.

RNDr. Magda Vítková, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, jen s použitím citované literatury pod vedením RNDr. Jiřího Krále, Ph.D. a RNDr. Magdy Vítkové, Ph.D.

*Pasichová*

## Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem, kteří se ať radou pomocí či podporou na vzniku této práce podíleli. V první řadě tedy svým školitelům za odborné vedení práce v oblasti klasické cytogenetiky RNDr. Jiřímu Královi Ph.D. a Magdě Vítkové, Ph.D. za odborné vedení molekulárně cytogenetické části. Dále bych chtěla poděkovat svému příteli Mgr. Martinu Noskovi, Ph.D. za trpělivost, toleranci a také za odbornou pomoc, a též svým rodičům za všestrannou podporu. Současně bych ráda poděkovala i všem členům naší Laboratoře cytogenetiky pavoukovců za užitečné rady, můj dík patří zejména Mgr. Tereze Kořínkové, Bc. Lence Dulíkové, Ing. Janě Musilové, Mgr. Martinu Formanovi a Bc. Sašovi Semberovi. Za poskytnutí materiálů děkuji Mgr. Petru Dolejšovi, doc. RNDr. Jaromírovi Hajerovi, CSc. z Univerzity Jana Evangelisty Purkyně z Ústí nad Labem, Dr. Bernhardovi Huberovi z Univerzity v Bonnu a Marshalovi Hedinovi, Ph.D. ze Státní univerzity v San Diegu.

Práce vznikla v letech 2007 - 2009 a byla podporována projektem Grantové agentury ČR 206/08/0813 a Grantové agentury Univerzity Karlovy B/BIO/186/2006 a Výzkumného záměru MSM 0021620828.

## Evolution of the karyotype in two spider families, Atypidae and Pholcidae (Araneae)

### Summary

From cytogenetic point of view spiders are very diversified group, they exhibit great diversity in diploid chromosome number from 7 *Ariadna lateralis* (Segestriidae) up to 128 *Cyclocosmia siamensis* (Ctenizidae). Till recently karyotypes of almost all spiders were supposed to consist exclusively of acrocentric chromosomes including  $X_1X_20$  sex chromosome system. However, this idea is based mostly on research of an advanced clade – entelegyne lineage of araneomorph spiders. Karyotypes of mygalomorph and haplogyne spiders remain nearly unexplored.

Presented study is focused on cytogenetics of eight representatives of the family Pholcidae (Araneomorphae, Haplogyne) and *Atypus piceus* and *A. affinis* (Mygalomorphae, fam. Atypidae). Karyotypes, course of meiosis and distribution of nucleolar organizer regions (NOR) have been investigated in selected pholcid species and in one representative of the family Sicariidae (Araneomorphae, Haplogyne). Chromosomes of these groups are mostly biarmed (metacentric or submetacentric) and sex chromosome systems are diversified. Furthermore, distribution of constitutive heterochromatin and NOR has been analysed in *A. piceus* ( $2n♂ = 41, X0$ ) and *A. affinis* ( $2n♂ = 14, XY$ ).

**Key words:** Atypidae, karyotype, meiosis, NOR, Pholcidae, sex chromosomes, spiders

**Klíčová slova:** Atypidae, karyotyp, meióza, NOR, pavouci, Pholcidae, pohlavní chromozomy

# Obsah

<b>1 Úvod</b>	6
<b>2 Literární přehled</b>	9
2.1 Taxonomie a biologie třesavek	9
2.2 Taxonomie a biologie sklípkánek	10
2.3 Cytogenetika pavouků	11
2.3.1 Pohlavní chromozomy pavouků	13
2.3.1.1 Systémy pohlavních chromozomů	13
2.3.1.2 Mechanismus párování pohlavních chromozomů	15
2.3.2 Difúzní stádium	16
2.3.3 Karyotypy a pohlavní chromozomy třesavek	17
2.3.4 Karyotypy a pohlavní chromozomy sklípkánek	18
2.4 Jadérko a nukleolární organizátory jadérka	20
2.4.1 Struktura jadérka	20
2.4.2 Funkce jadérka	20
2.4.3 Ribozomová DNA	21
2.4.3.1 Ribozomová DNA ve fylogenetické analýze	22
<b>3 Materiál a metody</b>	24
3.1 Materiál	24
3.2 Metody	25
3.2.1 Příprava chromozomových preparátů	25
3.2.2 Vizualizace konstitutivního heterochromatinu pomocí C pruhování	27
3.2.3 Stříbření	27
3.2.4 Vizualizace nukleolárních organizátorů jadérka fluorescenční in situ hybridizací	28
<b>4 Výsledky</b>	32
4.1 Karyotypy haplogynních pavouků čeledí Pholcidae a Sicariidae	32
4.1.1 Pholcidae – pholcini	32
4.1.2 Pholcidae – holocnemini	38
4.1.3 Sicariidae	47
4.2 Karyotypy mygalomorfních pavouků čeledi Atypidae	49
<b>5 Diskuze</b>	53
5.1 Haplogynní pavouci čeledí Pholcidae a Sicariidae	53
5.1.1 Karyotypy	53
5.1.2 Evoluce pohlavních chromozomů	57
5.1.3 Distribuce nukleolárních organizátorů jadérka	62
5.2 Mygalomorfní pavouci čeledi Atypidae	64
<b>6 Souhrn</b>	67
<b>7 Seznam citované literatury</b>	69

## 1 Úvod

Třída pavoukovců (Arachnida) čítá 9 500 rodů a přibližně 100 000 převážně suchozemských druhů. Dělíme ji na řády: pavouci (Araneae), bičnatci (Uropygi), bičovci (Amplipygi), krátkochvostí (Schizomida), roztoči (Acari), roztočovci (Ricinulei), sekáči (Opiliones), solifugy (Solifugae), štírci (Pseudoscorpiones), štíři (Scorpiones), štířenky (Palpigradi) (Cracraft a Donoghue 2004).

Druhým nejpočetnějším (hned po roztočích) je řád pavouci (Araneae). Řadíme do něj 109 čeledí čítajících 3 733 rodů a více než 40 000 druhů (Platnick 2009). Tento řád dále členíme na tři fylogenetické větve – sklípkoši (Mesothelae), sklípkani (Mygalomorphae) a dvouplicní pavouci (Araneomorphae). Zástupci sklípkošů se vyznačují mnoha primitivními znaky jako je segmentace zadečku, dva páry plicních vaků a přítomnost čtyř párů snovacích bradavek, které jsou posunuty těsně za vyústění druhého páru plicních vaků (Ruppert *et al.* 2004). Celý infrařád je tvořen jedinou čeledí Liphistiidae s 87 druhy (Platnick 2009). O něco pokročilejší než Mesothelae je druhově početnější infrařád mygalomorfních pavouků, čítá přes 2 600 druhů řazených do 15 čeledí (Platnick 2009). Nejedvozenější a zároveň druhově nejpočetnější je infrařád dvouplicných pavouků, patří do něj více než 90 % dosud známých druhů. Rozdělujeme jej na dva vývojové stupně – na enetelygynní pavouky a na bazální araneomorfní pavouky, kam kromě haplogynních pavouků patří také dvě reliktní nadčeledi Hypochiloidea a Austrochilioidea (Coddington a Levi, 1991).

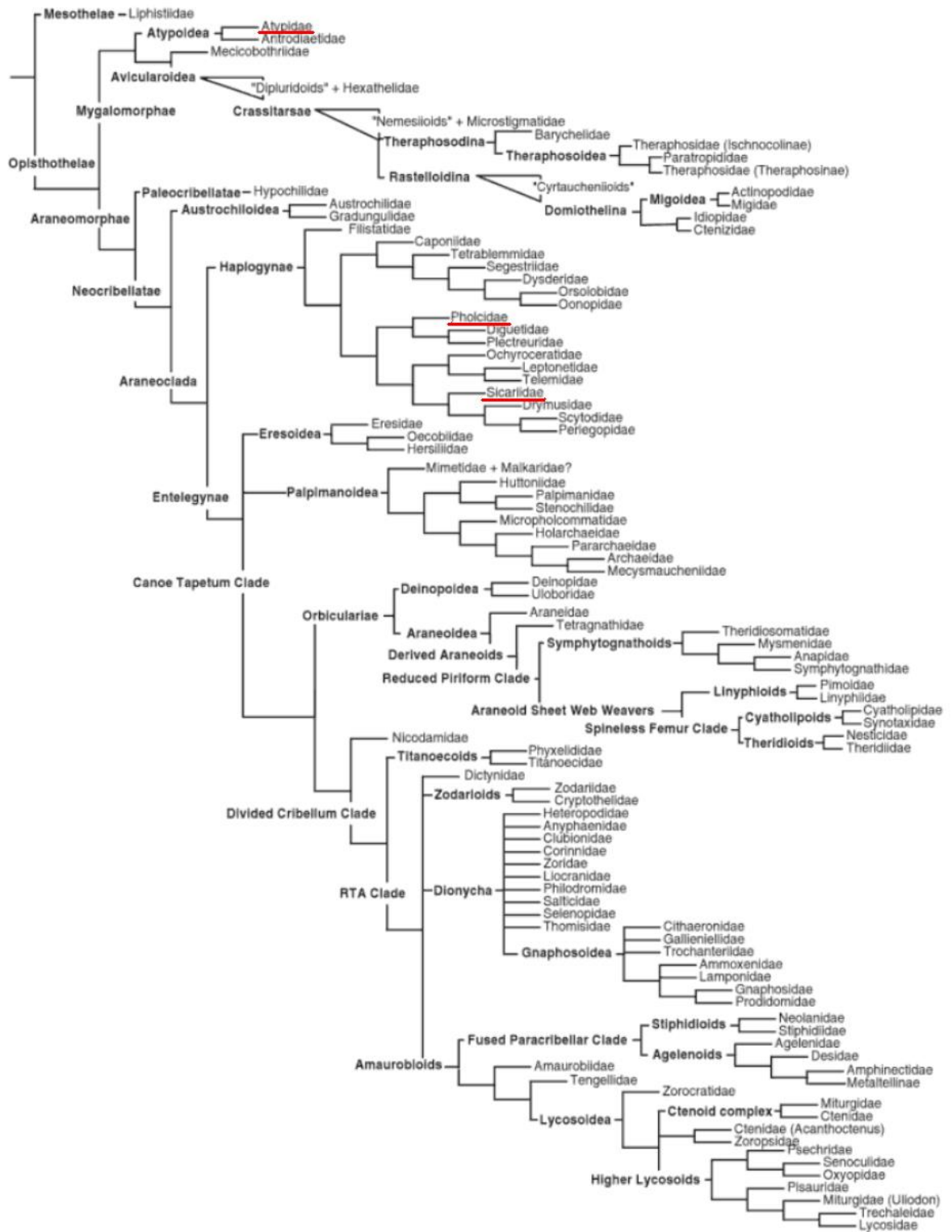
Pavouci jsou z karyotypového hlediska značně diverzifikovanou skupinou, diploidní počet chromozomů se pohybuje v širokém rozmezí. Mezi pavouky se vyskytují druhy s výhradně jednoramennými chromozomy (část entelegynních pavouků), druhy s různou morfologií chromozomů i druhy, u nichž je většina nebo všechny chromozomy dvouramenné (velká část haplogynních pavouků). Nacházíme také druhy s holokinetickými chromozomy (čeledi Dysderidae a Segestridae) (Král *et al.* 2006). U všech druhů jsou však vyvinuty pohlavní chromozomy. Díky své různorodosti jsou právě systémy pohlavních chromozomů jedním z nejzajímavějších aspektů pavoučí cytogenetiky.

Ačkoli jsou pavouci cytogeneticky nejprobádanějším řádem pavoukovců, je počet karyotypovaných druhů nízký – přibližně 600 druhů (Král, nepublikovaná data), navíc jsou data rozložena značně nerovnoměrně, většina studií se zaměřuje na nejedvozenější entelegynní pavouky. Právě proto jsem se ve své práci soustředila na dvě čeledi, jimž dosud nebyla věnována příliš velká pozornost. Čeď třesavek (Pholcidae) patří mezi bazální araneomorfní pavouky. Jedná se tedy o jednu z vývojově původních čeledí dvouplicných

pavouků. Mým cílem bylo stanovení karyotypu šesti zástupců této čeledi společně s prostudováním průběhu meiózy. Velkou pozornost jsem věnovala systému pohlavních chromozomů. Toto studium směřovalo k doplnění představ o karyotypové evoluci této čeledi. Dále jsem se věnovala podrobnějšímu studiu karyotypů dvou zástupců primitivní skupiny pavouků - sklípkánek (*Atypidae*), jež tvoří spolu s čeleděmi *Antrodiaetidae* a *Mecicobothriidae* nejbazálnější větev mygalomorfních pavouků - nadčeleď *Atypoidea*. Ve své práci jsem navázala na již známé informace (Řezáč *et al.*, 2006), pomocí C pruhování jsem zjišťovala rozložení heterochromatinu, dále jsem studovala polohu nukleolárních organizátorů jadérka a to jak tradičním stříbřením, tak sofistikovanější metodou fluorescenční in situ hybridizace. Tuto molekulárně cytogenetickou metodu jsem využila také ke stanovení distribuce nukleolárních organizátorů jadérka čtyř zástupců čeledi *Pholcidae* a jednoho zástupce další haplogynní čeledi *Sicariidae* *Loxosceles rufescens*. Zkoumala jsem, jestli by se nukleolární organizátory nemohly podílet na párování pohlavních chromozomů, tak jako je tomu u *Drosophila melanogaster* (McKee a Karpen 1990, McKee *et al.* 1992), také jsem se zaměřila na mezidruhové rozdíly v jejich počtu a distribuci.

Přesnou představu o taxonomickém postavení skupin studovaných v mé práci podává obrázek 1.





**Obrázek 1. Schéma fylogeneze pavouků.** Červeně jsou podtrženy čeledi, na něž se ve své práci zaměřuji. Převzato a upraveno z Cracraft a Donoghue 2004.

## 2 Literární přehled

### 2.1 Taxonomie a biologie třesavek

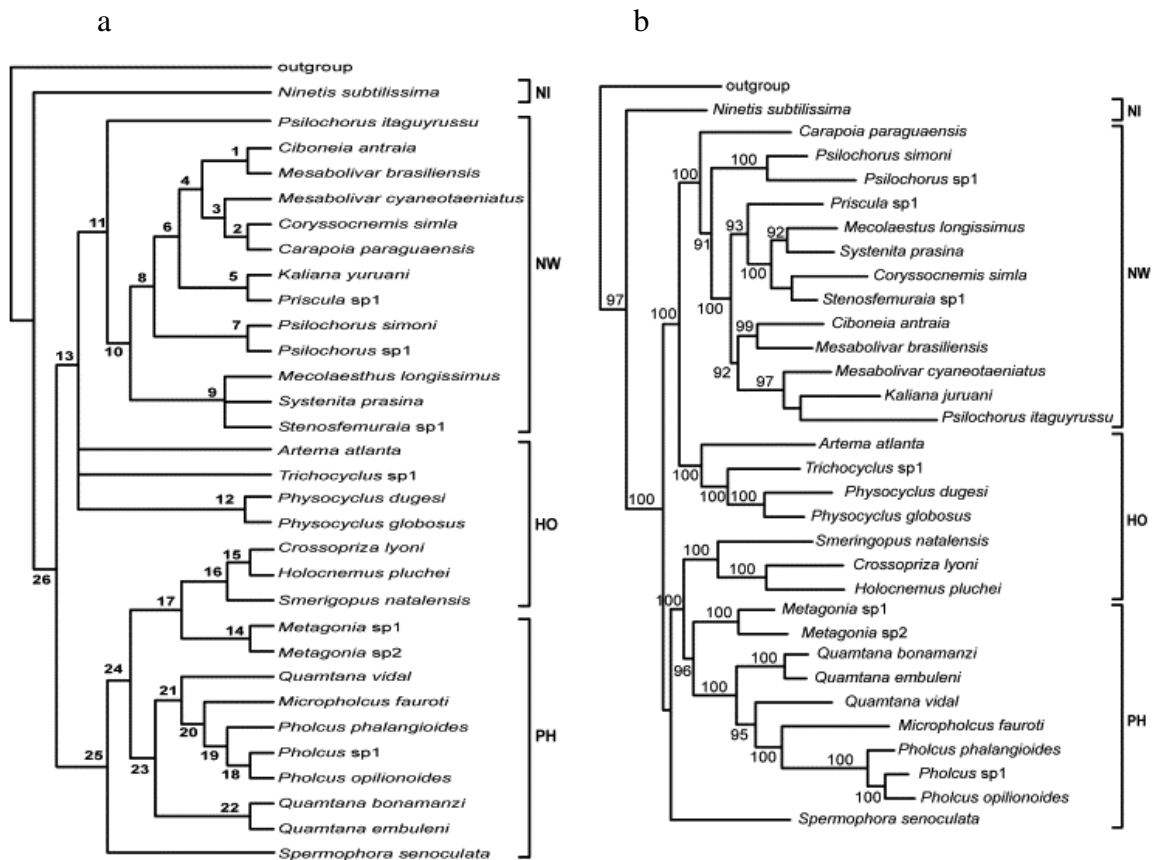
Třesavky (Pholcidae) patří spolu s čeledí koutníkovitých (Sicariidae) a dalšími patnácti čeleděmi do skupiny haplogynních pavouků. Ty spolu s nadčeleděmi Hypochiloidea a Austrochilioidea řadíme mezi bazální araneomorfní pavouky (Coddington a Levi 1991, Cracraft a Donoghue 2004).

Mezi třesavky patří 1 038 druhů z 85 rodů (Platnick 2009), jedná se o druhově nejbohatší čeleď bazálních araneomorfních pavouků. Jsou rozšířeny celosvětově (Jocqué a Dippenaar-Schoeman 2006). Nejvíce třesavek najdeme v tropech, žijí na temných místech, v jeskyních či pod kameny, část třesavek je synantropní. V České republice žijí jenom tři druhy – třesavka sekáčovitá (*Pholcus opilionioides*), třesavka velká (*Pholcus phalangoides*), (Buchar a Růžička 2002) a vzácná zavlečená třesavka Simonova (*Psilochorus simoni*) (Růžička a Buchar 2008), oba dva posledně jmenované druhy patří jsou synantropní (Buchar a Kůrka 2001).

První kladistická analýza čeledi založená na morfologických datech byla provedena Huberem (2000). Podle této práce se čeleď Pholcidae člení na pět skupin: Ninetini, Holocnemini, Pholcini, Prisculini a americká větev. Novější kladogram ze studie Bruvo-Madarice (2005) (obr. 2) zahrnující 31 druhů založený na 45 morfologických charakteristikách a na 4 molekulárních markrech (genech pro 12S rRNA, 16S rRNA, 28S rRNA a podjednotku I. cytochrom c-oxidázy) Huberův kladogram doplňuje a upřesňuje. Studie potvrzuje dosavadní rozdělení čeledi s následujícími výjimkami, Prisculini zahrnuje do americké větve, Holocnemini považuje za parafyletickou skupinu a postavení *Spermophora senoculata* hodnotí jako izolované a provizorně ji řadí mezi Pholcini.

Třesavky mají drobné tělo (2-10 mm) a neobvykle dlouhé končetiny až 30 mm. Vzhledem poněkud připomínají sekáče, při podrobnějším pohledu nalezneme však mezi hlavohrudí a zadečkem tenkou stopku. Mají pár plicních vaků, avšak tracheální soustava, která se vyskytuje u některých jiných skupin pavouků, jim zcela schází (Jocqué a Dippenaar-Schoeman 2006, Ruppert *et al.* 2004). Staví si řídké nepravidelné sítě, na něž se zavěšují koncovými drápkami svých nohou hřbetem dolů. Naše třesavky, zvláště pak třesavka velká, se obvykle vyskytují v domech, v chalupách či ve stájích, všude tam, kde je dostatek tepla. V místnostech je nalezneme v rozích stropu (Buchar a Kůrka 2001). Třesavky mají zvláštní způsob obrany před nepřítelem. Když se cítí v ohrožení, začnou se třást tak rychle, že se

stávají téměř neviditelné a mohou pak z místa ohrožení rychle utéct (Jackson *et al.* 1990). Odtud také pochází český název čeledi Pholcidae. Samičky třesavek nosí kokon s vajíčky v chelicérách až do vylíhnutí mláďat (Buchar a Kůrka 2001).



**Obrázek 2. Rekonstrukce fylogeneze čeledi Pholcidae.** a) striktně konsenzuální strom, b) většinou konsenzuální strom. Zkratky kládů: NW = „New world“ klád, PH = pholcini, HO = holocnemini, NI = ninetini.

Převzato z Bruvo-Madaric *et al.* 2005.

## 2.2 Taxonomie a biologie sklípkánků

Sklípkánci (Atypidae) náleží do infrařádu Mygalomorphae, jenž obsahuje přes 2 600 druhů rozdělených do 15 čeledí a 300 rodů. Čeleď sklípkánkovitých dělíme na tři rody dohromady obsahujících 43 druhů (Platnick 2009).

Sklípkánky můžeme najít na všech kontinentech vyjma Austrálie a Jižní Ameriky (Jocqué a Dippenaar-Schoeman 2006). Vyskytují se převážně v mírném pásmu (Buchar a Kůrka 2001). Na území České republiky žijí jenom tři zástupci mygalomorfních pavouků a všichni jsou z čeledi sklípkánkovitých: sklípkánek hnědý (*Atypus affinis*), sklípkánek černý

(*Atypus piceus*) a sklípkánek pontický (*Atypus muralis*) (Buchar a Růžička 2002). Najdeme je na slunných xerothermních stanovištích (Buchar a Kůrka 2001).

Mygalomorfní pavouci nejsou na rozdíl od pavouků araneomorfních příliš morfologicky diverzifikováni, a proto dokonalejší model jejich fylogeneze přineslo až použití molekulárních markerů, a to konkrétně genů pro 18S a 28S rRNA. Tato studie řadí atypidy spolu s čeledí Antrodiaetidae a Mecicobothriidae do starobylé skupiny Atypoidea, která se oddělila od ostatních mygalomorfů nejdříve (Hedin a Bond 2006).

Velikost těla sklípkánek se pohybuje mezi 9-30 mm, patří tedy mezi větší pavouky mírného pásma (Jocqué a Dippenaar-Schoeman 2006). Jako většina mygalomorfních pavouků i sklípkánci si vytvářejí podzemní nory. Tato podzemní obydlí, široká až 1 cm a hluboká až 30 cm, ústí na povrch pavučinovou „punčoškou“. Když se po ní prochází hmyz, vibrace, které vyvolává, přilákají pavouka a ten skrz tenkou stěnu zabodne do své oběti dlouhé chelicery. Kořist poté vtáhne dovnitř a vzniklý otvor opraví (Foelix 1996, Buchar a Kůrka 2001). Jídelníček sklípkánek může být velmi pestrý, patří do něj kromě obvyklých cvrčků a jiného hmyzu také žížaly a červi (Nyffeler *et al.* 2001, vlastní pozorování). Na rozdíl od většiny pavouků mírného pásu jsou sklípkánci dlouhověcí, mohou se dožít až sedmi let (Foelix 1996).

### 2.3 Cytogenetika pavouků

Pavouci (Araneae) patří s 40 700 druhy mezi největší živočišné řády (Platnick 2009). Přestože náleží mezi cytogeneticky nejprobádanější řády pavoukoců, jsou známy jenom karyotypy přibližně 600 druhů (Král, nepublikovaná data). Araújo (2005b) uvádí dokonce ještě výrazně nižší počet známých karyotypů – 460.

Řád pavouků dělíme do tří fylogenetických větví, a to na Mesothelae, Mygalomorphae a na fylogeneticky nejodvozenější Araneomorphae (Coddington a Levi, 1991). Cytogeneticky nejprostudovanější skupinou je nejodvozenější a zároveň druhově nejpočetnější (téměř 38 000 druhů) entelygynní větev araneomorfních pavouků (Řezáč *et al.* 2006, Král *et al.* 2006). Na druhově méně bohatou (přes 3 400 druhů) a starobylejší skupinu bazálních araneomorfních pavouků se už zájem cytogenetiků obrací méně. Dosud bylo karyotypováno pouze 44 druhů ze 12 čeledí, z toho 42 haplogynních pavouků a po jednom zástupci z nadčeledí Hypochiloidea a Austrochiloidea (Král *et al.* 2006). Ještě méně je prozkoumáno zástupců

infrařádu Mygalomorphae (2 500 druhů)<sup>1</sup>, dosud bylo publikováno pouze 16 karyotypů (Řezáč *et al.*, 2006).

U pavouků nacházíme obrovskou diverzitu v diploidních počtech chromozomů, a to od 7 u *Ariadna lateralis* (Segestriidae) (Suzuki 1954) až do 128 u *Cyclocosmia siamensis* (Ctenizidae) (Dulíková a Král 2007). Už roku 1954 navrhl Suzuki teorii, podle níž se v karyotypové evoluci pavouků významně uplatňuje redukce počtu chromozomů. Tomu nasvědčuje vysoký počet chromozomů u primitivních skupin pavouků - u podřádu Mesothelae a nově i výsledky studia infrařádu Mygalomorphae (Dulíková a Král 2007, Dulíková 2009). Araneomorfní pavouci jako nejodvozenější podřád mají chromozomů nejméně. Pokles počtu chromozomů se projevuje i u jiných odvozených či specializovaných skupin živočichů (White 1973). Počet chromozomů u entelegygnních pavouků se pohybuje mezi 10 u *Uloborus danolius* (Uloboridae) (Parida a Sharma 1987) a 49 u *Araneus ventricosus* (Araneidae) (Wang *et al.* 1993). U bazálních araneomorfních pavouků je rozsah o trochu menší, a to mezi 7 u *Ariadna lateralis* (Segestriidae) (Suzuki 1954) až 38 u *Austrochilus sp.* (Austrochilidae) (Král *et al.* 2006). Variabilita diploidního počtu chromozomů v rámci jednoho rodu je spíše nízká (Král 1994), existuje však několik výjimek, kupříkladu čeleď Atypidae (Řezáč *et al.* 2006), Pholcidae (Araújo *et al.* 2008) nebo Scytodidae (Araújo *et al.* 2005c).

Zatímco u entelegygnních pavouků převažují chromozomy akrocentrické, u pavouků haplogygnních se nacházejí spíše chromozomy metacentrické (Rodríguez-Gill *et al.* 2002, Král *et al.* 2006). Protože dvouramenné chromozomy převažují i u mygalomorfních pavouků (Řezáč *et al.* 2006), můžeme se domnívat, že jsou pro pavouky ancestrálním morfologickým typem (Král *et al.* 2006).

U čeledí Segestridae a Dysderidae nacházíme holokinetické chromozomy (difúzní kinetická aktivita je rozprostřena podél celého chromozomu díky nepřítomnosti centromery) (Díaz a Sáez 1966, Benavente a Wettstein 1980, Rodríguez-Gill *et al.* 2002). Král (2006) zjistil přítomnost holokinetických chromozomů i ostatních čeledí nadčeledi Dysderoidea a domnívá se, že přítomnost holokinetických chromozomů je pro tuto nadčeleď ancestrální.

---

<sup>1</sup> Údaje o počtech druhů v jednotlivých řádech a infrařádech byly převzaty z Platnickova katalogu pavouků (Platnick, 2009)

## 2.3.1 Pohlavní chromozomy pavouků

### 2.3.1.1 Systémy pohlavních chromozomů

Systémy pohlavních chromozomů u pavouků jsou velmi variabilní a jistě si zaslouží, aby se jim věnovala dostatečná pozornost. Jako ancestrální typ se jeví nejfrekventovanější systém  $X_1X_20$  (nula značí nepřítomnost alozomu Y). Samci nesou dva nehomologické chromozomy  $X_1$  a  $X_2$ , samice dva páry chromozomů  $X_1X_1$  a  $X_2X_2$  (Hackman 1948, Patau 1948), mají tedy v karyotypu o dva chromozomy více<sup>2</sup>. Tento systém byl poprvé objeven u pokoutníka *Agelenopsis naevia* (Wallace 1909) a dosud byl nalezen u 77 % studovaných druhů pavouků (Araújo *et al.* 2005b). Na tomto místě je třeba znova zmínit, že přibližně 90 % cytogenetických studií se věnovalo zástupcům entelygynní větvi araneomorfních pavouků, protože se však jedná o nejodvozenější větev pavouků, nemůžeme z častého výskytu tohoto typu systému pohlavních chromozomů usuzovat nic o jeho původnosti. Co však podporuje hypotézu o původním systému pohlavních chromozomů  $X_1X_20$ , je jeho objev i u nejstarobylejší skupiny pavouků Mesothelae neboli sklípkošů (Suzuki 1954). Tento systém byl nalezen taktéž u jiných skupin živočichů a to u některých lasturnatek, hmyzu a hlístů. V těchto případech však nelze tento systém považovat za ancestrální (White 1973).

Dosud si nejsme jistí, jaký je původ  $X_1X_20$  systému pohlavních chromozomů. Existují dvě hypotézy o jeho vzniku. Ta starší hovoří o vzniku  $X_1X_20$  rozpadem původního metacentrického chromozomu X (Patau 1948). Druhá předpokládá nondisjunkci X v systému  $X0$  a následné rozruznění chromozomů  $X_1$  a  $X_2$  (Postiglioni a Brum-Zorrilla 1981).

Navzdory evoluční stabilitě systému  $X_1X_20$  u některých druhů pavouků nacházíme další systémy pohlavních chromozomů jako  $X_1X_2X_30$  a  $X_1X_2X_3X_40$ . Systém  $X_1X_2X_30$  byl poprvé objeven u *Tegenaria domestica* (Sokolska 1925). Systém  $X_1X_2X_3X_40$  byl zatím nalezen jen u tří druhů (Datta a Chatterjee 1983). Systémy s více než dvěma chromozomy X se často vyskytují u mygalomorfních pavouků (Dulíková 2009). I když klasickými cytogenetickými metodami nelze původ pohlavních chromozomů pavouků odhalit s určitostí, předpokládá se, že systémy  $X_1X_2X_30$  a  $X_1X_2X_3X_40$  vznikly nondisjunkcí X (Postiglioni a Brum-Zorrilla 1981). Tato teorie je podpořena příležitostným výskytem nondisjunkcí ve spermatocytech některých pavouků s  $X_1X_20$  systémem (Suzuki 1954).

---

<sup>2</sup> Toto pravidlo o větším počtu chromozomu X v karyotypu samic můžeme samozřejmě vztáhnout i na druhy se složitějším systémem pohlavních chromozomů. Samice mají vždy 2x tolik chromozomů X jako samci, naopak chromozom Y postrádají.

Dalším systémem pohlavních chromozomů, který u pavouků nalézáme, je X0. Pravděpodobně vznikl v evoluci vícekrát, a to centrickou (Hackmann 1948) či tandemovou (Bole-Gowda 1950) fúzí gonozomů X<sub>1</sub> a X<sub>2</sub>. Centrickou fúzí vzniká dvouramenný chromozom X, tandemovou fúzí zase gonozom akrocentrický.

Systémy pohlavních chromozomů obsahující neopohlavní chromozomy nejsou u pavouků tak časté. Zatím byly nalezeny jenom u některých skupin převážně primitivních araneomorfních pavouků (Král 2006). Přesto bych ráda uvedla několik případů, kde se tyto složitější systémy vyskytují právě mimo tuto skupinu, a to jak u pavouků entelegynních, tak i mygalomorfních. Systém X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>Y, jenž vznikl ze systému X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>0 fúzí mezi chromozomem X a autozomem, byl nalezen u skákavek rodu *Habronattus* a *Evarcha* (Maddison 1982)<sup>3</sup>. Dále bych ráda zmínila systém X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>Y přítomný u pokoutníka *Malthonica ferruginea*, jenž vznikl zařazením dvou chromozomových párů do systému X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>0 (Král 2007). Velmi zajímavý systém pohlavních chromozomů X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>Y<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>Y<sub>3</sub>Y<sub>4</sub> byl nalezen u maloočky *Delena cancerides* (Rowell 1985). Vznikl několika fúzemi mezi X a několika autozomy. Zatím nejsložitější systém gonozomů mezi pavouky objevila moje kolegyně Lenka Dulíková (2009) u mygalomorfního pavouka *Poecilotheria fasciata*, jedná se o systém X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>X<sub>7</sub>X<sub>8</sub>X<sub>9</sub>X<sub>10</sub>X<sub>11</sub>Y<sub>1</sub>Y<sub>2</sub>Y<sub>3</sub>Y<sub>4</sub>.

U *Atypus affinis* (Atypidae) našel Řezáč (2006) systém pohlavních chromozomů XY, stejný systém byl nalezen i u haplogynního pavouka *Leptoneta infuscata* (Leptonetidae) (Král et al. 2006). Tento systém vznikl v obou případech z X0 přestavbami mezi chromozomem Y a autozomy. Stejný systém byl nalezen i u několika dalších zástupců haplogynních pavouků: *Austrochilus sp.* (Austrochilidae), v rodě *Diguetia* (Diguetidae). Zde je však původ tohoto systému poněkud odlišný. Pravděpodobně vznikl ze systému X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y (Král et al. 2006), jenž nacházíme u některých skupin bazálních araneomorfních pavouků. Tento systém pohlavních chromozomů zahrnující drobný neopohlavní chromozom Y, byl nalezen u čeledi - Drymusidae, Hypochilidae, Filistatidae, Sicariidae a Pholcidae, což by naznačovalo, že tento systém pohlavních chromozomů by mohl být pro tyto čeledi ancestrální (Král et al. 2006). Poprvé systém X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y objevil Hetzler (1979) u *Loxosceles reclusa* (Sicariidae) a *Kukulcania hibernalis* (Filistatidae). Tento nálezy ovšem publikoval pouze jako abstrakt. Systém X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y byl dále nalezen kupříkladu u *Loxosceles intermedia* (Sicariidae) a *Loxosceles laeta* (Sicariidae). Počet chromozomů v karyotypech samců obou druhů je 23 a skládají se pouze

---

<sup>3</sup> Byl to vůbec poprvé, kdy byl nálezy Y chromozomu u pavouků publikovaný v odborném periodiku ve formě článku.

z dvouramenných chromozomů (Y je submetacentrický). Tento systém pravděpodobně vznikl ze systému  $X_1X_20$  translokací X na autozom (Silva *et al.* 1988, Silva *et al.* 2002).

Druhotně došlo u některých zástupců výše jmenovaných čeledí k redukci na systém XY nebo na X0 přítomný u některých pholcidů (Král *et al.* 2006). Je možné, že i některé haplogynní druhy pavouků, u kterých byl systém pohlavních chromozomů určen jako  $X_1X_20$ , jsou ve skutečnosti  $X_1X_2Y$ . Y chromozom totiž bývá zpravidla velmi drobný a může se snadno přehlédnout (Král *et al.* 2006).

### 2.3.1.2 Mechanismus párování pohlavních chromozomů

Chování pohlavních chromozomů samců pavouků během meiotického dělení se od chování autozomů odlišuje v několika aspektech. Během 1. meiotického dělení (již od leptotne) vykazují všechny pohlavní chromozomy X obvykle pozitivní heteropyknózu. Tato výraznější barvitelnost je způsobena větší spiralizací pohlavního chromatinu. V anafázi I se pohlavní chromozomy často opožďují za ostatními autozomy. V interkinezi jsou již všechny chromozomy dekondenzované a heteropyknóza pohlavních chromozomů se znovu objevuje až v telofázi II (Patau 1948, Suzuki 1954) nebo o něco dříve již v metafázi II či v anafázi II (Král *et al.* 2006). Pohlavní chromozomy samic pavouků nejsou heteropyknotické a během prvního meiotického dělení vytvářejí klasické bivalenty s chiasmaty stejně jako autozomové páry (Suzuki 1954, Král 1994), v novějších pracech je i u pohlavních chromozomů samic nacházená heterochromatizace a s ní spjatá výraznější barvitelnost (Král 2007).

Až použití transmisní elektronové mikroskopie pomohlo objasnit proces párování nehomologních chromozomů X u samců pavouků. Bylo nalezeno několik způsobů achiasmatického párování gonozomů (Král 1994). První způsob konjugace, byl pomocí modifikovaného synaptonemálního komplexu, který byl nazván „junction lamina“. Od normálního syneptonemálního komplexu se liší skladbou proteinů a ultrastrukturou (Benavente a Wettstein 1977). Tento způsob párování byl nalezen u tří zástupců čeledi Lycosidae a u *Polybetes pythagoricus* (Sparassidae). U pavouků z čeledi Dysderidae a Segestridae s holokinetickými chromozomy spolu pohlavní chromozomy těsně asociují, nevytváří se mezi nimi žádná junction lamina ani jiná struktura (Benavente a Wettstein 1980). Další typ párování našel Benavente (1982) u druhu *Tegenaria domestica* (Agelenidae), kde je synapse zabezpečena výběžky chromatinu. Pravděpodobně bude tento způsobem synapse přechodným typem mezi typem s junction laminou a typem s těsně přiléhajícími pohlavními



chromozomy. Získaná data naznačují, že mechanismus párování pohlavních chromozomů koresponduje s fylogenetickým postavením jednotlivých taxonů (Benavente *et al.* 1982, Král 1994).

Odvozený systém  $X_1X_2Y$  častý u haplogynních pavouků se od běžnějších systémů pohlavních chromozomů, zahrnujících jenom chromozomy X, odlišuje jak strukturou tak i způsobem párování chromozomů. Gonozomy systému  $X_1X_2Y$  tvoří v metafázi prvního meiotického dělení heteropyknotický trivalent. K jejich asociaci dochází už v premeiotické interfázi (Silva *et al.* 2002, Král *et al.* 2006). Podobný jev je znám v premeiotické interfázi entelegynních pavouků, u kterých vícečetné chromozomy X asociují na periférii jádra (Hackmann 1948). Při tvorbě trivalentu nedochází ke vzniku chiasmat. Gonozomy párují svými konci, nicméně strukturální detaily párování jsou zatím neznámé. Jedná se o způsob asociace nazývaný v odborné literatuře „end to end“ (White 1973, Král *et al.* 2006). V anafázi I se pak Y pohybuje k jednomu pólu dělicí vřeténka a chromozomy X, jež jsou spolu asociované, putují k druhému pólu (Král *et al.* 2006).

Mechanismus párování chromozomů bez tvorby chiasmat samozřejmě nebyl studován jenom u pavouků, ale i u mnoha dalších živočišných skupin (Wolf 1994). Jedním z nejoblíbenějších modelů pro studium achiasmatického párování je *Drosophila melanogaster*. Byly u ní nalezeny hned dva typy párování. Achiasmatické autozomové bivalenty spolu asociují díky homologiím v euchromatinových oblastech, zatímco pohlavní chromozomy párují díky rDNA (McKee a Karpen 1990, Park a Yamamoto 1995), konkrétně pomocí mezerníkových repetitiv (McKee *et al.* 1992). Podobný způsob párování pomocí vnitřních transkribovaných repetitiv, jež se nachází v transkripční jednotce pro 45S rRNA, byl nalezen u mšice *Acyrtosiphon pisum* (Mandrioli *et al.* 1999). Způsob párování pomocí rDNA může být široce rozšířený, přítomnost stříbrem barvitelných spojení mezi pohlavními chromozomy během meiózy je totiž fenomén rozšířený u různých skupin organismů (Mandrioli *et al.* 1999). U savců je párování pohlavních chromozomů, jež nesdílí žádnou homologii, často umožněno díky modifikovanému synaptonemálnímu komplexu (Page *et al.* 2003, Page *et al.* 2006).

### 2.3.2 Difúzní stádium

Diverzita pavouků se odráží i v rozmanitosti jejich meiotických procesů. Jednou z nejznámějších modifikací meiózy nalézanou u pavouků je difúzní stádium. Bylo popsáno

poprvé už v roce 1925 Wilsonem. Je to speciální etapa profáze I, při níž dochází k výrazné dekondenzaci chromozomů. Po této etapě následuje diplotene, jejíž pozdní část je charakteristická opětovnou kondenzací chromozomů (Ueshima 1979). Význam difúzního stadia ještě nebyl plně objasněn, ale byl navrhnout model, podle kterého chromozomy mění organizaci smyček chromatinu z meiotické na organizaci, odpovídající G2 fázi mitotického cyklu, ve které jsou dekondenzované chromozomy aktivně transkribovány (Stack a Anderson 2001).

Velmi častý je výskyt difúzního stadia u rostlin (Klásterská 1977). Avšak můžeme ho najít i u živočišných skupin, například u ploštic je častým jevem. Stupeň dekondenzace chromozomů se však u jednotlivých druhů liší (Lanzome a Souza 2006). Také u haplogynních pavouků se vyskytuje difúzní stadium různé délky. Velmi dlouhé je zejména u haplogynních pavouků s holokinetickými chromozomy. Může dokonce nahrazovat typickou diplotene a u některých druhů i diakinezi. Autozomové bivalenty bývají v této etapě silně despiralizovány. Gonozomy jsou, na rozdíl od autonomů, kompaktní a tvoří pozitivně heteropyknotické tělíčko, které se obvykle nachází na okraji jádra (Benavente a Wettstein 1980, Král *et al.* 2006).

Ačkoli se u haplogynních pavouků difúzní stadium vyskytuje u obou pohlaví, u jiných skupin živočichů je běžnější jeho výskyt pouze u pohlaví samičího, v jehož pohlavních buňkách se díky vysoké transkripční aktivitě vytváří množství zásobních látek potřebných pro vyvíjející se oocyty (Král *et al.* 2006).

### 2.3.3 Karyotypy a pohlavní chromozomy třesavek

Studiu chromozomů třesavek (Pholcidae) nebylo zatím věnováno příliš mnoho pozornosti, a to hned z několika důvodů. Jak samotné třesavky, tak jejich chromozomy jsou velmi drobné, navíc je kvůli nesnadné fixaci u některých zástupců velmi obtížné získat kvalitní chromozomové preparáty (Suzuki 1954, Araújo *et al.* 2005a).

První cytogenetickou analýzu zástupce čeledi Pholcidae provedl Painter (1914). Při studiu *Spermophora meridionalis* (podle dnešního názvosloví *Spermophora senoculata*) zjistil, že se její karyotyp skládá z malých metacentrických chromozomů, nebyl však už schopen zjistit jejich přesný počet v karyotypu. Odhalil jenom přítomnost dvou chromozomů X. Dalším studovaným druhem byl *Pholcus crypticolens*, u něhož bylo nalezeno 22 autozomů a dva gonozomy X (Suzuki, 1954). Mezi další studie zabývající se třesavkami patří například

práce Cokendolpha z roku 1989 zabývající se chromozomy tří rodů *Physocyclus* (*P. californicus*, *P. enaulus*, *P. sp.*). U všech byl nalezen stejný karyotyp 15,X0. Zatím poslední zveřejněná studie přináší karyotypy dvou druhů *Mesabolivar brasiliensis* a *Mesabolivar cyaneotaeniatus*. Oba mají v samčím karyotypu 17 chromozomů a systém pohlavních chromozomů X0 (Ramalho *et al.* 2008).

Dosud bylo karyotypováno 16 zástupců čeledi Pholcidae, což jsou méně než 2 % z celkového počtu druhů této čeledi. Přesto můžeme říct, že jsou třesavky nejprozkoumanější čeledí bazálních araneomorfních pavouků. Souhrn všech karyotypovaných druhů udává tabulka 1. Diploidní počty chromozomů u samců se pohybují mezi 15 a 32. Převažují metacentrické, případně submetacentrické chromozomy. Nacházíme různé systémy pohlavních chromozomů - od nejjednoduššího systému X0 přes  $X_1X_20$  až po nejsložitější  $X_1X_2Y$  (Oliveira *et al.* 2007; Ramalho *et al.* 2008). Král (2006) se domnívá, že právě systém  $X_1X_2Y$  by mohl být pro třesavky, stejně jako pro řadu dalších čeledí haplogynních pavouků, ancestrální typem systému pohlavních chromozomů.

### 2.3.4 Karyotypy a pohlavní chromozomy sklípkánků

Z mygalomorfní čeledi sklípkánků (Atypidae) jsou dosud cytogeneticky prozkoumány pouze čtyři druhy, a to *Atypus karschi* z Japonska (Suzuki 1954) a tři naši sklípkánci - *Atypus affinis*, *Atypus muralis*, *Atypus piceus* (Řezáč *et al.*, 2006).

Karyogram samce *Atypus karschi* je tvořen zřejmě 44 malými akrocentrickými chromozomy (údaj o počtu chromozomů je uváděn s rezervou), systém pohlavních chromozomů je  $X_1X_20$  (Suzuki 1954).

Samci *Atypus muralis* a *Atypus piceus* mají shodný počet chromozomů 41, většina postupně se zmenšujících chromozomů je metacentrických. Systém pohlavních chromozomů je X0. Karyotyp samce *Atypus affinis* je opravdu unikátní, má jen 14 dvouramenných chromozomů. To je vůbec nejmenší počet chromozomů, jaký byl u mygalomorfních pavouků dosud nalezen. Jedná se o velmi odvozený karyotyp. Systém pohlavních chromozomů tohoto pavouka je neo-XY, tento systém pohlavních chromozomů byl u pavouků, a to jak mygalomorfních tak i araneomorfních, nalezen úplně poprvé. Velikost chromozomů v karyotypu *Atypus affinis* se nesnižuje postupně, ale první čtyři autozomové páry a také pohlavní chromozomy jsou výrazně větší než dva malé autozomové páry. Největší

autozomový pár je dokonce 8x větší než pár nejmenší, což nasvědčuje tomu, že redukce počtu chromozomů u *Atypus affinis* se uskutečnila prostřednictvím fúzí (Řezáč *et al.*, 2006).

druh	2n samec	morfologie chromozomů	autoři
<i>Artema atlanta</i>	32,X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-	Parida a Sharma 1987, Sharma a Parida 1987
<i>Crossopriza lyoni</i>	27,X0 24,X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0 25,X0 23,X0	26M, XM 22M, X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A - 22M, XM*	Bole-Gowda 1958 Sharma <i>et al.</i> 1959 Srivastav a Shukla 1986 Parida a Sharma 1987, Sharma a Parida 1987
<i>Holocnemus caudatus</i>	23,X0	16M, 6SM, XM	Král <i>et al.</i> 2006
<i>Mesabolivar brasiliensis</i>	17,X0	17M nebo SM, XM	Ramalho <i>et al.</i> 2008
<i>Mesabolivar cyaneotaeniatus</i>	17,X0	17M nebo SM, XM	Ramalho <i>et al.</i> 2008
<i>Mesabolivar luteus</i>	15,X0	14M, XM	Araújo <i>et al.</i> 2005a
<i>Micropholcus fauroti</i>	17,X0	17M nebo SM, XM	Araújo <i>et al.</i> 2005a
<i>Pholcus manueli</i>	25,X0	25A až T, XSM	Wang <i>et al.</i> 1997
<i>Pholcus crypticolens</i>	24,X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	22M, X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> A	Suzuki 1954
<i>Pholcus phalangoides</i>	24,X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0 25,X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	- 18M, 4SM ,X <sub>1</sub> M, X <sub>2</sub> SM, YM	Rodríguez-Gil <i>et al.</i> 2002 Král <i>et al.</i> 2006
<i>Pholcus sp.</i>	26,X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	-	Sharma a Parida 1987
<i>Physocyclus californicus</i>	15,X0	14M, XM	Cokendolpher 1989
<i>Physocyclus enaulus</i>	15,X0	14M, XM	Cokendolpher 1989
<i>Physocyclus globosus</i>	15,X0	6M, 8SM, XM	Olivera <i>et al.</i> 2007
<i>Physocyclus sp.</i>	15,X0	14M, XM	Cokendolpher 1989
<i>Spermophora senoculata</i>	?X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0 25,X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	M, X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> M 22M, X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> YM	Painter 1914 Král <i>et al.</i> 2006

**Tabulka 1. Cytogeneticky charakterizování Pholcidae.** Morfologie chromozomů: A = akrocentrické chr., M metacentrické chr., SM-submetacentrické chr. a T-telocentrické chr. Uváděny jsou jenom studie, ve kterých byly karyotypy publikovány poprvé, nebo studie s odlišnými výsledky.

Data převzata z Oliveira *et al.* 2007, upraveno a doplněno.

\* Údaje o morfologii chromozomů jsou doplněny ze studie Oliveira *et al.* 2007, jež potvrdila výsledky publikované v práci Bole-Gowdy z roku 1958.

## 2.4 Jadérko a nukleolární organizátory jadérka

### 2.4.1 Struktura jadérka

Jadérko se skládá ze tří hlavních částí: fibrilárních center („fibrillar centres, FCs“), denzní fibrilární komponenty („dense fibrillar component, DFC) a granulární komponenta („granular component, GC“) (Swarzacher a Wachtler 1993, Wachtler a Stahl 1993). Celá struktura jadérka je organizovaná kolem specifických úseků chromozomů obsahujících tandemové repetice rDNA. Tyto úseky, jež se často nacházejí v sekundárních konstrikcích chromozomů, se nazývají organizátory jadérka („nucleolar organizer region, NOR“) (Scheer *et al.* 1993, Swarzacher a Wachtler 1993).

Fibrilární centra o nízké elektronové hustotě se většinou nacházejí v centru jadérka. Jsou obklopena denzní fibrilární komponentou, jež v aktivních buňkách tvoří rozsáhlou síť. Na okraji jadérka se nachází granulární komponenta, jež na rozdíl od předchozích dvou částí není vizualizovatelná pomocí AgNO<sub>3</sub> (Swarzacher a Wachtler 1993, Wachtler a Stahl 1993). Strukturální detaily jadérka jsou různé v závislosti na typu buněk a jejich produkci ribozomů (Wachtler a Stahl 1993).

Thiry a Lafontaine (2005) se domnívají, že kromě nejodvozenějších amniot mají eukaryota jadérko složeno pouze ze dvou částí - z fibrilární a granulární a že rozdělení fibrilárního kompartmentu na FC a DFC bylo umožněno zmnožením intergenových oblastí rDNA.

Kolem jadérka se často nachází perinukleolární chromatin, jeho množství je velmi rozdílné i u blízce příbuzných druhů (Hozák *et al.* 1993, Wachtler a Stahl 1993).

### 2.4.2 Funkce jadérka

Už v šedesátých letech bylo objeveno, že jadérko je místem biogeneze ribozomů. Dochází v něm k transkripci rDNA, k úpravám prekurzorové ribozomové RNA (pre-rRNA), na níž se podílí malé jadérové RNA („small nucleolar RNA, snoRNA“) a konečně k počáteční fázi sestavení ribozomů (Wachtler a Stahl 1993, Pederson 1998, Gerbi *et al.* 2003). Přestože se už v roce 1993 Wachtler a Stahl domnívali, že je všeobecně přijímáno, že k transkripci rDNA dochází především v DFC, je navzdory intenzivnímu výzkumu dosud přesná lokalizace místa transkripce rDNA věcí diskuze. Za možná místa transkripce jsou

považována - FC, DFC nebo jejich hraniční oblast (Huang 2002, Raška 2003, Derenziny *et al.* 2006). V DFC se odehrávají primární posttranskripční úpravy, GC slouží k následujícím krokům biogeneze ribozomů (Scheer *et al.* 1993, Wachtler a Stahl 1993).

Jak ukazují novější práce, vznik ribozomů není zdaleka jediným dějem, jenž se v jadérku odehrává. Kromě pre-rRNA jsou v jadérku modifikovány také prekurzory malých jaderných RNA („small nuclear RNA, snRNA“) (Gerbi *et al.* 2003). Přítomnost nematurované tRNA společně s RNázou P naznačuje, že v jadérku dochází i k úpravám tohoto typu ribonukleové kyseliny (Pederson 1998, Gerbi *et al.* 2003).

Další funkcí jadérka je biogeneze některých ribonukleoproteinových komplexů jako je třeba signál rozpoznávající částice („signal recognition particle, SRP“), jež se podílí na transportu peptidů do endoplasmatického retikula. Nález telomerázové RNA v jadérku svědčí pro jeho možnou roli v buněčném stárnutí (Pederson 1998, Olson *et al.* 2000, Thiry a Lafontaine 2005). Jadérko by se mohlo podílet také na apoptóze a programované buněčné smrti (Smetana 2003).

### 2.4.3 Ribozomová DNA

Ribozomové geny s výjimkou genu pro 5S rRNA jsou lokalizovány v NOR oblastech,. Eukaryotní geny pro 18S rRNA (cca 1 800 nt), 5,8S rRNA (cca 160 nt) a 28S rRNA (přes 4 000 nt) tvoří transkripční jednotku, jež je přepisována polymerázou I jako jedna molekula 45S rRNA. Kromě ribozomových genů obsahuje ještě transkripční jednotka dvě vnější přepisované mezerníkové oblasti („external transcribed spacer, ETS“) a dva vnitřní přepisované mezerníky („internal transcribed spacer, ITS“) ITS 1 a ITS 2 oddělující kódující sekvence. Tato struktura transkripční jednotky je vysoce konzervovaná a podobná u všech eukaryot (Hillis a Dixon 1991). Výše zmíněné sedimentační koeficienty jednotlivých rRNA jsou však typické pro obratlovce a u jiných eukaryot se mohou mírně lišit, kupříkladu u rostlin je místo 28S rRNA přítomna menší 26S rRNA. Přes tuto rozdílnost ve velikosti je mezi ribozomovými geny eukaryot značná homologie (Sumner 2003). Jednotlivé transkripční jednotky jsou od sebe odděleny nepřepisovaným intergenovým mezerníkem („intergenic spacer, IGS“), ve kterém se nachází iniciační místo transkripce a regulační oblasti (Moss a Stefanovsky 1994, Wang *et al.* 2003).

Velké množství kopií ribosomálních transkripčních jednotek je v genomu řazeno za sebou ve formě tandemových repetit (Swarzacher a Wachtler 1993, Wachtler a Stahl 1993)

Délka jedné repetice je však, přes konzervovanost rRNA genů mezi různými druhy, velmi variabilní. Pohybuje se od 7 kb u nižších eukaryot po 40 kb u savců (Wang *et al.* 2003). Tato variabilita je dána jednak různou délkou ITS a ETS mezerníků a především různou délkou IGS mezerníků. Ty jsou velmi různorodé, jak délkově tak sekvenčně. Mohou být dlouhé od 2 kb u *Sachromyces cerevisiae* do 21 kb u savců (Moss a Stefanovsky 1994, Sumner 2003).

Geny pro 5S rRNA (délka cca 120 nt) nejsou obvykle umístěny v oblastech organizátoru jadérka, ale vytvářejí vlastní klastry o stovkách až tisících kopií. Do jadérka tedy musí být 5S rRNA exportována z jádra a zabudována do vznikajícího ribozomu (Pederson a Politz 2000). Od ostatních ribozomových genů se liší ještě ve dvou ohledech - nejsou přepisovány polymerázou I, ale polymerázou III (tedy stejnou polymerázou, jež přepisuje geny pro tRNA) a neobsahují žádné přepisované mezerníky (Swarzacher a Wachtler 1993, Wachtler a Stahl 1993, Wang *et al.* 2003).

#### **2.4.3.1 Ribozomová DNA ve fylogenetické analýze**

Rozdílnost rychlostí mutačních změn jednotlivých částí transkripční jednotky rDNA je podstatou jejího využití v širokém spektru fylogenetických studií od rekonstrukce fylogeneze na úrovni tříd až po úroveň rodů (Hillis a Dixon 1991).

Gen pro 18S rRNA je ve fylogenezi vůbec nejpoužívanější ribozomový gen. Patří totiž mezi vůbec nejpomaleji se měnící geny, a proto se může využít pro studium velmi starých fylogenetických událostí z dob prekambria (Hillis a Dixon 1991). Samozřejmě je užitečný i pro divergence odehrávající se v období paleozoika - od studia fylogeneze členovců (McClintock Turbeville *et al.* 1991, Giribet a Ribera 2000) po fylogenezi vyšších obratlovců (Hedges *et al.* 1990).

Gen pro 28S rRNA vykazuje různou rychlost vývoje jednotlivých podjednotek. Proto se může využít ke studiu evolučních událostí od prekambria přes paleozoikum a mezozoikum a při pečlivém výběru lze některé její sekvence použít pro rekonstrukci evolučních událostí kenozoika. Nejčastěji je však používán na prvohorní a druhohorní události (Hillis a Dixon 1991). Analýza 28S rRNA genu byla užita například u studia fylogeneze drobných korýšů krunýřovek (Jarman *et al.* 2000). Srovnávání různých 28S rRNA genů lze použít také pro odhalení kryptických druhů, jako například při studiu mygalomorfního pavouka *Antrodiaetus riversi* (Starrett a Hedin 2006).

5S a 5,8S rRNA geny vykazují podobnou konzervovanost jako 18S rRNA gen, ale jejich délka neumožňuje jejich využití pro studium fylogeneze během delšího časového období (Hillis a Dixon 1991). V některých případech se však i tyto krátké rRNA geny ve fylogenetických studiích využít dají, zvláště gen pro 5,8 rRNA (Odorico a Miller 1997).

ITS oblasti mutují naopak velmi rychle (jen o málo pomaleji než mitochondriální rDNA) a mohou se tedy použít při zkoumání fylogeneze blízkce příbuzných druhů, které se oddělily před méně než 50 miliony lety (Hillis a Dixon 1991, Odorico a Miller 1997). Mohou se také používat jako marker v populačních genetických studiích (Hillis a Dixon 1991) nebo při identifikaci druhů. Zvláště výhodné je to u organismů jako jsou kvasinky, jejichž určování podle morfologických a fyziologických znaků je velmi náročné (Esteve-Zarzoso *et al.* 1999).

Mitochondriální rRNA geny jsou používány hlavně na obratlovcích a jejich vysoká mutační rychlost (mnohem vyšší než u jaderných rRNA genů) umožňuje jejich použití pro fylogenetické události posledních 20 milionů let (Hillis a Dixon 1991). Stejně jako ITS oblasti se může využít při rozpoznávání druhů, třeba pro potřeby forenzní analýzy (Shukla *et al.* 2001), objevování kryptických druhů (Starrett a Hedin 2006) nebo je můžeme použít jako marker pro genetické studie populací (Brutto *et al.* 2004).

Při použití genu pro 18S rRNA pro rekonstrukci fylogeneze musíme zohledňovat, stejně jakou ostatních ribozomových genů, nestejnou mutační rychlosti v různých místech sekvence („among-site rate variation“). Velmi vhodné je pro konstrukci fylogenetických stromů užívání počítačově náročné metody maximální věrohodnosti („maximum likelihood metod“) spolu s tzv. gama rozložením, jež bere v úvahu nestejnou mutační rychlost na jednotlivých pozicích (Yang 1996). Na nedostatečnost dříve používaných a jednodušších metod rekonstrukce fylogeneze upozorňuje Abouheif (1998). Dnes již naštěstí existuje množství softwarových aplikací určených pro rekonstrukci fylogeneze jako je PAML 4 (Yang 2007).



## 3 Materiál a metody

### 3.1 Materiál

Pavouci byli sbíráni mnou či ostatními členy naší laboratoře. Některé druhy byly získány výměnou či darem - *Holocnemus plucheii* a *Holocnemus hispanicus* od doc. RNDr. Jaromíra Hajera, CSc. z Univerzity Jana Evangelisty Purkyně z Ústí nad Labem, *Leptopholcus guineensis* od Dr. Bernharda A. Hubera z Univerzity v Bonnu a *Aliatypus sp.* na přípravu sondy na rDNA Atypidů od pana Marshala Hedina, Ph.D. ze Státní univerzity v San Diegu.

U zástupců čeledi Pholcidae byly na přípravu preparátů používány gonády čerstvě svlečených adultních samců nebo gonády samců subadultních. Řadu exemplářů bylo tedy nutné dochovat v laboratorních podmínkách, třesavky byly krmeny bezkřídlými formami octomilek. Pokud nebylo v subadultním stádiu možné rozpoznat pohlaví jedince, bylo nutné subadultní jedince často kontrolovat a co nejdříve po svleku do adultního stádia pavouka usmrtit, vypítvat gonády a připravit preparáty. To proto, že u některých druhů (např. u *Spermophora senoculata*<sup>4</sup>) končí vývojová fáze doprovázená meiotickým dělením prekurzorů pohlavních buněk již několik dnů po dosažení adultního stádia. I přes časté kontroly a poměrně velké množství chovaných jedinců se u jednoho druhu *Filistaty insidiatrix* (Filistatidae) nepodařilo vhodné stadium zachytit a nemohl být tedy do práce zařazen.

U zástupců čeledi Atypidae není možné rozpoznat pohlaví subadultních jedinců a rovněž meiotické dělení končí velmi brzo po dosažení dospělosti, navíc díky podzemnímu způsobu života nejsou možné pravidelné vizuální kontroly. Proto byly subadultní jedinci, kteří byly krmeni cvrčky (*Achaeta domestica*, *Gryllus assimilis* a *G. bimaculatus*), pro přípravu preparátů vybírání náhodně. Ukázalo se, že z celkového množství nasbíraných exemplářů sklípkánek bylo jenom minimum samčích jedinců, na některé aplikace byly proto zprvu používány i preparáty ze samičích gonád, nakonec se však podařilo připravit i dostatek preparátů ze samců.

V tabulce jsou uvedeny lokality sběru studovaných druhů spolu s použitými cytogenetickými metodami.

---

<sup>4</sup> U tohoto druhu je krátká vývojová fáze vhodná pro přípravu preparátů spojená ještě s velmi malou velikostí gonád (cca 1 mm). Z jednoho jedince je tedy možné připravit pouze jeden preparát. Navíc bylo nutno materiál získávat ze zahraničí. Kombinace těchto jevů činí studium meiotických chromozomů tohoto druhu velmi náročným.

Druh (čeleď)	Lokalita sběru	Země původu	Použité metody
<i>Atypus affinis</i> (Atypidae)	Šárecké údolí (Praha)	ČR	FISH, C, S
<i>Atypus piceus</i> (Atypidae)	Přerovská hůra (Přerov nad Labem)	ČR	FISH, C
<i>Holocnemus hispanicus</i> (Pholcidae)	Larache*	Maroko	FISH, K
<i>Holocnemus pluchei</i> (Pholcidae)	Catania*	Itálie	FISH, K
<i>Leptopholcus guineensis</i> (Pholcidae)	Basse-Guinée poblíž Kindia	Guinea	K
<i>Loxosceles rufescens</i> (Sicariidae)	Sede Boqer a Yeroham	Izrael	FISH
<i>Pholcus opilionoides</i> (Pholcidae)	Jakubčovice n. Odrou Žleby (okr. Kutná Hora)	ČR	K
<i>Pholcus phalangioides</i> (Pholcidae)	České Budějovice a Žleby (okr. Kutná Hora)	ČR	FISH
<i>Smeringopus</i> sp. nov. 1. (Pholcidae)	Andreba poblíž Ambatondrazaka	Madagaskar	K
<i>Smeringopus</i> sp. nov. 2. (Pholcidae)	Bloemfontein (Oranžsko)	JAR	K
<i>Spermophora senoculata</i> (Pholcidae)	Mitra (Évora)	Portugalsko	FISH

**Tabulka 2. Seznam studovaných druhů doplněný zkratkami použitých metod.** FISH – vizualizace nukleolárních organizátorů jádérka fluorescenční in situ hybridizací, C - vizualizace konstitutivního heterochromatinu C pruhováním, S – lokalizace NORů transkričně aktivních v předchozí interfázi pomocí AgNO<sub>3</sub>, K – příprava klasických chromozomových preparátů.

\* Jedná se o původní lokality sběrů, studované exempláře pocházely z chovu ze skleníku Univerzity Jana Evangelisty Purkyně z Ústí nad Labem. Populace *Holocnema hispanica* je ve skleníku od roku 1998 a *H. pluchei* od roku 1995.

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Příprava chromozomových preparátů

Preparáty byly vyráběny modifikací roztěrové metody (Traut 1976). Ve fyziologickém roztoku pro motýly rodu *Ephestia* (Lokwood 1961) byly pavoukům ihned po jejich usmrcení pod binokulární lupou vypitvány gonády. Ty byly následně hypotonizovány 15 min. u pavouků čeledi Pholcidae, 25 min. u čeledi Atypidae v 0,075 M roztoku KCl (Lachema). Následovala fixace ve směsi methanolu (p.a., Merck nebo p.a, Sigma-Aldrich) a kyseliny

octové (p.a., Merck) v poměru 3:1. U většiny studovaných jedinců byla fixace prováděna dvakrát (10 minut a 20 minut), u velkých gonád sklípkánek byla pro lepší odvodnění materiálu fixace prováděna třikrát (5, 10 a 20 minut). Na vyčištěné podložní sklíčko byl přenesen malý kousek nafixované gonády a pastérkou byly přidány 2-3 kapky 60% kyseliny octové. Z tkáně byla pomocí dvou wolframových jehel vyrobena suspenze buněk. Poté byl preparát ihned přenesen na histologickou ploténku o teplotě 40 – 42 °C. Při přípravě preparátu určeného na C pruhování byla teplota ploténky o 5 –10 °C nižší, aby se snížilo narušení chromatinu. Kapka suspenze byla pomocí wolframové jehličky roztírána po sklíčku téměř do úplného odpaření, aby se mitotické či meiotické figury rozptýlily po povrchu skla. Zbytek kapky byl ze sklíčka sklepnut.

Takto připravené preparáty byly na druhý den (či později) barveny 5 % roztokem barviva Giemsy (Merck) v Sørensenově fosfátovém pufru (pH 6,8) po dobu 25 minut. Vybraná skla se nebarvila a byla uskladněna pro další aplikace (viz dále). Preparáty zvolené pro aplikaci FISH byly odvodněny ve vzestupné ethanolové řadě (70 %, 80 % a 96 %) a uskladněny v mrazničce při -20 °C. Preparáty na C pruhování byly uloženy do chladničky (7 – 10 °C).

Obarvené preparáty byly prohlíženy mikroskopem Olympus BX 50, vybrané figury sloužící k setavení karyogramu či dokumentující průběh meiotického dělení byly snímány pomocí CCD kamery DP 71 (program CellID).

Karyogramy byly vytvářeny z dobře rozprostřených metafází II v programu Corel Photo Paint X3. Délka chromozomů byla měřena pomocí programu ImageTool. Měření jednotlivých ramen bylo prováděno od středu centromery až ke konci ramene. Morfologie chromozomů byla určována podle Levanovy klasifikace (Levan *et al.* 1964). Podle této klasifikace je centromerický index určen poměrem dlouhého a krátkého raménka chromozomu. Chromozomy jsou v karyotypu seřazeny podle relativní chromozomové délky (RCD), jež je vypočítávána jako procentuální podíl na celkové délce všech chromozomů v diploidní sadě (včetně chromozomů pohlavních). Když bylo v karyotypu přítomno více X chromozomů, jsou seřazeny dle klesající velikosti. U pavouků čeledi Pholcidae byl zaznamenáván výskyt bivalentů s více než jedním chiasmatem.

### 3.2.2 Vizualizace konstitutivního heterochromatinu C pruhováním

Čtyři až pět dní staré neobarvené preparáty, vyrobené výše popsanou metodou, se nejprve nechaly hodinu sušit při teplotě 60 °C. Po zchladnutí byly na 30 minut ponořeny do 0,2M roztoku HCl (Penta) a opláchnuty destilovanou vodou. Následovalo další 2 - 3 hodinové sušení při pokojové teplotě.

Dále byly preparáty inkubovány v nasyceném roztoku Ba(OH)<sub>2</sub> (Lachema) (3-5 min., 50 °C) a ihned opláchnuty destilovanou vodou o teplotě přibližně 33 °C a pak ještě destilovanou vodou o pokojové teplotě, aby se důkladně zabránilo vysrážení uhličitanu barnatého na sklech. Po 2 - 3 hodinách schnutí byly preparáty inkubovány v 2x SSC o pH 7,0 (70 – 75 min, 60 °C). Nakonec byly preparáty opláchnuty destilovanou vodou o pokojové teplotě.

Další den byly preparáty obarveny 5% roztokem barviva Giemsky v Sørensenově fosfátovém pufru, doba barvení byla prodloužena na 75 minut. K pozorování a vyhodnocení preparátů byly využity stejné přístroje a software jako v případě klasicky obarvených preparátů.

### 3.2.3 Stříbření

Tato tradiční metoda je využitelná pouze k detekci NORů, jež byly transkribovány v předchozí interfázi. Nedochází při ní vlastně k vizualizaci rDNA jako takové, ale specifických proteinů asociovaných s oblastmi rDNA. Stříbření bylo prováděno podle protokolu uvedeném v Howel a Black 1980.

Ke stříbření byly použity standardně připravené preparáty obarvené Giemsou. Na skla byly skleněnou tyčinkou nanесeny 3 kapky dvouprocentní želatiny, okyselené 1 ml kyseliny mravenčí, a 6 kapek 50% AgNO<sub>3</sub> (Lachema) tak, aby se kapky želatiny a dusičnanu stříbrného nedotýkaly. Potom byly kapky rychle promíchány. Preparát byl zakryt krycím sklem o rozměrech 25x40 mm a přenesen na histologickou ploténku zahřátou na 50 °C. Preparát byl na ploténce ponechán, dokud se původní šedofialová barva neproměnila v cibulově žlutou (přibližně 3 - 4 minuty). Pak byl preparát rychle opláchnut pod proudem vody, čímž došlo ke spláchnutí krycího sklíčka spolu s reagujícími sloučeninami. Po oschnutí byly preparáty prohlíženy mikroskopem Olympus BX 50.

### 3.2.4 Vizualizace nukleolárních organizátorů jáderka fluorescenční in situ hybridizací

K detekci rDNA tvořící NORy byla použita fluorescenční in situ hybridizace (FISH). Její princip spočívá v hybridizaci denaturované vyšetřované DNA a fluorescenčně značené sondy. Po oddělení řetězců DNA se navozují reasociační podmínky, za nichž se sonda, jež je přítomna v nadbytku, váže ke komplementárním sekvencím neboli hybridizuje s vyšetřovanou DNA. V oblastech komplementarity pak můžeme pozorovat, díky označení sondy fluorescenčním barvivem, hybridizační signál.

Aby bylo dosaženo zesílení tohoto signálu, bylo pracováno s nepřímo značenou sondou. Použito bylo značení biotinem, který byl detekován protilátkou - streptavidinem s navázaným fluorochromem Cy3.

Na FISH jsem využila sondy hned ze tří druhů pavouků, a to z *Eresus kollari*, *Pholcus phalangoides* a *Aliatypus* sp. Ze samic (pohlaví bylo zvoleno náhodně) prvních dvou druhů byla DNA izolována pomocí chloroform/fenol/izoamylalkoholovou extrakcí (Graham 1978). Ze samice *Aliatypa* byla DNA izolována pomocí kitu AquaPure Genomic DNA Isolation Kit (Bio-Rad, Hercules, USA).

Z celogenomové DNA byl pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) amplifikován úsek 18S rDNA. Byly použity univerzální primery pro 18S rDNA členovců 18S-Ins-forward primer (5' CCTGAGAAACGGCTACCACATC-3') a 18S-Ins-reverse (5'-GAGTCTCGTTCGTTATCGGA-3') (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika). Na jednu PCR reakci o celkovém objemu 25  $\mu$ l bylo použito: 10x Ex Taq pufr (2,5  $\mu$ l) a 5 U/ $\mu$ l TaKaRa Ex Taq HS DNA polymeráza (0,40  $\mu$ l), dNTP o koncentraci 2,5 mM (2  $\mu$ l), 100 ng templátové DNA, 1,25  $\mu$ l každého z primerů o koncentraci 10  $\mu$ M a do finálního objemu bylo doplněno miliQ H<sub>2</sub>O (DNA polymeráza, pufr a nukleotidy pocházejí od TaKara, Otsu, Japonsko). Počáteční denaturace (3 min, 94 °C) byla následována sérií 30 cyklů – denaturace 1 min. 94 °C, nasedání primerů půl minuty 51 °C, prodlužování řetězce 1 min. 72 °C. Fáze prodlužování řetězce byla v posledním cyklu o 9 min. prodloužena.

Následovala elektroforetická separace v 1% agarózovém gelu. Produkt PCR reakce vytvořil proužek, jenž byl z gelu vyříznut a extrahován pomocí kitu QIAquick Gel Extraction (Qiagen GmbH, Hilden, Německo). Extrahovaná 18S rDNA byla použita jako templát pro další PCR amplifikaci, jejíž produkt byl následně naznačen biotin-14-dATP metodou

nicktranslace pomocí kitu Bionick Labeling System (Invitrogen, Life Technologies Inc., San Diego, Kalifornie).

Ke značené sondě (50 ng na preparát) byla přidána DNA z lososích spermii (25 µg na preparát) (Sigma-Aldrich). Sonda byla precipitována přidáním Na-acetátu a předchlazeného ethanolu (100%) a centrifugována (20 min., 13 000 rpm), supernatant byl odstraněn. Ke zbylému peletu byl přidán předchlazený ethanol - tentokrát 70% a následovala druhá centrifugace (5 min., 13 000 rpm). Po opětovné centrifugaci (15 min., 13 tis. rpm.) byl co nejdůkladněji odstraněn veškerý supernatant. Mikrozkumavka s hybridizační směsí se nechala vysušit v termomixu při 37 °C do úplného odpaření ethanolu. Poté byla sonda rozpuštěna ve 100% formamidu (Sigma-Aldrich) při teplotě 37 °C po dobu 30 min. za třepání. Po přidání 20 % dextransulfátu (5 µl na preparát) byla sonda denaturována při 95 °C přesně 5 minut a ihned přemístěna na led. Před nanášením na preparáty byla hybridizační směs ještě protřepána a centrifugována.

Neobarvené preparáty z -20 °C byly odvodněny ve vzestupné alkoholové řadě (70% 80% 96% EtOH (Merck)) po jedné minutě. Poté byla skla hodinu zapékána při 65 °C, aby mohla být inkubována s proteinázou K (Sigma-Aldrich) (5 min., 37 °C) a aby tím bylo zabráněno výskytu desek DAPI. Následovalo promývání v kyvetách s 1x PBS, 2x 5 min (37 °C). Tento krok se ukázal relevantní jenom u některých druhů pavouků, a proto byl později v některých případech vynecháván. Po odstranění proteinů byla skla inkubována s RNázou A (Sigma-Aldrich). Po nanesení 100 µl na každé sklo byly preparáty zakryty krycím sklem a inkubovány hodinu při 37 °C. Následovalo opláchnutí v kyvetách s 2x SSC, 2x 5 minut. Kvůli potlačení nespecifické hybridizace byla skla inkubována v 5x Denhardtovým reagens za třepání na vodní lázni (30 min., 37 °C). Dále byla skla denaturována ve 100 µl 70% formamidu (Sigma-Aldrich), zakryta krycím sklem a vložena do termomixu ( 3 min. 30 sekund, 68 °C). Po dokončení denaturace byla okamžitě odstraněna krycí sklíčka a preparáty byly vloženy do předchlazeného (-20 °C) 70% ethanolu na 1 minutu, následovalo odvodňování v 80% a 96% ethanolu (30 sekund).

Po úplném oschnutí skel bylo na každé nanášeno 10 µl předem připravené a denaturované hybridizační směsi a skla byla přikryta krycím sklíčkem. Poté byly okraje skel zalepeny Rubber cementem (Marabu) a nechány přes noc inkubovat ve tmě v krabici s filtračním papírem napuštěným 2x SSC v termostatu při 37 °C (délka hybridizace se pohybovala v rozmezí 17-19 hodin).

Druhý den byl z preparátů pomocí pinzety odstraněn Rubber cement. Následovala série promývání (praní) v kyvetách umístěných na třepacích vodních lázních sloužící k odstranění nespecifických signálů. Nejprve byly preparáty promývány ve třech kyvetách s 50% formamidem v 2x SSC (po 5 minutách při 46 °C). Po promytí v první kyvetě byla z preparátu odstraněna krycí sklíčka. Dále byly preparáty promývány v pěti kyvetách s 2x SSC (v každé 2 min. při 46 °C). Poslední bylo promývání ve třech kyvetách s 0,1x SSC (v každé 5 min. při 62 °C). Po důkladném oplachu byla skla nechána minimálně pět minut ve tmě při pokojové teplotě inkubovat v 4x SSC pufru obsahujícím 0,1% Tween 20 (Gerbu), (tento krok je možno bez jakýchkoli důsledků prodloužit až na 40 minut).

Dalším krokem byla detekce sondy. Nejprve byla zablokována reakce na sklech, a to přidáním 500 µl 2,5% BSA (Gerbu) na každé sklo. Preparáty byly zakryty krycím sklíčkem a nechány inkubovat ve tmě 20 min. při pokojové teplotě. Následovala inkubace pod krycím sklem se 100 µl streptavidinu-Cy3 (Jackson Immuno Research Laboratories) také ve tmě 30 min. při pokojové teplotě. Preparáty byly promyty 3x 3 min. v 4x SSC/0,1 % Tween 2 za třepání na vodní lázni při 37 °C.

Zesílení signálu bylo dosaženo několika kroky: zablokováním reakce pomocí 500 µl 2,5 % BSA, poté přidáním 50 µl antistreptavidinu (Vector), následovala inkubace pod krycím sklem při 37 °C po dobu 20 min. Preparáty byly proprány stejným způsobem jako po první inkubaci se streptavidinem-Cy3. Následovala další blokáce a zesílení signálu pomocí 100 µl streptavidinu-Cy3, inkubace pod krycím sklem 20 min. při 37 °C a poslední promývání.

Dále byly chromozomy podbarveny pomocí DAPI (Sigma-Aldrich) a to následovně (všechny kroky probíhaly za pokojové teploty a při třepání): prvním krokem bylo promytí v 1% TritonX (Sigma-Aldrich)/2x PBS za třepání 5 min, barvení 4-5 min v 40 ml - 40 µl DAPI v 1% TritonX/1x PBS, další promytí 3-5 min. v 1% PhotoFlo (Sigma-Aldrich)/1x PBS a poslední promytí jednu minutu v PhotoFlo/miliQ vodě. Preparáty se ponechaly částečně oschnout, poté byly zakápnuty 20 µl antifadem a zakryty krycím sklíčkem, aby se mohl antifade rozprostít. Pomocí filtračního papíru byla vytlačena přebytečná viskózní tekutina a okraje krycího sklíčka byly překryty barevným lakem na nehty. Po zaschnutí laku byly preparáty ihned připraveny k pozorování.

Preparáty byly prohlíženy ve fluorescenčním mikroskopu Zeiss Axioplan 2 vybaveném příslušnými sadami fluorescenčních filtrů. Černobílé digitální fotografie byly snímány pro každou fluorescenční barvu odděleně digitální kamerou F-View (Olympus) se CCD čipem při využití softwaru AnalySIS 3.2. Dále byly snímky zpracovávány za využití

programu Adobe Photoshop CS2. Konkrétně se jednalo o přiřazení barev černobílým snímkům a jejich skládání.

Jak výroba preparátů, tak i jejich pozorování, probíhalo na oddělení genetiky v Entomologickém ústavu AV ČR v Českých Budějovicích v laboratoři Prof. Františka Marece, pod vedením RNDr. Magdy Vítkové, Ph.D.



## 4 Výsledky

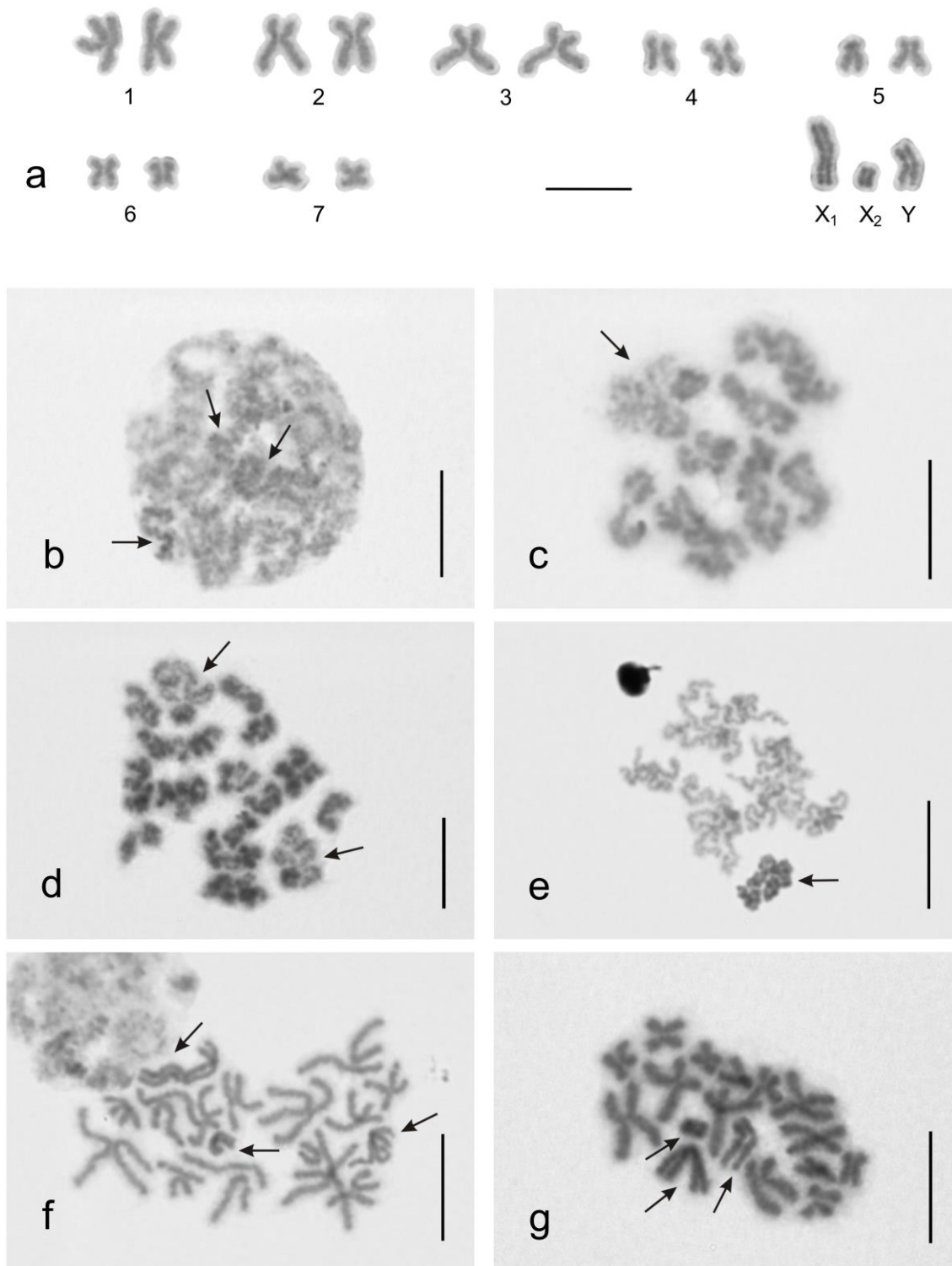
### 4.1. Karyotypy haplogynních pavouků čeledí Pholcidae a Sicariidae

#### 4.1.1 Pholcidae - pholcini

##### *Leptopholcus guineensis* Millot, 1941

V karyotypu samce nalezneme 17 dvouramenných chromozomů, systém pohlavních chromozomů je  $X_1X_2Y$  (obr. 3a). Druhý, čtvrtý a pátý autozomový pár je tvořen chromozomy submetacentrickými, zbytek autozomů je metacentrických.  $X_1$  a  $Y$  jsou metacentrické,  $X_2$  má submetacentrickou morfologii. Chromozomy můžeme rozdělit do dvou velikostních tříd, do první patří tři autozomové páry a chromozom  $X_1$ , do druhé zbývající chromozomy včetně chromozomu  $X_2$ , jenž je s RCD 2,82 % nejmenším chromozomem karyotypu. Submetacentrický chromozom  $Y$  se velikostně nachází mezi těmito dvěma skupinami, díky nižšímu stupni kondenzace chromatinu (viz dále) jej však řadím ke skupině menších chromozomů. Na koncích dlouhého raménka třetího a čtvrtého chromozomového páru si můžeme povšimnout výrazněji probarvených bloků telomerického heterochromatinu (obr. 3a).

V premeiotické interfázi tvoří pohlavní chromozomy heteropyknotické pohlavní tělíčko nacházející se na periférii jádra. V pachytene je pozitivní heteropyknóza gonozomů velmi slabá, pohlavní tělíčko je již rozpadlé a gonozomy spolu neasociují (obr. 3b). Následuje difúzní stádium, ve kterém jsou všechny chromozomy despiralizovány, stupeň rozvolnění autozomů je mírně větší než u gonozomů. V diplotene a diakinezi jsou gonozomy  $X_1$  a  $X_2$  rozvolněné, negativně heteropyknotické a asociují koncovými částmi svých ramének s gonozomem  $Y$ , ten je kondenzovaný stejně jako autozomové páry a je izopyknotický (obr. 3c). Během metafáze I nastává mírná kondenzace  $X$  chromozomů, stále však zůstávají negativně heteropyknotické (obr. 3d). V diplotene, diakinezi ani v metafázi I nebyly nalezeny žádné bivalenty s více než jedním chiasmatem (pozorováno bylo 20 figur). V anafázi I jsou gonozomy izopyknotické. V profázi II jsou všechny gonozomy pozitivně heteropyknotické a nacházejí se blízko sebe (obr. 3e), během prometafáze pozitivní heteropyknózu postupně ztrácí (obr. 3f). V metafázi II si však zachovávají prometafázní stupeň kondenzace, navíc u nich nedochází k separaci chromatid, jsou tedy od autozomů dobře odlišitelné (obr. 3g). Izopyknotické zůstávají gonozomy až do konce meiotického dělení. Ve všech etapách meiotického dělení se gonozomy nacházejí spíše na okrajích figur.



**Obrázek 3. *Leptopholcus guineensis*, karyogram a průběh meiotického dělení samce.**

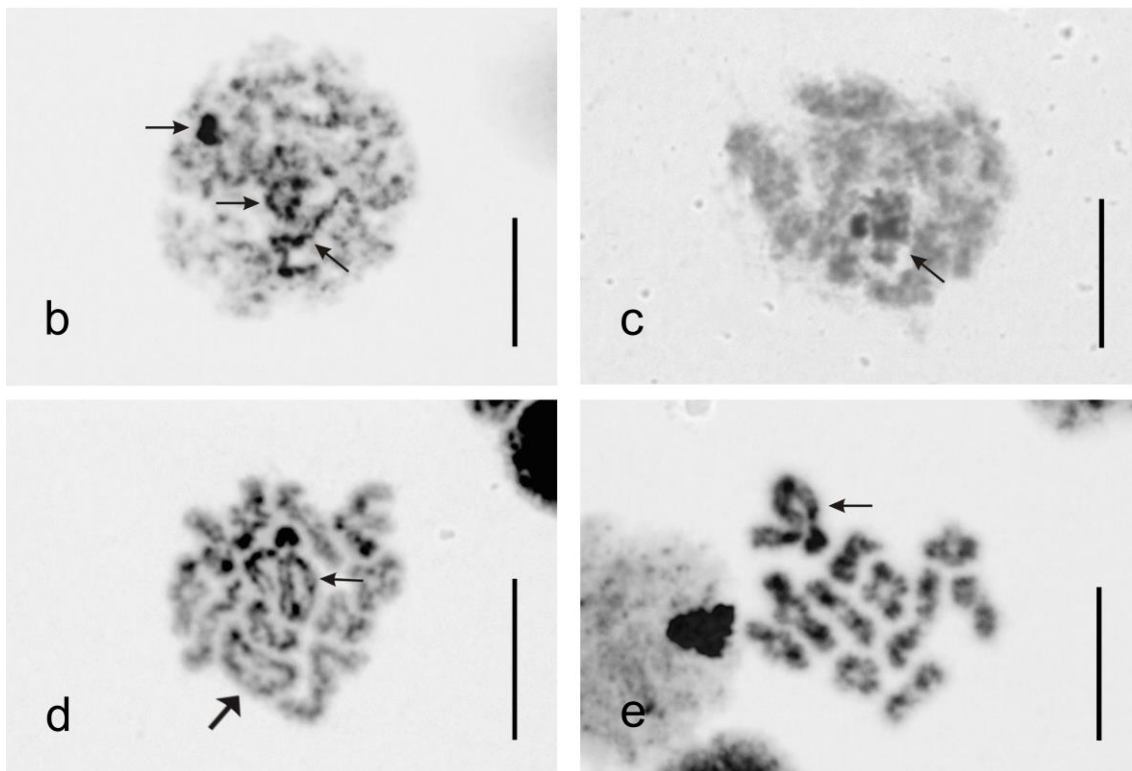
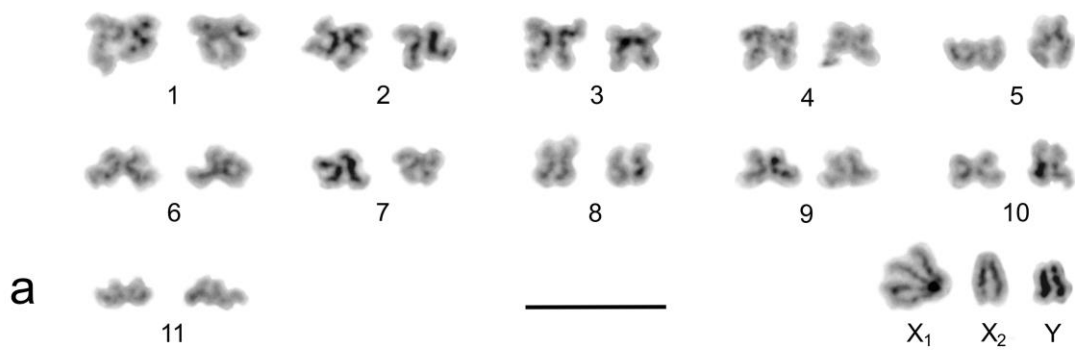
Šipky na snímcích b až g ukazují na pohlavní chromozomy, ať už separované či asociované v trivalentu.

a) karyogram samce, sestaveno ze sesterských metafází II; b) pachytene; c) diplotene-diakineze; d) metafáze I; e) profáze II, gonozomy jsou separované, ale nacházejí se blízko sebe na okraji figury; f) sesterské prometáfáze II, v této etapě je jasně viditelná morfologie gonozomů; g) splynulé sesterské metafáze II. Měřítko – 10  $\mu\text{m}$ .

***Pholcus opilionoides*** (Schrank, 1781)

Samčí karyotyp je tvořen 25 chromozomy, systém pohlavních chromozomů je stejně jako u předchozího druhu  $X_1X_2Y$  (obr. 4a). Velikost chromozomů v karyotypu se snižuje plynule. Převažují metacentrické chromozomy, dále jsou přítomny 3 submetacentrické autozomální páry (4., 5. a 6.) a submetacentrický gonozom Y, jenž je chromozomem nejmenším. Pohlavní chromozom  $X_1$  metacentrické morfologie je největším chromozomem v karyotypu,  $X_2$  velikostně patřící mezi středně velké chromozomy je subteloцентриcký (obr. 5a).

Během premiotické interfáze pohlavní chromozomy tvoří pozitivně heteropyknotické tělísko nacházející se na periférii jádra. Při přechodu do profáze I je přítomno několik separovaných heteropyknotických chromozomů, patrně se jedná o chromozomy pohlavní (obr. 4b). Pachytenních figur jsem našla jenom velmi malé množství a žádná z nich nebyla dobře rozložena, předpokládám, pachytne a diplotene jsou zřejmě z podstatné části nahrazeny dlouhým difúzním stádiem (obr. 4c). V tomto stádiu jsou pohlavní chromozomy narozdíl od silně despiralizovaných autozomových bivalentů výrazně pozitivně heteropyknotické. Tato, i když o něco slabší heteropyknóza, přetrvává až do diakineze (obr. 4d) a metafáze I (obr. 4e). V těchto etapách tvoří pohlavní chromozomy trivalent,  $X_1$  asociuje s Y pomocí koncových oblastí obou ramének, zatímco asociace  $X_2$  je zprostředkována pouze telomerickými oblastmi dlouhého raménka. Výskyt bivalentů s více chiasmaty v diplotene, diakinezi a metafázi I byl velmi nízký. Bivalenty s dvěma chiasmaty jsem našla jenom u 2 figur ze 40, to znamená, že se tyto bivalenty u této třesavky nacházejí jenom s 5procentní frekvencí. Jeden z těchto vzácných případů je zachycen na obrázku 5d. Bivalenty s více než dvěma chiasmaty se u tohoto druhu vůbec nevyskytují. Další etapy, ve kterých jsou pohlavní chromozomy pozitivně heteropyknotické, jsou anafáze I, profáze II a anafáze II, tyto etapy meiotického dělení jsou však podstatně kratší než ty z první poloviny heterotypického dělení, proto se nepovedlo vytvořit žádné ilustrativní fotografie.



**Obrázek 4. *Pholcus opilionoides*, karyogram a průběh meiotického dělení samce.**

a) karyogram samce, sestaveno z nesesterských metafází II; b) přechod z interfáze do profáze, šipky ukazují na gonozomy; c) difúzní stádium, šipky ukazují na gonozomy tvořící pohlavní tělísko; d) diakineze, šipka míří na pohlavní trivalent, silná šipka míří na bivalent se dvěma chiasmaty; e) metafáze I, pohlavní trivalent označuje šipka. Měřítka – 10  $\mu\text{m}$ .

### ***Pholcus phalangioides*** (Fuesslin, 1775)

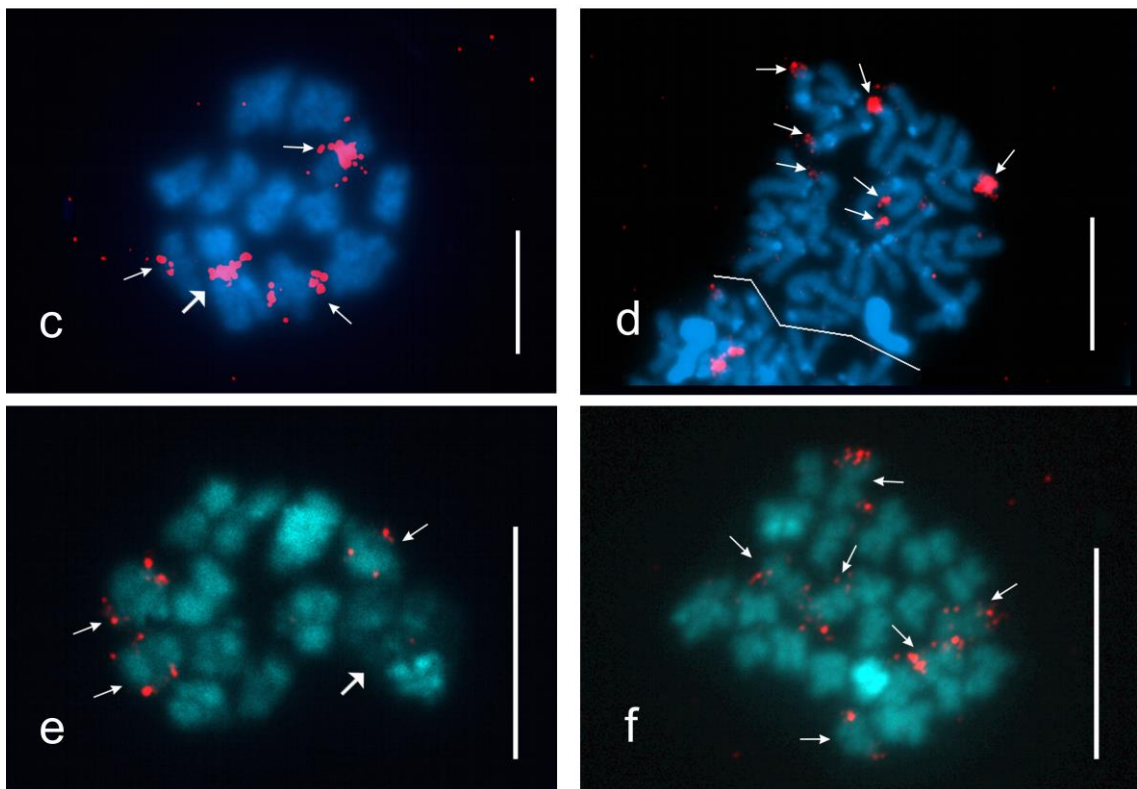
Karyotyp této třesavky obsahuje 25 chromozomů, systém pohlavních chromozomů je  $X_1X_2Y$  (obr. 5a). Karyotyp se skládá hlavně z metacentrických chromozomů, jsou zde však přítomny i chromozomy submetacentrické, konkrétně se jedná o chromozom  $X_2$  a chromozomové páry 7 a 11 (Král *et al.* 2006).

Chromozomy tohoto druhu podléhaly během fluorescenční in situ hybridizace značné destrukci, destabilizace struktury chromatinu byla mnohem výraznější než u ostatních zkoumaných druhů. Původně dobře rozložené chromozomy se rozpíjely, až bylo obtížné rozlišit jejich hranice. U toho druhu byla také přítomna nejvyšší nespecifická hybridizace. Z těchto dvou důvodů byla lokalizace NORů velmi obtížná. Ve figurách diakinezi a metafázi I jsem NORy našla na třech autozomových bivalentech a na pohlavním trivalentu (obr. 5c). U čtvrtiny figur těchto etap byly pozorovatelné nevýrazné hybridizační signály ještě na dalších dvou bivalentech. Tyto signály nabývaly přibližně čtvrtinové intenzity silnějších signálů. V mitotických metafázích byly signály nalezeny v terminální oblasti jednoho raménka na sedmi chromozomech na jednom chromozomu byly nalezeny na koncích obou ramének, z jeho velikosti usuzuji, že se jedná o gonozom  $X_1$  (obr. 5d). Díky větší heteropyknóze mitotického chromozomu Y, podle níž je snadno identifikovatelný, je zřejmé, že se na něm žádný NOR nenachází. Z lichého počtu hybridizačních signálů lze tedy vyvodit, že se zbývající NOR bude nalézat na gonozomu  $X_2$ . Také v mitotických figurách se občas vyskytovaly další velmi slabé signály na proměnlivém počtu dalších chromozomů. Nejméně informativní byly metafáze II, struktura chromozomů byla v této etapě nejvíce narušena.

### ***Spermophora senoculata*** (Dugčs, 1836)

Karyotyp samce je 25,  $X_1X_2Y$  (obr. 5b), velikost chromozomů v karyotypu se snižuje plynule. Všechny chromozomy tohoto druhu jsou metacentrické (Král *et al.* 2006).

V diakinezi a metafázi I oba chromozomy X pohlavního trivalentu vykazují i po fluorescenčním barvení negativní heteropyknózu, zatímco Y chromozom je izopyknický, to velmi usnadňuje identifikaci trivalentu (obr. 5e). Proto mohu i přes poměrně malé množství získaných figur s jistotou říci, že se na žádném z gonozomů hybridizační signál nenachází. Klastry rDNA byly objeveny na třech autozomových bivalentech, jedná se o bivalenty velké až střední velikosti (obr. 5e). Dohromady jsou tedy NORy přítomny na šesti chromozomech (obr. 5f). U všech párů jsou NORy umístěny na terminálním konci jednoho raménka.



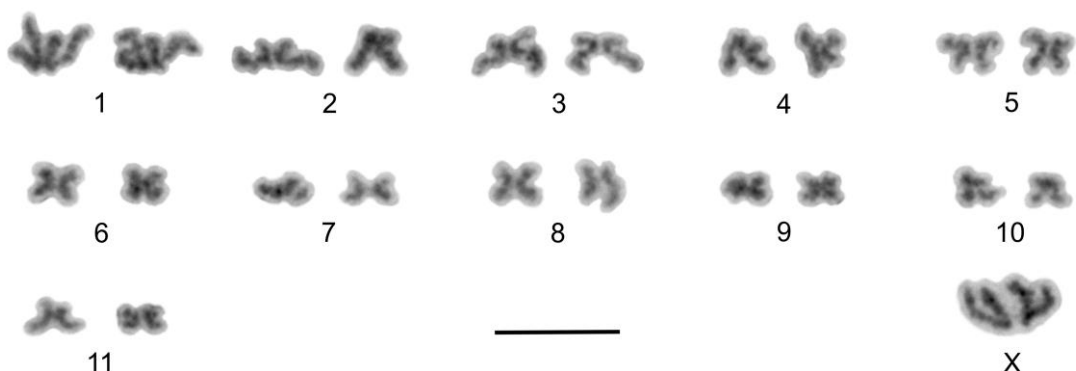
**Obrázek 5. Karyogramy samců *Pholcus phalangioides* a *Spermophora senoculata* (převzato a upraveno z Krále *et al.* 2006) a distribuce NORů na chromozomech obou druhů (vizualizováno pomocí FISH s 18 rDNA sondou. a) karyogram samce *P. phalangioides*; b) karyogram samce *S. senoculata*; c) *P. phalangioides* – metafáze I, šipky ukazují na hybridizační signály na bivalentech, široká šipka ukazuje na signál na trivalentu; d) *P. phalangioides* – mitotická metafáze; šipky směřují k terminálně umístěným signálům; e) *S. senoculata* – metafáze I, šipky ukazují na hybridizační signály na bivalentech, trivalent pohlavních chromozomů (široká šipka) je bez NORů; f) *S. senoculata* – metafáze II, šipky míří na hybridizační signály na koncích ramen, nejvíce heteropyknotický útvar je chromozom Y. Měřítko – 10 μm.**

#### 4.1.2 Pholcidae - holocnemini

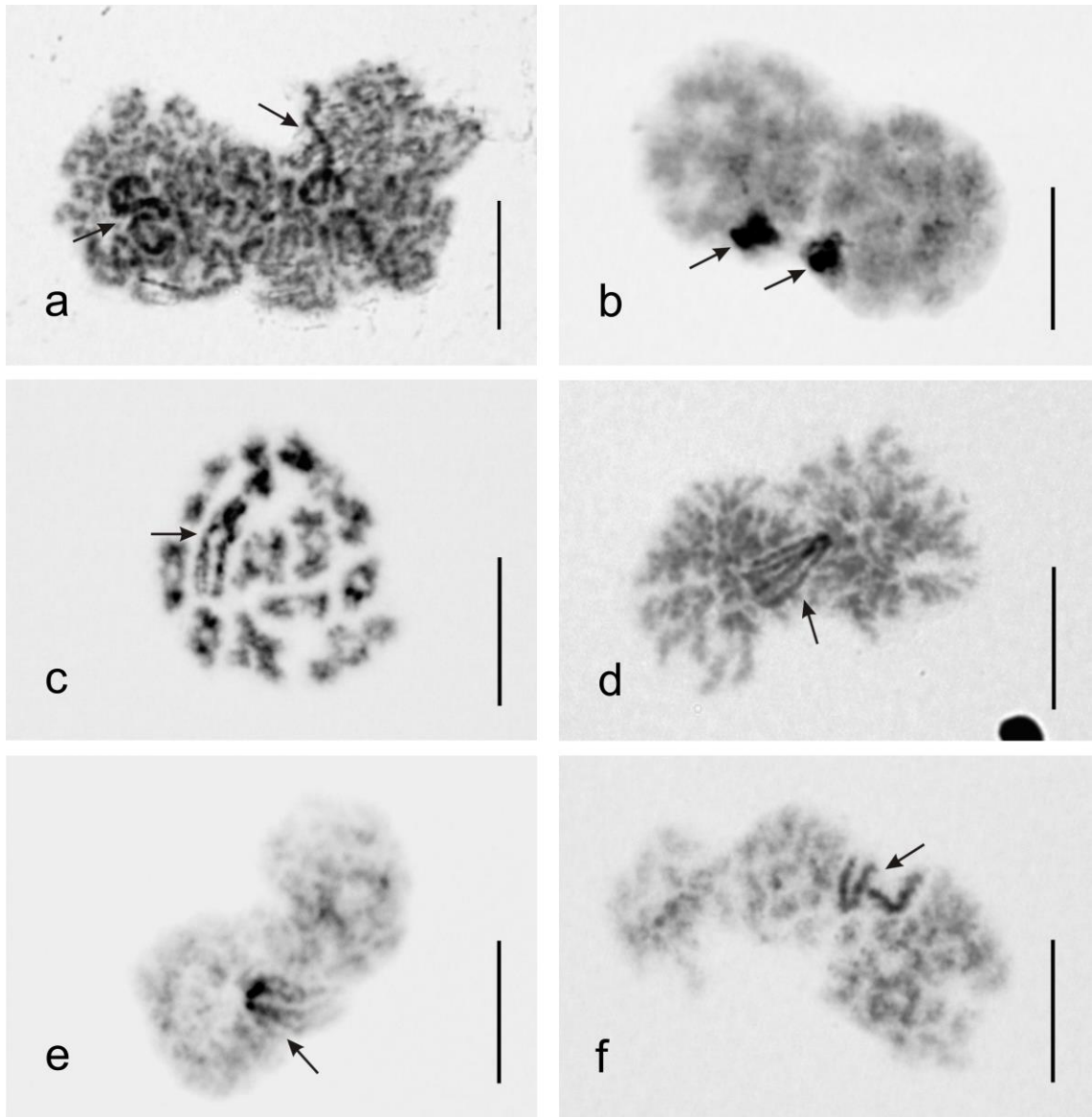
##### *Holocnemus hispanicus* (Wiehle, 1993)

Karyotyp samce je tvořen 23 dvouramennými chromozomy, z toho je jenom jeden chromozom pohlavní (obr. 6). První čtyři autozomové páry jsou submetacentrické, u menších chromozomů je přesné určení polohy centromery značně náročné, avšak kromě 10. páru jsou zřejmě všechny další autozomové páry metacentrické. Také gonozom X, největší chromozom v karyotypu, je metacentrický. Gonozom X a první autozomový pár jsou větší než ostatní autozomové páry, dále se však velikost chromozomů snižuje již plynule.

Pozitivní heteropyknóza pohlavního chromozomu X se objevuje již v premeiotické interfázi, kdy X tvoří pohlavní tělísko, větší barvitelnost zůstává během pachytene (obr. 7a), ve které je pohlavní chromozom rozbalen, až do difúzního stádia (obr. 7b), ve kterém se znovu formuje pohlavní tělísko. Během diplotene, diakineze a metafáze I chromozomy postupně kondenzují a ramena chromozomu X se přiklápějí k sobě a vytváří tak útvar podobný písmenu V (obr. 7c). Ze 30 pozorovaných diplotene – metafází I jsem našla bivalent se dvěma chiasmaty jenom v jediném případě. V těchto etapách se pozitivní heteropyknóza chromozomu X objevuje přibližně ve 40 % figur, ve zbývajících figurách je gonozom izopyknotický. Výraznější heteropyknóza se objevuje až v anafázi I, při které se chromozom X za autozomy opoždí a tvoří anafázní můstek (obr. 7d), a je pozorovatelná i v telofázi I (obr. 7e). V některých figurách je větší barvitelnost chromozomu X naznačena i během metafáze II. Silná pozitivní heteropyknóza X chromozomu se vyskytuje během anafáze II (obr. 7f).



**Obrázek 6.** *Holocnemus hispanicus*, karyogram samce. Sestaveno ze sesterských metafází II. Měřítko – 10  $\mu$ m.



**Obrázek 7. *Holocnemus hispanicus*, průběh meiotického dělení samce.** Šipky ukazují na pohlavní chromozom X. a) pachytene; b) začátek difúzního stádia; c) metafáze I; d) anafáze I s anafázním můstkem tvořeným chromozomem X; e) telofáze I; d) sesterské anafáze II. Měřítko – 10  $\mu\text{m}$ .



NORy byly u *Holocnemus hispanicus* detekovány pomocí rDNA sondy značené biotinem na největším autozomovém bivalentu a na chromozomu X (obr. 13a, b). V metafázi prvního meiotického dělení NOR bivalent častěji zaujímal takové uspořádání, že se hybridizační signály nacházely na koncích bivalentu (obr. 13a), v některých případech jsou však signály lokalizovány i v oblasti párování homologních chromozomů. Konkrétně se bivalenty s koncovou lokalizací NORů vyskytovaly v 80 % případů (analyzováno bylo 15 figur s jasně patrnou morfologií bivalentu a s přesnou lokalizací hybridizačního signálu)<sup>5</sup>. Celkem se tedy u tohoto druhu nacházejí 3 NOR chromozomy – 2 homologní metacentrické chromozomy 1. páru a gonozom X. Hybridizační signály jsou jak u autozomového páru, tak u gonozomu, umístěny na terminálním konci jednoho raménka (obr. 13c).

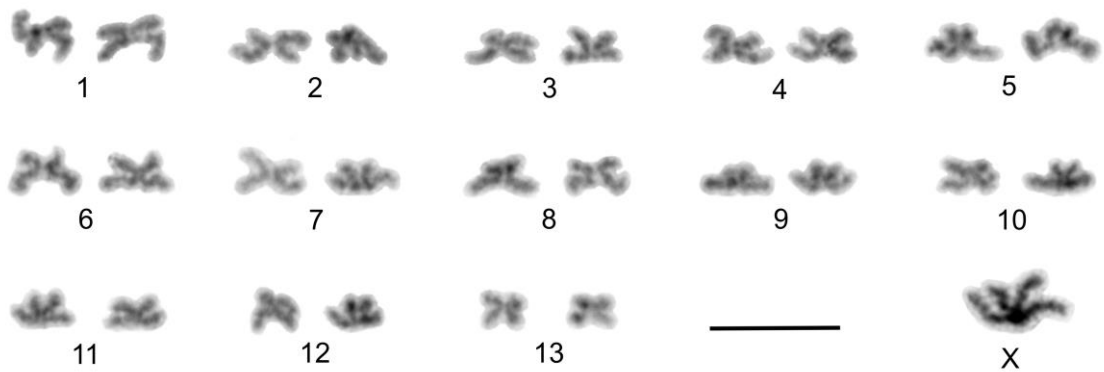
### ***Holocnemus pluchei*** (Scopoli, 1763)

Diploidní počet chromozomů samce je 27, systém pohlavních chromozomů je opět X0 (obr. 8). Velikost chromozomů v karyotypu se snižuje velmi plynule, největší autozomový pár (RCD 4,53 %) nedosahuje ani dvojnásobku velikosti páru nejmenšího (RCD 2,65 %). Jedině chromozom X s RCD 6,82 % se velikostně výrazněji odlišuje. Všechny chromozomy v karyotypu jsou dvouramenné, v několika případech se poměr ramen pohybuje od 1,65 do 1,78 (autozomové páry 1, 5, 8, 9), nacházejí se na hranici mezi chromozomy metacentrickými a submetacentrickými. Zbývající chromozomové páry a gonozom X jsou metacentrické.

V meiotickém dělení vykazuje chromozom X podobné chování jako u *Holocnemus hispanicus*. Je pozitivně heteropyknotický od premeiotické interfáze až do difúzního stádia. V diplotene, jež je díky přítomnosti difúzního stádia zkrácena, je chromozom X výrazně pozitivně heteropyknotický (obr. 9a), v diakinezi a v některých případech ještě i v metafázi I je výrazně despiralizován (obr. 9b). Na konci metafáze I gonozom tvaru V spiralizuje a stavá se izopyknotickým až mírně pozitivně heteropyknotickým (obr. 9c). U tohoto druhu nebyly pozorovány žádné bivalenty s více než jedním chiasmatem (prohlédnuto bylo 30 figur diplotene, diakinze a met. I). Výraznější heteropyknóza gonozomů se objevuje až v anafázi I (obr. 9d), ve které dochází k opožďování chromozomu X. Znovu se odlišné zbarvení gonozomu vyskytuje v profázi II (obr. 9e) a přetrvává až do anafáze II (obr. 9f), pozitivní heteropyknóza v met. II není však tak silná jako v jiných etapách homeotypického dělení a v některých figurách (asi 20 %) zcela chybí.

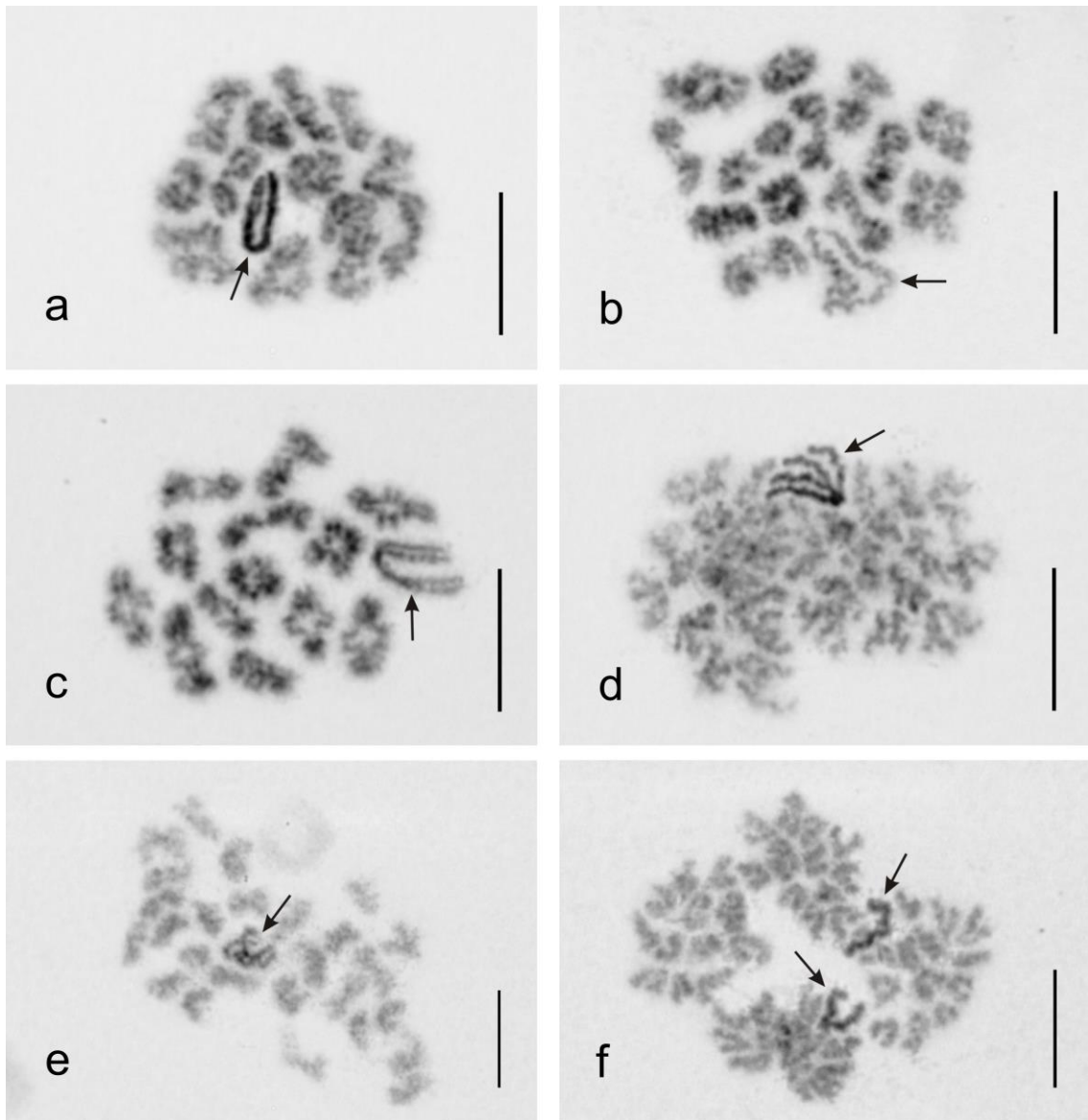
---

<sup>5</sup> Přesná lokalizace místa přisednutí sondy byla možná zhruba v polovině případů kvůli značně rozvolněné struktuře vláken DNA v oblasti NORu.



**Obrázek. 8** *Holocnemus pluchei*, karyogram samce. Sestaveno ze sesterských metafází II. Měřítko – 10  $\mu$ m.

Značená rDNA sonda hybridizovala se dvěma autozomovými bivalenty (obr. 13d). Celkový počet NOR chromozomů je tedy čtyři. Vzhledem k tomu, že se velikost chromozomů v karyogramu snižuje velmi plynule, je obtížné určit, o které páry se přesně jedná. Jeden bivalent je o něco větší, odhaduji, že to může být 2. až 4. chromozomový pár, druhý bivalent je tvořen středně velkými chromozomy. Narozdíl od situace u *Holocnemus hispanicus* byly chromozomy v NOR bivalentech v metafázi I častěji uspořádány tak, že se hybridizační signály nacházely v oblasti párování homologních chromozomů. U většího bivalentu v 74 % případů, u menšího bivalentu téměř vždy, v 91 % případů (obr. 13d), analyzováno bylo 11 figur diakineze a met I. Z metafází II a mitotických metafází je zřetelné, že se NORy nacházejí na konci jednoho raménka (obr. 13e).

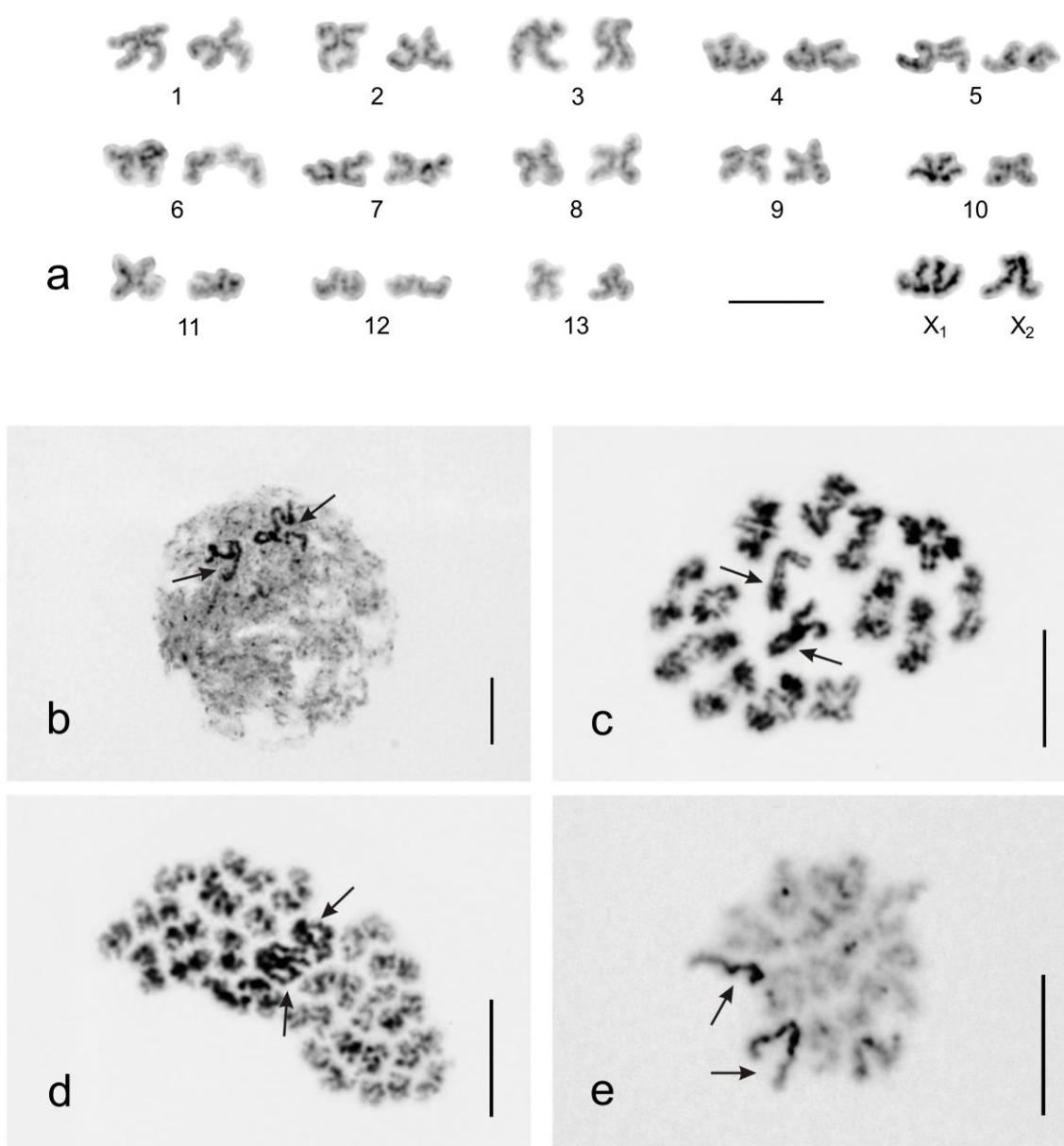


**Obrázek 9. *Holocnemus pluchei*, průběh meiotického dělení samce.** Šipky ukazují na gonozom X. a) diakineze s pozitivně heteropyknotickým gonozomem X; b) časná metafáze I s negativně heteropyknotickým gonozomem X; c) pozdní metafáze I s izopyknotickým X; d) anafáze I; e) profáze II; f) sesterská anafáze II. Měřítko – 10  $\mu\text{m}$ .

### ***Smeringopus* sp. nov. 1 (Madagaskar)**

Karyotyp samce je tvořen 28 chromozomy, z čehož jsou dva chromozomy pohlavní, oba v anafázi I samce segregují ke stejnému pólu, musí se tedy jednat o dva gonozomy X a tudíž o typ  $X_1X_20$  (obr. 10a). V karyotypu se vyskytují až na jedinou výjimku (subtelocentrický chromozom  $X_2$ ) pouze dvouramenné chromozomy. Přesné určení polohy centromery bylo obtížné. V mitotických metafázích nebyly centromery stejně jako u ostatních třesavek patrné u všech chromozomů. Rovněž v metafázích II bylo stanovení centromery těžké a to vzhledem k výskytu výrazných ohnuky coils, jedná se o nejvyšší stupeň stupeň spiralizace chromatinu (Traut 1991). U chromozomů nejlépe rozložené figury, vhodné k sestavení karyogramu, navíc již dochází k separaci chromatid. Velikost chromozomů v karyotypu se snižuje plynule. Největším chromozomem v karyotypu je metacentrický  $X_1$ , jenž však největší autozomový pár nepřevyšuje nijak výrazně. Subtelocentrický  $X_2$  patří mezi středně velké chromozomy.

Pohlavní chromozomy jsou pozitivně heteropyknotické již od premeiotické interfáze, kdy tvoří pohlavní tělísko. Během přechodu do profáze se tělísko rozpadá (obr. 10b), chromozomy však zůstávají silně zbarveny. Následuje krátké difúzní stádium opět s viditelným pohlavním váčkem. V diplotene, diakinezi a v metafázi I (obr. 10c) nebyly nalezeny žádné bivalenty s více než jedním chiasmatem (pozorováno bylo 15 figur). V anafázi I jsou pohlavní chromozomy mírně pozitivně heteropyknotické a segregují později než autozomy. V metafázi II se pohlavní chromozomy nacházejí většinou blízko sebe (obr. 10d) a bývají pozitivně heteropyknotické, stejně jako v anafázi II (obr. 10e).

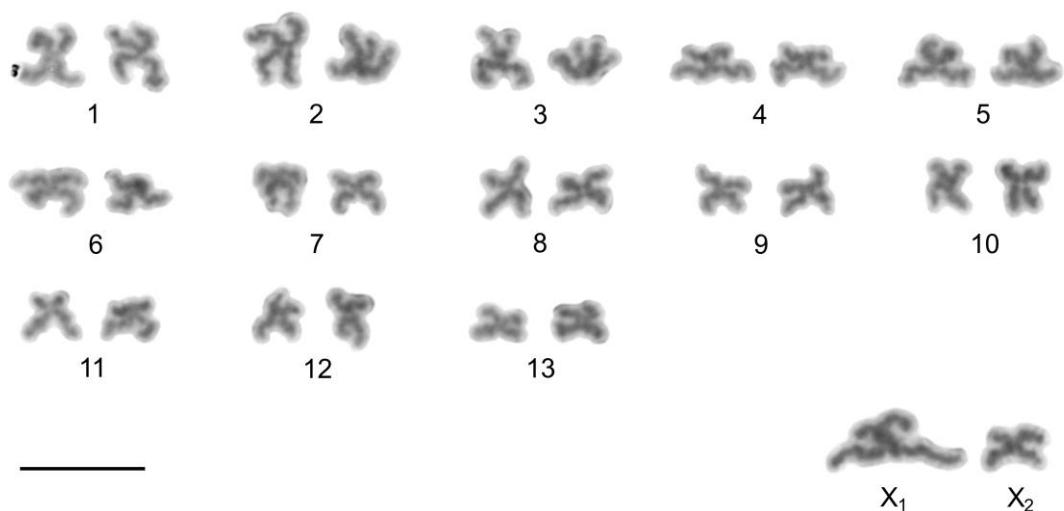


**Obrázek 10:** *Smeringopus* sp. nov. 1 (Madagaskar), karyogram a průběh meiotického dělení samce. Šipky na snímcích b až e míří na pohlavní chromozomy. a) karyogram samce, sestaveno ze sesterských metafází II; b) přechod do profáze; c) metafáze I; d) sesterské metafáze II; e) anafáze II, část figury s pohlavními chromozomy. Měřítko – 10  $\mu$ m.

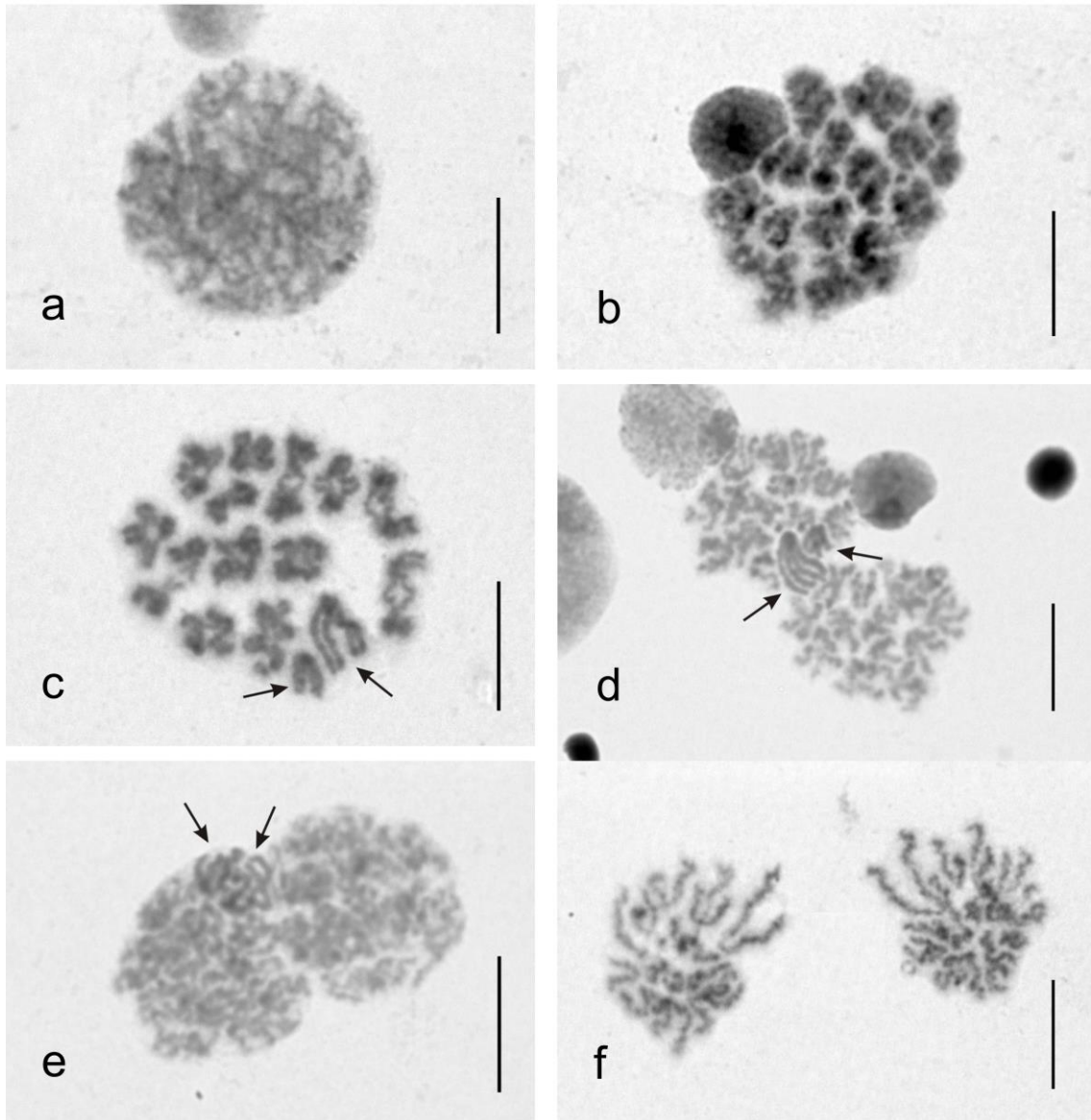
### ***Smeringopus* sp. nov. 2 (JAR)**

Samčí karyotyp se skládá stejně jako u předchozího druhu z 28 chromozomů. Systém pohlavních chromozomů je také  $X_1X_20$ , v karyotypu tedy nacházíme 13 autozomových párů a dva chromozomy X (obr. 11). V karyotypu se vyskytují pouze dvouramenné chromozomy. Převažují chromozomy metacentrické, submetacentrické chromozomové páry nalézáme jenom dva a to pár číslo 4 a 11. Velikost autozomů v karyotypu se snižuje plynule, pouze metacentrický chromozom  $X_1$  největší autozomový pár velikostně téměř dvakrát převyšuje.  $X_2$  rovněž s metacentrickou morfologií patří mezi středně velké chromozomy.

Pohlavní chromozomy vykazují v některých etapách meiotického dělení pozitivní heteropyknózu, není však příliš výrazná. Opět se vyskytuje už v premeiotické interfázi na pohlavním váčku, jenž je tvořen gonozomy. Během profáze jsou separované pohlavní chromozomy nejčastěji izopyknické (obr. 12a). V difúzním stádiu je mírná pozitivní heteropyknóza opět přítomna, mizí však už před jeho koncem (obr. 12b). Z 30 pozorovaných diplotene, diakinezí a metafází I byl bivalent se dvěma chiasmaty nalezen pouze jedenkrát. V metafázi I se k sobě ramena obou gonozomů přiklápějí a vytvářejí tak útvar tvaru písmena V, narozdíl od chromozomů rodu *Holocnemus* jsou však vždy viditelné všechny čtyři chromatidy (obr. 12c). Mírně výraznější zbarvení X chromozomů se objevuje až v anafázi I (obr. 12d), gonozomy se za autozomy stejně jako u všech ostatních studovaných druhů při rozchodu opožďují. V profázi II je slabá pozitivní heteropyknóza pozorovatelná naposled (obr. 12e). V ostatních etapách druhého meiotického dělení jsou již gonozomy izopyknické (obr. 12f).



**Obrázek 11.** *Smeringopus* sp. nov. 2 (JAR), karyogram samce. Sestaveno ze sesterských metafází II. Měřítka – 10  $\mu$ m.



**Obrázek 12. *Smeringopus* sp. nov. 2 (JAR), průběh meiotického dělení samce.** a) leptotene, gonozomy nejsou heteropyknotické; b) konec difúzního stádia; c) metafáze I s izopyknotickými pohlavními chromozomy (šipka); d) anafáze I, šipka ukazuje na opožděné pohlavní chromozomy; e) přechod z interkinze do profáze II s pozitivně heteropyknotickými gonozomy (šipka); f) anafáze II. Měřítko – 10  $\mu$ m.

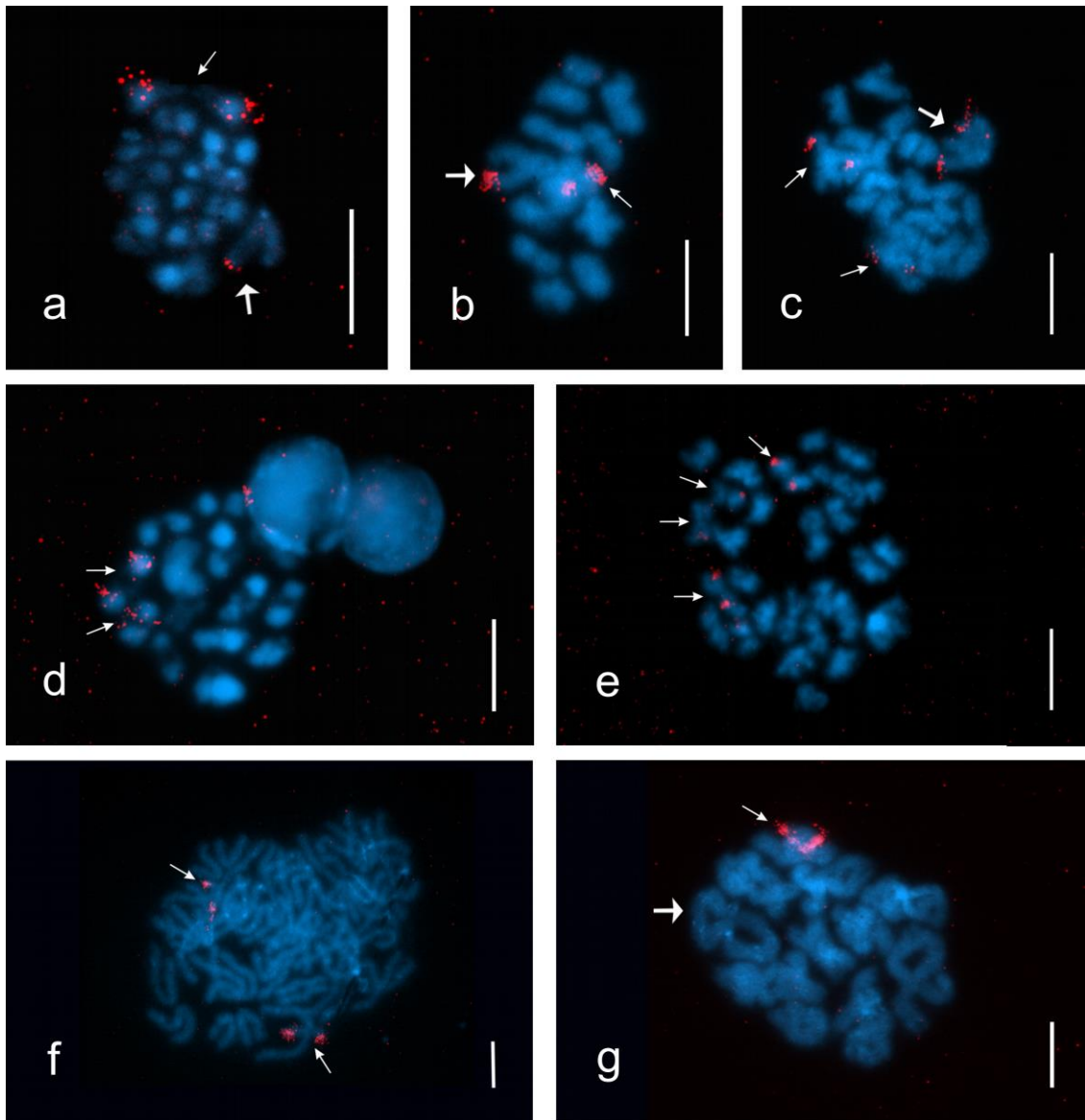
### 4.1.3 Sicariidae

#### *Loxosceles rufescens* (Dufour, 1820)

Tento druh byl vybrán jako reprezentant haplogynních pavouků, kteří nepatří do čeledi Pholcidae, ale disponuje stejně jako většina pholcinů systémem pohlavních chromozomů  $X_1X_2Y$ . V karyotypu samce tohoto zástupce čeledi Sicariidae je 21 chromozomů, systém pohlavních chromozomů se skládá ze dvou chromozomů X a neopohlavního chromozomu Y. Karyotyp je složen pouze z dvouramenných chromozomů. (Král *et al.* 2006).

Chromozomy tohoto druhu jsou několikanásobně větší než chromozomy třesavek, tomu odpovídá také velikost klastrů rDNA. Na figurách metafáze I byl nalezen jediný NOR na poměrně malém bivalentu (obr. 13g). Ani zde se tedy hybridizační signál nevyskytoval na pohlavních chromozomech, respektive na pohlavním trivalentu. Z mitotických metafází je zřejmé, že autozomy nenesou NOR pouze na konci jednoho raménka, tak jak tomu bylo u téměř všech Pholcidů, ale že jsou NORy umístěny v terminálních oblastech obou ramének jednoho z nejmenších autozomových párů (obr. 13f). Celkem jsou tedy v karyotypu přítomny čtyři NORy umístěné na jediném páru homologních chromozomů.





**Obrázek 13.** *Holocnemus hispanicus*, *Holocnemus pluchei* a *Loxosceles rufescens* - distribuce NORů vizualizovaná pomocí FISH. Šípky ukazují na hybridizační signály na autozomech či autozomových bivalentech, široké šípky na signály na gonozomech. a) *H. hispanicus* – metafáze I; b) *H. hispanicus* – metafáze I; c) *H. hispanicus* metafáze II; d) *H. pluchei* – metafáze I; e) *H. pluchei* – metafáze II; f) *L. rufescens* – mitotická metafáze; g) *L. rufescens* – metafáze I. Měřítko – 10  $\mu\text{m}$ .

## 4.2 Atypidae

*Atypus affinis* (Eichwald, 1830)

V karyotypu obou pohlaví je přítomno 14 chromozomů. Systém pohlavních chromozomů je XY (obr. 14a). Velikost chromozomů se nesnižuje postupně, ale můžeme je rozdělit do dvou velikostních tříd: na velké (čtyři první autozomové páry a pohlavní chromozomy) a na malé (zbývající dva autozomové páry). Rozdíl mezi těmito třídami je opravdu výrazný, největší autozomový pár je 8x větší než pár nejmenší (Řezáč *et al.* 2006).

K vizualizaci konstitutivního heterochromatinu byla použita metoda C pruhování (obr. 15a). Nejdelší a nejvýraznější oblast heterochromatinu byla lokalizována v subtelomerické oblasti dlouhého raménka druhého chromozomového páru, v oblasti odpovídající sekundární konstriktci viditelné po klasickém obarvení preparátu. Je zajímavé, že tento pruh není u obou homologních chromozomů stejně dlouhý, délka menšího pruhu dosahuje zhruba poloviny velikosti pruhu delšího. Další výrazné heterochromatinové bloky se nacházejí v centromerické oblasti 1., 2. a 3. chromozomového páru a na chromozomu X. Na 4. páru je centromerický pruh také přítomen, nebyl však příliš výrazný. Na malých autozomových párech (5. a 6.) nejsou centromerické pruhy patrné. Také na chromozomu Y se centromerický pruh nenachází, avšak je na něm přítomen druhý nejvýraznější pruh celého karyotypu, a to v terminální oblasti dlouhého raménka, naopak v telomerické oblasti krátké raménka není heterochromatin přítomen. Drobnou slabě obarvené pruhy se nachází také v telomerických oblastech všech chromozomů s výjimkou chromozomu Y (obr. 15a).

FISH s použitím rDNA sondy z *Aliatypus sp.* odhalila na pachytémních chromozomech přítomnost pouze jediného, o to však výraznějšího rDNA klastru v subtelomerické oblasti dlouhého raménka chromozomové páru číslo 2 (obr. 15c). Tedy ve stejném místě, kde se nachází sekundární konstriktce a výrazná oblast heterochromatinu. Na mitotických metafázích je patrné, že jeden ze dvou signálů nalézajících se na homologních chromozomech je zřetelně menší než druhý, rozdíl v intenzitě signálu je výrazný (obr. 15d).

Pro ověření výsledků fluorescenční in situ hybridizace byly vybrané neobarvené chromozomové preparáty použity na vizualizaci aktivních NORů pomocí stříbření (obr. 15b). Opět se potvrdila nestejná velikost nukleolárních organizátorů přítomných na homologních chromozomech. Navíc jsem zjistila, že i přes nestejnou velikost bývají obě oblasti rDNA vždy přepisovány, na preparátech totiž nebyly pozorovány žádné figury, ve kterých by byl nastříbřen jenom jeden z NORů. Ba dokonce se zdá, že právě oblast menšího NORu je transkribována více (obr. 15b).

### *Atypus piceus* (Sulzer, 1776)

Samčí karyotyp se skládá ze 41 chromozomů, systém pohlavních chromozomů je X0 (obr. 14b). Karyotyp je tvořen výhradně dvouramennými chromozomy, s výjimkou submetacentrického druhého páru jsou všechny chromozomy metacentrické. V subterminální oblasti dlouhého raménka 2. chromozomového páru je výrazná konstriktce. Gonozom X je chromozomem největším, velikost autozomů se snižuje plynule (Řezáč *et al.* 2006).

K analýze rozmístění konstitutivního heterochromatinu bylo použito C pruhování (obr. 14c). Celkově se u tohoto druhu heterochromatinu nalézalo velké množství. Nejvíce pruhů se vyskytovalo na chromozomu X. V oblasti centromery se nachází nebarvitelná oblast. Na obou stranách od ní se nacházejí poměrně dlouhé heterochromatinové pruhy, stejně výrazné bloky heterochromatinu se nalézají i v telomerických oblastech. Při velmi zevrubném pozorování lze odhalit i nevýrazný tenký proužek nacházející se v jednom rameni asi ve dvou třetinách vzdálenosti mezi pruhem v okolí centromery a pruhem telomerickým (bráno od centromery). Naopak velmi malým množstvím heterochromatinu disponuje největší autozomový pár. Kromě nepříliš výrazného centromerického pruhu obsahuje pouze jeden malý heterochromatinový pruh umístěný v jedné třetině délky jednoho raménka. Na některých figurách se zdá, že se v telomerické oblasti druhého raménka vyskytuje ještě další heterochromatinový pruh, je však velmi málo kontrastní. Na druhém největším autozomovém páru se nachází nejdelší heterochromatinový pruh v terminální oblasti dlouhého raménka, v místě sekundární konstriktce, viditelné na klasicky obarvených preparátech. V oblasti centromery se nalézá pouze tenký pruh. Mnohem výraznější je pruh, jenž se nachází v telomerické oblasti krátkého raménka. S výjimkou prvního autozomového páru, který telomerické pruhy zcela postrádá, jsou na všech ostatních chromozomech telomerické pruhy delší a výraznější než pruhy centromerické<sup>6</sup> (obr. 14c). Nejzajímavějším jevem je v 7. autozomovém páru přítomnost submetacentrického chromozomu s jediným, avšak velmi výrazným pruhem v telomerické oblasti dlouhého raménka. Tento chromozom se ve všech pozorovaných figurách vyskytuje jenom jeden (chromozom jež je s ním v páru má pruhovací vzor je mírně odlišný) a je nápadně podobný Y chromozomu *Atypus affinis*. Dále se v karyotypu nachází jeden středně velký pár č. 11 a dva malé páry č. 18, 19 s malým centromerickým pruhem a nesouměrně velkými telomerickými pruhy. Telomerický pruh na jednom raménku nedosahuje ani poloviny velikosti a kontrastu přítomného na druhém

---

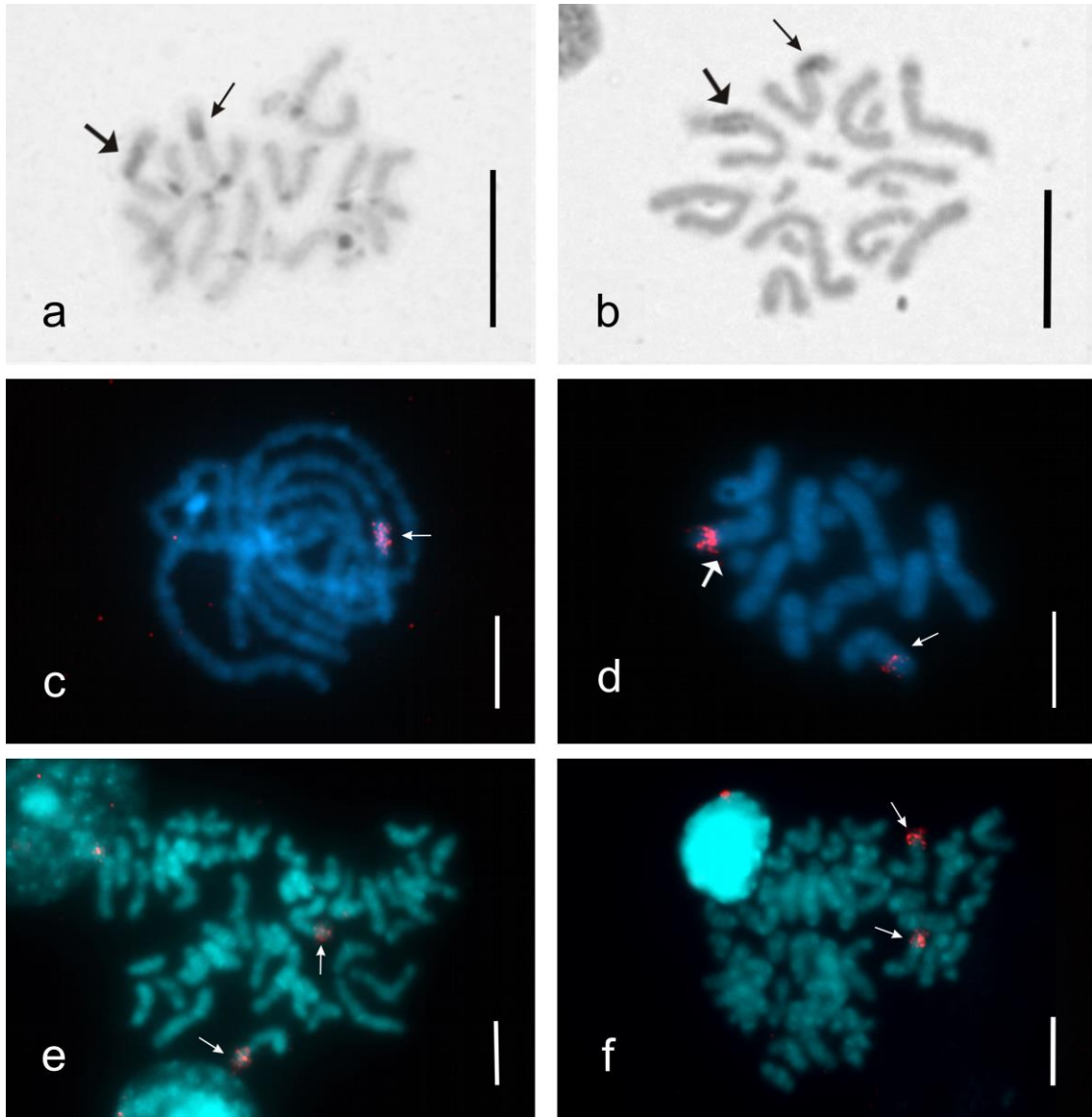
<sup>6</sup> Na přibližně polovině figur chybí telomerické pruhy (kromě první páru autozomů a krátkého raménka jednoho chromozomu 7. páru) i na jednom až třech dalších chromozomech a to na jednom nebo obou raménkách. Protože se však většinou jedná o chromozomy různé délky přičítám tento jev spíše nedokonalé indukci pruhů.

raménku. Páry č. 9, 10, 13, 14 mají velmi slabý centromerický pruh, avšak velmi výrazné pruhy v obou telomerických oblastech.

Hybridizace s rDNA sondou odhalila přítomnost dvou NOR chromozomů, jedná se o autozomový pár číslo 2. Umístění hybridizačních signálů je v terminální oblasti dlouhého raménka. Signály na obou chromozomech jsou stejně výrazné (obr. 15e, f).



**Obrázek 14. Karyogramy samců rodu *Atypus*:** a) *Atypus affinis*, převzato a upraveno z Řezáče *et al.* 2006 b) *Atypus piceus*, převzato a upraveno z Řezáče *et al.* 2006. c) *A. piceus*, karyogram z chromozomů s heterochromatinem vizualizovaným pomocí C pruhování. Měřítko - 10  $\mu$ m.



**Obrázek 15.** *Atypus affinis* a *Atypus piceus* – různé aplikace. a) *A. affinis* – C pruhovaná mit. metafáze, standartní šipka ukazuje na menší heterochromatinový pruh na chromozomu 2. páru, široká šipka ukazuje na větší heterochromatinový pruh na chromozomu 2. páru; b) *A. affinis* – mit. metafáze, detekce NORů pomocí dusičnanu stříbrného, opět normální šipka ukazuje na oblast menšího NORu, širší šipka na oblast většího NORu na chromozomech 2. páru; c) *A. affinis* – pachytene, vizualizace NORu (šipka) pomocí FISH; d) *A. affinis* – mitotická metafáze, vizualizace NORů pomocí FISH, normální šipka ukazuje na menší NOR, široká šipka na větší NOR; e, f) *A. piceus* – mitotická metafáze, vizualizace NORů (šipky) pomocí FISH. Měřítka - 10 µm.

## 5 Diskuze

### 5.1 Haplogynní pavouci čeledí Pholcidae a Sicariidae

#### 5.1.1 Karyotypy

Pavouci jsou z cytogenetického hlediska téměř *terra incognita*. Probádáno je přibližně jen 1,5 % všech druhů (Král, nepublikovaná data). Navíc se většina údajů týká nejpočetnější entelegynní větve araneomorfních pavouků. Z druhově méně bohaté skupiny bazálních araneomorfních pavouků, čítající 3 494 druhů (Platnick 2009) bylo dosud karyotypováno pouze několik desítek pavouků. Konkrétně 42 zástupců 12 čeledí haplogynních pavouků a po jednom zástupci nadčeledi Hypochiloidea a Austrochiloidea (Král *et al.* 2006). Proto jsem se ve své práci zaměřila kromě jiného na bazální araneomorfní pavouky, především pak na třesavky. Diploidní počet chromozomů samců této čeledi se pohybuje mezi 15 (*Mesabolivar luteus* a rod *Physocyclus*) a 32 (*Artema atlanta*), v jejich karyotypech jsou přítomny velmi drobné chromozomy, jejichž velikost se obvykle snižuje plynule. Tato početná čeleď, tvořící s 1 038 druhy téměř třetinu druhového bohatství haplogynních pavouků, byla donedávna cytogenetiky spíše opomíjena hned z několika důvodů. Vzhledem k malé velikosti těla a gonád mohou poskytnout jen málo tkáně pro výrobu preparátů. Dalšími faktory, které znesnadňují analýzu, jsou malá velikost chromozomů třesavek (kolem 5  $\mu\text{m}$ ) a jejich obtížná fixace a tím i nižší šance na získání kvalitních chromozomových preparátů (Painter 1914, Suzuki 1954, Araújo *et al.* 2005a). V předložené práci bylo karyotypováno poprvé dalších 6 druhů čeledi Pholcidae (tab. 3).

Suzuki (1954) popsal vztah mezi počtem chromozomů pavouků a jejich fylogenetickým postavením a formuloval hypotézu, podle které se karyotypová evoluce pavouků odehrává redukcí počtu chromozomů. Podle počtu chromozomů rozdělil pavouky do tří skupin (v té době byly známy karyotypy 177 druhů pavouků). V první jsou pavouci s diploidním počtem chromozomů nad 48. Do této skupiny patří nejbazálnější vývojové linie jako jsou Mesothelae a mygalomorfní pavouci, druhou skupinu tvoří odvozenější pavouci s počtem chromozomů mezi 34 a 48. Do třetí a nejobsáhlejší skupiny jsou řazeni vývojově nejpokročilejší pavouci s méně než 34 chromozomy. I přes nárůst počtu karyotypovaných druhů se Suzukiova hypotéza velmi často potvrzuje, jako například u chromozomů sklípkanů. Dulíková (2009) ve své diplomové práci popisuje 11 druhů, z čehož jenom samci tří druhů mají méně než 60 chromozomů. Přesto se však odvažují tvrdit, že haplogynní pavouci do této

evoluční hypotézy nezapadají až tak jednoduše. Dosud bylo karyotypováno celkem 48 druhů (včetně této práce) haplogynních pavouků, ale zatím jen *Drymusa capensis* (Král *et al.* 2006) se svými 37 chromozomy může být řazena do prostřední evolučně mírně pokročilé skupiny. Všichni ostatní mají méně než 34 chromozomů a spadají tudíž podle Suzukiho klasifikace do nejdvozenější skupiny, což je poněkud v rozporu s jejich bazálním postavením v rámci araneomorfních pavouků. Naproti tomu v evolučně pokročilejší skupině entelegynních araneomorfních pavouků najdeme čeledi, ve kterých je zástupců s více než 34 chromozomy dokonce převaha, kupříkladu pokoutníkovití (Agelenidae) (Suzuki 1954, Král 2007) nebo maloočkovití (Sparassidae) (Suzuki 1954, Rodríguez-Gill *et al.* 2007). V tomto směru se jako naprosto výjimečná jeví čeleď Eresidae. Devět jejích zástupců má počty chromozomů vyšší než 48 (Forman 2008) a podle Suzukiho klasifikace by tedy měly být řazeny do nejprimitivnější skupiny mezi sklípkoše a sklípky. U této čeledi by však za vysoké počty chromozomů mohl být zodpovědný naprosto jiný fenomén, a to polyploidizace (Forman 2008).

Tento paradox má několik možných vysvětlení. První, jež se přímo samo nabízí, je to, že Suzukiho hypotéza je velmi dobře uplatnitelná na úrovni základních evolučních linií (Mesothelae, Mygalomorphae a Araneomorphae), ale když zkoumáme podrobněji koncové evoluční větve, už není trend ke snižování počtu chromozomů tak výrazný nebo je přítomen jenom místy. Nebo mohly v některých čeledích araneomorfních pavouků trend ke snižování počtu chromozomů zpomalit nebo i zvrátit jiné evoluční jevy jako je již zmíněná polyploidizace. Další možností, proč mají haplogynní pavouci tak malá množství chromozomů, od 7 u *Ariadna lateralis* (Segestrinae, Suzuki 1954) do 37 u *Drymusa capensis* (Drymusidae, Král *et al.* 2006), je rychlejší tempo snižování počtu chromozomů.

Zajímavým aspektem cytogenetiky haplogynních pavouků je morfologie chromozomů. Zatímco karyotypy entelegynních pavouků jsou složeny především z chromozomů akrocentrických, u haplogynních pavouků je morfologie chromozomů variabilní (Rodríguez-Gil *et al.* 2002). U některých skupin jsou karyotypy tvořeny holokinetickými chromozomy (Díaz a Sáez 1966, Benavente a Wettstein 1980, Rodríguez-Gil *et al.* 2002, Král *et al.* 2006). Ve většině skupin však dominují dvouramenné chromozomy (Král *et al.* 2006). V karyotypech zástupců Pholcidae výrazně převažují chromozomy metacentrické (tab.1). U mnou studovaných druhů se až na dvě výjimky, gonozom  $X_2$  u *Smeringopus* sp. nov. 1. (Madagaskar) a *Pholcus opilionoides*, v souladu s dosud publikovanými daty vyskytovaly rovněž pouze metacentrické a submetacentrické chromozomy.

druh	2n samec	autoři
<b>DIGUETIDAE</b>		
<i>Digueteria albolineata</i>	20,XY	Král <i>et al.</i> 2006
<i>Digueteria canities</i>	16,XY	Král <i>et al.</i> 2006
<b>DRYMUSIDAE</b>		
<i>Drymusa capensis</i>	37,X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	Král <i>et al.</i> 2006
<b>DYSDERIDAE</b>		
<i>Dysdera crocota</i>	9,X0 11,X0 13,X0	Díaz a Sáez 1966a 1966b Rodríguez-Gil <i>et al.</i> 2002 Král <i>et al.</i> 2006
<b>FILISTATIDAE</b>		
<i>Filistata insidiatrix</i>	33,X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	Král <i>et al.</i> 2006
<i>Kukulcania hibernalis</i>	24,X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	Rodríguez-Gil <i>et al.</i> 2002
<b>LEPTONETIDAE</b>		
<i>Leptoneta infuscata</i>	14,XY	Král <i>et al.</i> 2006
<b>OCHYROCERATIDAE</b>		
<i>Ochyrocera sp.</i>	13,X0	Král <i>et al.</i> 2006
<b>PHOLCIDAE</b>		
<i>Artema atlanta</i>	32,X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	Parida a Sharma 1987, Sharma a Parida 1987
<i>Crossopriza lyoni</i>	27,X0 24,X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0 25,X0 23,X0	Bole-Gowda 1958 Sharma <i>et al.</i> 1959 Srivastava a Shukla 1986 Parida a Sharma 1987, Sharma a Parida 1987
<i>Holocnemus caudatus</i>	23,X0	Král <i>et al.</i> 2006
<i>Holocnemus hispanicus</i>	<b>23,X0</b>	<b>tato práce</b>
<i>Holocnemus pluchei</i>	<b>27,X0</b>	<b>tato práce</b>
<i>Leptopholcus guineensis</i>	<b>17,X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y</b>	<b>tato práce</b>
<i>Mesabolivar brasiliensis</i>	17,X0	Ramalho <i>et al.</i> 2008
<i>Mesabolivar cyaneotaeniatus</i>	17,X0	Ramalho <i>et al.</i> 2008
<i>Mesabolivar luteus</i>	15,X0	Araújo <i>et al.</i> 2005a
<i>Micropholcus fauroti</i>	17,X0	Araújo <i>et al.</i> 2005a
<i>Pholcus manueli</i>	25,X0	Wang <i>et al.</i> 1997
<i>Pholcus crypticolens</i>	24, X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	Suzuki 1954
<i>Pholcus opilionoides</i>	<b>25,X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y</b>	<b>tato práce</b>
<i>Pholcus phalangioides</i>	24, X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0 25,X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	Rodríguez-Gil <i>et al.</i> 2002 Král <i>et al.</i> 2006
<i>Pholcus sp.</i>	26, X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	Sharma a Parida 1987
<i>Physocyclus californicus</i>	15,X0	Cokendolpher 1989
<i>Physocyclus enaulus</i>	15,X0	Cokendolpher 1989
<i>Physocyclus globosus</i>	15,X0	Oliveira <i>et al.</i> 2007
<i>Physocyclus sp.</i>	15,X0	Cokendolpher 1989



<i>Spermophora senoculata</i>	? X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0 25,X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	Painter 1914 Král <i>et al.</i> 2006
<b><i>Smeringopus</i> sp.nov. 1</b>	<b>28, X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>0</b>	<b>tato práce</b>
<b><i>Smeringopus</i> sp.nov. 2</b>	<b>28, X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>0</b>	<b>tato práce</b>
<b>PLECTREURIDAE</b>		
<i>Plectreurys tristis</i>	18, X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	Král <i>et al.</i> 2006
<b>SCYTODIDAE</b>		
<i>Scytodes fusca</i>	31,X0	Araújo <i>et al.</i> 2008
<i>Scytodes globula</i>	13,X0	Díaz a Sáez 1966a, 1966b
<i>Scytodes itapevi</i>	17,X0	Araújo <i>et al.</i> 2008
<i>Scytodes thoracica</i>	19,X0	Král <i>et al.</i> 2006
<b>SEGESTRIDAE</b>		
<i>Ariadna boesenbergii</i>	9,X0	Rodríguez-Gil <i>et al.</i> 2002
<i>Ariadna lateralis</i>	7,X0	Suzuki 1954
<i>Ariadna mollis</i>	9,X0	Díaz a Sáez 1966a, 1966b
<i>Segestria bavarica</i>	14, X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	Král <i>et al.</i> 2006
<i>Segestria florentina</i>	? X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	Benavente a Wettstein 1980
<i>Segestria ruficeps</i>	14, X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	Díaz a Sáez 1966a
<i>Segestria senoculata</i>	14, X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	Suzuki 1954
<b>SICARIIDAE</b>		
<i>Loxosceles intermedia</i>	23,X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	Silva <i>et al.</i> 2002
<i>Loxosceles laeta</i>	23,X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	Silva 1988
<i>Loxosceles spinulosa</i>	19,X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	Král <i>et al.</i> 2006
<i>Loxosceles reclusa</i>	18, X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> 0	Tugmon <i>et al.</i> 1990
<i>Loxosceles rufescens</i>	21,X <sub>1</sub> X <sub>2</sub> Y	Král <i>et al.</i> 2006
<b>TETRABLEMMIDAE</b>		
<i>Monoblemma muchmorei</i>	23,X0	Král <i>et al.</i> 2006

**Tabulka 3 : Úplný výčet všech karyotypovaných druhů haplogynních pavouků.** V tabulce jsou uvedeny převážně jen práce, ve kterých byl karyotyp stanoven poprvé. Pokud byl karyotyp revidován s odlišným výsledkem, jsou uvedeny i tyto práce. Jestliže je výsledek v revidované studii shodný, není uveden. V tabulce chybí karyotyp *Loxosceles rufipes*, protože existuje pochybnost o správném určení druhu.

Přestože dvouramenné chromozomy tvoří obvykle více chiasmat než jednoramenné (John 1990), byla frekvence výskytu více chiasmat v jednom bivalentu u všech mnou studovaných druhů třesavek velmi nízká až žádná, nikde nepřekročila 5 %. Více než dvě chiasmata na jeden bivalent nebyla zaznamenána v žádném případě. Podobně také u dvou dalších třesavek, *Mesabolivar brasiliensis* a *M. cyaneotaeniatus*, byly nalezeny pouze bivalenty s jedním chiasmatem (Ramalho *et al.* 2008). Nejjednodušším a nejvíce přímočarým

vysvětlením této skutečnosti je malá velikost chromozomů pholcidů. Přesto u dvou druhů třesavek běžně nacházíme bivalenty se dvěma chiasmaty. U *Crossopriza lyoni* se dvě chiasmata vyskytují ve dvou největších bivalentech (Oliveira *et al.* 2007). Zcela výjimečný je z tohoto hlediska *Mesabolivar luteus*, všechny jeho bivalenty mají kruhovitý tvar, svědčící o přítomnosti dvou chiasmat (Araújo *et al.* 2005a). Ve starších studiích není bohužel počet chiasmat zmiňován, proto není možné využít tento parametr ke srovnání příbuznosti cytogeneticky již studovaných třesavek.

Závěrem je možno shrnout, že karyotypy pholcidů studovaných v mé práci z dosud získaných dat nijak nevybočují. Počty chromozomů samců se pohybovaly od 17 u *Leptopholcus guineensis* po 28 u *Smeringopus* sp. nov. 1 a 2. Velikost chromozomů se ve všech karyotypech, s výjimkou *Leptopholcus guineensis*, kde nacházíme dvě velikostní třídy, snižovala postupně. Morfologie chromozomů byla až na dvě výjimky (viz výše) metacentrická či submetacentrická, počet chiasmat v bivalentech byl nízký. Počet cytogeneticky známých třesavek se tak rozšiřuje na 22 druhů (z celkových 1 038 druhů).

### 5.1.2 Evoluce pohlavních chromozomů

Pro svou neobvyklost a různorodost se staly systémy pohlavních chromozomů jedním z nejstudovanějších aspektů pavoučí cytogenetiky. Systém chromozomového určení pohlaví  $X_1X_20$  je díky častému výskytu (77 % všech studovaných druhů) (Araújo *et al.* 2005b) a především pak kvůli přítomnosti ve starobylých skupinách pavouků jako jsou sklípkoši a sklípkani, považován za původní typ (Suzuki 1954). Přestože je tento systém přítomen u naprosté většiny entelegynních pavouků, mezi bazálními araneomorfy není příliš obvyklý (tab. 3). Kromě rodu *Segestria* s holokinetickými chromozomy (Suzuki 1954, Díaz a Sáez 1966a, Benavente a Wettstein 1980, Král *et al.* 2006) jej nacházíme jenom u několika málo haplogynních pavouků se standartními chromozomy. Častěji se vyskytují systémy zahrnující chromozom Y-XY a  $X_1X_2Y$  a systém  $X0$ .

Systém  $X_1X_2Y$  byl prokázán v čeledích Drymusidae (1 druh), Filistatidae (1 druh), Pholcidae (4 druhy) a Sicariidae (4 druhy) (Silva *et al.* 2002, Král *et al.* 2006). Podle Krále (2006) je tento systém u těchto skupin bazálních araneomorfních pavouků ancestrální. Je pravděpodobné, že mezi dosud studovanými zástupci těchto čeledí bude více druhů s tímto zajímavým systémem pohlavních chromozomů. Díky malé velikosti chromozomu Y totiž mohlo dojít k snadno jeho přehlédnutí (Král *et al.* 2006). Konkrétním příkladem je v České

republiky běžný pavouk třesavka velká (*Pholcus phalangioides*), jeho karyotyp Rodríguez-Gill (2002) stanovil jako 24,  $X_1X_20$ . Král (2006) však našel v karyotypu samce o jeden chromozom více. Jelikož se tento chromozom u samic nenacházel a v anafázích samčích meiotických buněk byly nalézány sesterské metafáze II s počtem chromozomů 13 a 12, bylo jasné, že se jedná o pohlavní chromozom Y. Přítomnost systému  $X_1X_2Y$  mohu po prohlédnutí mnoha skel z více exemplářů z různých českých lokalit u tohoto druhu rozhodně potvrdit. Domnívala jsem se, že v tomto konkrétním případě může být za rozdílnost karyotypu zodpovědná odlišná oblast původu. Ve studii Rodríguez-Gilla (2002) pocházely veškeré exempláře z Argentiny čili z Neotropů, naše laboratoř studovala třesavky české – palearktické. Ale práce na populaci třesavky velké pocházející z Brazílie, u které byl objeven též systém  $X_1X_2Y$  (Sakamoto *et al.* 2007), tuto možnost minimalizuje a potvrzuje správnost našich výsledků. Při studiu další třesavky - *Spermophora senoculata* odhalil Král (2006) další chybně určený systém pohlavních chromozomů. Painer (1914), jenž tento druh zkoumal poprvé na materiálu z USA, sice nebyl schopen určit přesný počet chromozomů v karyotypu, ale systém pohlavních chromozomů udává jako  $X_1X_20$ . Král (2006) publikoval karyotyp tohoto druhu, včetně stanovení systému  $X_1X_2Y$  a velmi průkazné fotografie trivalentu pohlavních chromozomů v metafázi prvního meiotického dělení (exempláře pocházely z Portugalska). Zatím poslední rozdílné výsledky se týkají *Kukulcania hibernalis* (Filistatidae). U tohoto druhu Hetzler (1979) vůbec jako první popisuje systém pohlavních chromozomů  $X_1X_2Y$  u pavouků, jeho práce vyšla bohužel jenom jako abstrakt a nepodává žádné údaje o celkovém počtu chromozomů. Rodríguez-Gill (2002) našel u argentinských exemplářů karyotyp 24,  $X_1X_20$ . Při revizi svých výsledků po uveřejnění práce Krále (2006) objevil v karyotypu populací z Argentiny také Y chromozom (L. M. Mola, ústní sdělení).

Já jsem se setkala během studia haplogynních pavouků se systémem  $X_1X_2Y$  u pěti druhů: u dvou při prvopopisu karyotypu - *Leptopholcus guineensis*, *Pholcus opilionoides* (Pholcidae) a u dalších třech druhů při detekci NORů - *Spermophora senoculata*, *Pholcus phalanogoides* (Pholcidae) a *Loxosceles rufescens* (Sicariidae). Ve všech pěti případech byl  $X_1$  metacentrické morfologie největším chromozomem karyotypu. Zbývající pohlavní chromozomy *Leptopholcus guineensis* a *Pholcus opilionoides* se od gonozomů ostatních druhů se systémem  $X_1X_2Y$  velikostí a morfologií lišily (srovnání vlastních pozorování s výsledky publikovanými v Silva *et al.* 2002, Král *et al.* 2006). Metacentrický gonozom  $X_2$  *L. guineensis* je nejmenším chromozomem karyotypu. Je to dosud jediný případ u druhů se systémem  $X_1X_2Y$ , kdy je  $X_2$  menší velikosti než chromozom Y. Ten je u tohoto druhu submetacentrický a velikostně se nachází za třetím autozomovým párem. U *P. opilionoides* je

X<sub>2</sub> subtelocentrický a velikostně se nachází za šestým autozomovým párem.

Submetacentrický gonozom Y je chromozomem nejmenším.

Pohlavní chromozomy X<sub>2</sub> a Y *Loxosceles rufescens*, *Spermophora senoculata* a *Pholcus phalangoides* mají dvouramennou morfologii, Y je nejmenším chromozomem karyotypu (Král *et al.* 2006). Dvouramenná morfologie pohlavních chromozomů a obdobná velikost velikost gonozomu Y byla nalezena také u dalších zástupců čeledi Sicariidae – *Loxosceles intermedia* a *L. laeta* (Silva 1988, Silva *et al.* 2002). Ze srovnání karyotypů všech druhů se systémem X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y (tato práce, Silva *et al.* 2002, Král *et al.* 2006) vyplynulo, že u *P. opilionoides* a *P. phalangoides* není velikostní skok mezi nejmenším autozomovým párem a chromozomem Y zdaleka tak výrazný jako u ostatních haplogynních pavouků se systémem X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y, kde je droboučkový Y chromozom až několikanásobně menší.

Během diplotene, diakineze a metafáze I tvoří gonozomy trivalent. Při jeho tvorbě nedochází ke vzniku chiasmát, ale gonozomy párují svými konci „end to end“ typem párování. Tento typ párování byl popsán poprvé u některých zástupců hmyzu (White 1973) Stejný typ párování pohlavních chromozomů se vyskytuje i u sklípkanů (Dulíková 2009). Metacentrické chromozomy X asociují s Y oběma svými konci za tvorby smyček (obr. 13g) Submetacentrický gonozom X<sub>2</sub> *Pholcus phalangoides* a subtelocentrický X<sub>2</sub> *P. opilionoides* asociují s ostatními gonozomy pouze koncem dlouhého raménka (obr. 4e)

Během meiotického dělení se mnou studované druhy se systémem X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y lišily ve spiralizaci a heteropyknóze pohlavních chromozomů. U *Leptopholcus guineensis* jsou chromozomy X během diplotene a diakineze výrazně despiralizovány a jsou jenom velmi slabě obarvené. V metafázi I chromozomy X více spiralizují, stále však nedosahují spiralizace a barvitelnosti autozomů, chromozom Y je ve všech třech fázích izopyknotický. V anafázi I jsou všechny pohlavní chromozomy izopyknotické, ale je možné je od autozomů rozeznat zpožděným rozchodem k pólům dělicího vřeténka. Během homeotypického dělení jsou gonozomy pozitivně heteropyknotické jen v profázi II, po zbytek meiotického dělení jsou izopyknotické. Podobně byla negativní heteropyknóza chromozomů X pozorovatelná v diakinezi a metafázi I u *Spermophora senoculata*, a to po obarvení chromozomů DAPI při FISH s rDNA sondou. Heteropyknóza gonozomů *S. senoculata* je podobná *L. guineensis* i ve zbylých etapách meiotického dělení (J. Musilová, ústní sdělení). Naopak pohlavní chromozomy *P. opilionoides* a *P. phalangoides* vykazují po většinu meiotického dělení pozitivní heteropyknózu. Podle této větší barvitelnosti jsou od autozomů odlišitelné v pachytene, v difúzním stádiu, ve většině figur i v diplotene, diakinezi a metafázi I, dále ve

všech figurách v anafázi I a v profázi II, v metafázi II opět ve většině figur a ve všech anafázích II. V žádné etapě meiotického dělení nejsou gonozomy negativně heteropyknotické.

Podle rozdílné morfologie  $X_2$  chromozomů a odlišnostem v heteropyknóze gonozomů během meitoického dělení můžeme tedy třesavky se systémem  $X_1X_2Y$  rozdělit do dvou skupin. Do první by patřila *S. senoculata* a *L. guineensis*, do druhé *P. phalangoides* a *P. opilionoides*. *L. guineensis* tvoří díky svému poměrně velkému chromozomu Y pojítka mezi oběma skupinami. To by mohlo pomoci vyřešit izolované postavení *S. senoculata* a podpořit její dosud provizorní zařazení mezi pholciny (Bruvo-Madaric *et al.* 2005).

U *Smeringopus* sp. nov. 1 (Madagaskar) a u *Smeringopus* sp. nov. 2 (JAR) se systémem  $X_1X_20$  jsou stejně jako u mnou studovaných druhů se systémem  $X_1X_2Y$  gonozomy  $X_1$  opět největšími chromozomy karyotypu. Je možné, že si u těchto druhů gonozomy  $X$  vyvinuly nějakou méně stabilní formu asociace, i když nepárují svými konci, protože po téměř všech etapách meiotického dělení leží blízko sebe.

U obou studovaných druhů se systémem  $X0$  (*Holocnemus hispanicus*, *H. pluchei*) byl chromozom  $X$  opět největším chromozomem karyotypu. Stejná situace byla nalezena u všech zatím studovaných třesavek s jediným pohlavním chromozomem  $X$ . Veškeré dosud publikované práce, včetně mých výsledků, se také shodují v metacentrické morfologii chromozomu  $X$  (Bole-Gowda 1958, Cokendolpher 1989, Araújo *et al.* 2005, Král *et al.* 2006, Oliveira *et al.* 2007, Ramalho *et al.* 2008).

Jak už se zmiňuji výše, Král (2006) se domnívá, že systém pohlavních chromozomů  $X_1X_2Y$  je u pholcidů a dalších haplogynních čeledí původní. Přítomnost dalších systémů  $XY$  a  $X0$  vysvětluje zjednodušením ancestrálního systému v průběhu evoluce. Podle tohoto autora mohla přeměna systému  $X_1X_2Y$  na jednodušší systémy probíhat podle schématu na obrázku 16. Prvním krokem této konverze by byla pericentrická inverze  $X_2$ , následována by byla pericentrickou inverzí gonozomu  $X_1$ , což by vedlo k hypotetickému systému  $X_1X_2Y$  s akrocentrickými chromozomy  $X$ . Robertsonovou translokací by došlo k fúzi obou  $X$  a vzniku systému  $XY$ , jenž zatím sice nebyl nalezen u pholcidů, ale u jiných haplogynních čeledích již ano. Posledním krokem by byla ztráta degenerovaného gonozomu  $Y$  za vzniku systému  $X0$ .

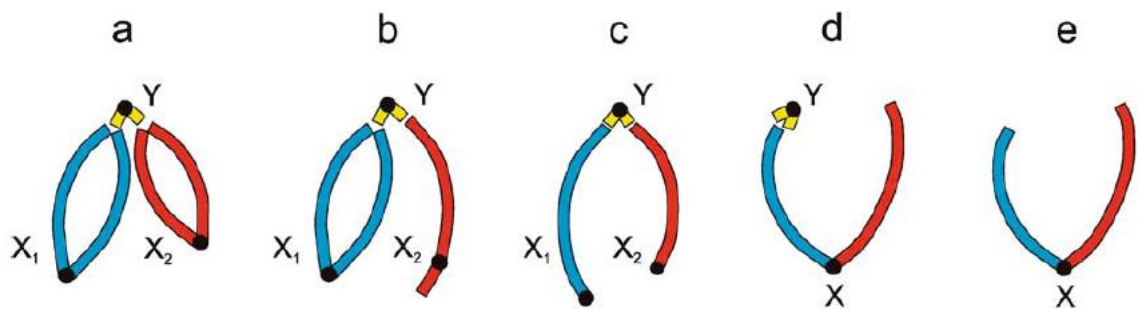
Do tohoto jednoduchého vysvětlení evoluce pohlavních chromozomů nezapadá objev systému  $X_1X_20$  u dvou druhů rodu *Smeringopus*<sup>7</sup>. To však nutně neznamená, že by představa o konverzi systému  $X_1X_2Y$  na  $X0$  nebyla správná. V podstatě existují dva způsoby, jak tyto

---

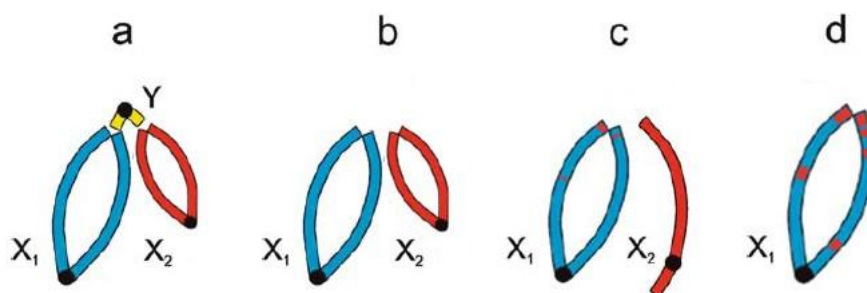
<sup>7</sup> Výskyt systému  $X_1X_20$  u jiných druhů ve starších publikacích může být zapříčiněn přehlédnutím drobného  $Y$ , proto těmto studiím nebyla přikládána až tak velká důležitost.

výsledky do hypotézy o evoluci gonozomů zahrnout. První způsob je předpokládat, že systém  $X_1X_2Y$  je původní jenom pro skupinu pholcini. A u holocneminů, do nichž patří *H. hispanicus* a *H. pluchei* se systémem  $X_0$ , by byl ancestrálním typem chromozomového určení pohlaví systém  $X_1X_20$  stejně jako u entelegynních pavouků. Takováto možnost by však ignorovala značnou podobnost systému  $X_1X_2Y$  u pholcinů a dalších skupin bazálních araneomorfů.

Druhý a pravděpodobně tedy správnější způsob je nalezení alternativního způsobu konverze systému  $X_1X_2Y$  na  $X_0$ , který by uvažoval i vznik systému  $X_1X_20$  ze systému  $X_1X_2Y$ , takovéto alternativní schéma konverze je zachyceno na obrázku 17. Jak už bylo řečeno, asociace gonozomů v systému  $X_1X_2Y$  není zprostředkována chiasmata, v evoluci tedy může docházet k disociaci gonozomů a případným ztrátám značně jednodušeji než při chiasmatickém párování. Nejprve mohlo dojít ke ztrátě chromozomu Y, jenž byl tvořen převážně heterochromatinem, a který vlastně chromozomy X „drží“ v trivalentu. Poté mohlo začít docházet k přenosu materiálu z gonozomu  $X_2$  na  $X_1$ . Následovala by pericentrická inverze  $X_2$  a další přenos materiálu, jenž by v konečném důsledku vedl ke ztrátě zbytku  $X_2$  a tím ke vzniku systému  $X_0$ . Je pravděpodobné, že právě takto se evoluce pohlavních chromozomů odehrávala ve skupině holocneminů a možná i v některých dalších skupinách haplogynních pavouků.



**Obrázek 16. Konverze systému  $X_1X_2Y$  na  $X_0$ .** a) *Spermophora senoculata* ( $X_1X_2Y$ ); b) *Pholcus phalangioides* ( $X_1X_2Y$ ); c) hypotetický  $X_1X_2Y$  systém s akrocentrickými chromozomy; d) *Diguetia albolineata* ( $XY$ ), e) *Holocnemus caudatus* ( $X_0$ ). Převzato z Krále et al. 2006.



**Obrázek 17. Alternativní způsob konverze systému  $X_1X_2Y$  na  $X_0$ .** a) *Leptopholcus guineensis* ( $X_1X_2Y$ ); b) *Smeringopus* sp. nov. 2 (JAR) ( $X_1X_20$ ); c) *Smeringopus* sp. nov. 1 (Madagaskar) ( $X_1X_20$ ); d) *Holocnemus hispanicus* ( $X_0$ ).

Celkem se tedy u třesavek nacházejí tři typy systému pohlavních chromozomů, pravděpodobně ancestrální  $X_1X_2Y$ ,  $X_1X_20$  a nejjedvozenější  $X_0$ . U všech mnou studovaných druhů, se všemi třemi typy systémů pohlavních chromozomů, byl chromozom  $X_1$  metacentrický a největší chromozom celého karyotypu. Stejná situace je u všech ostatních haplogynních pavouků se systémem  $X_0$  (Bole-Gowda 1958, Cokendolpher 1989, Araújo *et al.* 2005, Král *et al.* 2006, Oliveira *et al.* 2007, Ramalho *et al.* 2008). U pholcidů jsou ve všech systémech pohlavních chromozomů gonozomy aspoň v některých etapách meiotického dělení heteropyknotické a u všech druhů byla přítomna opožděná segregace gonozomů v anafázi I.

### 5.1.3 Distribuce nukleolárních organizátorů jadérka

O distribuci NORů na chromozomech pavouků existuje minimum údajů, navíc veškeré dosud publikované výsledky byly získány pomocí stříbření, které nevizualizuje oblasti bez transkripční aktivity. U entelegynních araneomorfních pavouků je známa pozice NORů jen několika druhů. U třech zástupců rodu *Polybetes* (Sparassidae) se vyskytují v telomerické oblasti dvou autozomových párů (Rodríguez-Gil *et al.* 2007). Největší tři autozomové páry nesou NOR u neotropického pavouka *Nephilengys cruentata* (Tetragnathidae) (Araújo *et al.* 2005b). Dva páry NOR chromozomů se nachází u *Tricca lutetiana* a *Arctosa lamperti* (Lycosidae) (Dolejš 2008). U několika dalších druhů je poloha NORů detekována nepřímou tak jako u *Lycosa georgicola* (Lycosidae), kde dva autozomové páry asociují s jadérkem (Wise 1983). Zajímavější jsou výsledky stříbření u bazálních araneomorfních pavouků. U některých druhů se systémem pohlavních chromozomů  $X_0$  byly nalezeny NORy nejenom na autozomech, ale také na pohlavním chromozomu. U *Crossopriza lyoni* (Pholcidae) se nachází kromě čtyř NOR autozomů i NOR gonozom X (Oliveira *et al.* 2007). U *Dysdera crocata* leží chromozom X vždy v blízkosti jadérka (Benavente a Wettstein 1980), výskyt NORu na tomto gonozomu byl potvrzen pomocí stříbření Králem (2006). Dále byl X chromozom s NORem u haplogynních pavouků nalezen u *Monoblemma muchmorei* (Tetrablemmidae), *Ochyrocera* sp. (Ochyroceratidae) (Král *et al.* 2006). U druhů *Scytodes*

*thoracica* (Scytodidae) a *Leptoneta infuscata* (Leptonetidae) sice nebyl NOR pomocí stříbření vizualizován, ale byla pozorována asociace chromozomu X s nukleolem (Král *et al.* 2006).

Rozhodla jsem se tedy ve vizualizaci NORů haplogynních pavouků pokračovat, abych lépe zmapovala jejich výskyt u haplogynních druhů se systémem X0 a hlavně abych získala údaje o poloze NORů u haplogynních druhů se systémem X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y. Je totiž možné, že by se na nepříliš obvyklém způsobu párování gonozomů v tomto systému mohly NORy podílet, tak jako je tomu u *Drosophila melanogaster* (McKee a Karpen 1990, McKee *et al.* 1992) a dalších druhů organismů (Mandrioli *et al.* 1999). Pro detekci NORů jsem použila sofistikovanější způsob detekce pomocí metody FISH, ta byla na pavoučích chromozomech realizována členy laboratoře cytogenetiky pavoukoců Přírodovědecké fakulty UK Praha, vůbec poprvé.

Vizualizace NORů byla prováděna u samců čtyř zástupců čeledi Pholcidae a u jednoho zástupce čeledi Sicariidae. Konkrétně se jednalo o druhy s ancestrálním systémem X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>Y - *Spermophora senoculata*, *Pholcus phalangioides* (Pholcidae – pholcini) a *Loxosceles rufescens* (Sicariidae) a druhy s odvozeným systémem X0 - *Holocnemus hispanicus*, *H. pluchei* (Pholcidae – holocnemini). Nejprve byla používána sonda ze samice *Pholcus phalangioides*, ale zjistili jsme, že při použití této sondy na chromozomy stejného druhu vzniká natolik vysoké pozadí tvořené nespecificky hybridizovanou sondou, že byly výsledky nepoužitelné. Také u dalších druhů třesavek bylo při použití sondy z *P. phalangioides* pozadí tvořené nespecificky hybridizovanou sondou vyšší, proto jsem nakonec používala sondu vyrobenou ze samice *Eresus kollari* (Eresidae).

U některých druhů se NORy vyskytovaly na pohlavních chromozomech. Přítomnost jednoho NORu v terminální oblasti jednoho raménka chromozomu X byla zjištěna u *Holocnemus hispanicus*. Dále byly NORy na pohlavních chromozomech objeveny také u jednoho zástupce s původním systémem pohlavních chromozomů *Pholcus phalangioides*. U této třesavky byly nalezeny na obou chromozomech X, a to u X<sub>1</sub> na koncích obou ramének, u X<sub>2</sub> pouze na konci jednoho raménka. U zbývajících třech druhů byly NORy nalezeny pouze na autozomech. Počet NOR autozomů ve skupině zkoumaných druhů se pohyboval v rozmezí od dvou do šesti. U všech druhů se NOR oblasti nacházely na koncích ramének, ve většině případů se na autozomech či gonozomech vyskytoval pouze jeden NOR. Pouze v karyotypu *Loxosceles rufescens* byl jediný pár autozomů s NORy, které byly na koncích obou ramének, podobně u X<sub>2</sub> *Pholcus phalangioides* se nacházejí NORy a koncích obou ramének

Jediný *Pholcus phalangioides* se od ostatních zkoumaných druhů odlišoval vysokým počtem NORů, nacházíme u něj šest NORů na autozomech a další tři NORy na pohlavních chromozomech X. Protože je takto vysoký počet NORů mezi pavouky naprosto výjimečný,



předpokládám, že je tento stav odvozený a k namnožení NORů došlo buď nerovnoměrným crossing overem nebo genovou duplikací a následnou translokací, tak jako k tomu dochází u některých ryb s vysokým počtem NORů (Vicari *et al.* 2003). U ostatních zkoumaných druhů s původním systémem  $X_1X_2Y$  se NORy na pohlavních chromozomech nevyskytují. Je tedy pravděpodobné, že u *P. phalangioies* došlo k jejich přenosu na gonozomy až druhotně.

Možnost, že se NORy na pohlavních chromozomech pavouků se systémem  $X_1X_2Y$  podílejí na asociaci gonozomů v trivalentu tedy nemůžu vzhledem k výskytu NORů v oblasti párování u *P. phalangioies* vyloučit. Protože však dosud byly NORy na gonozomech nalezeny jenom u jediného druhu s typem  $X_1X_2Y$  (a to jenom na chromozomech X, navíc u druhu s výjimečně vysokým počtem NORů) nepovažuji ji za příliš pravděpodobnou. Každopádně není přítomnost NORů na gonozomech pro jejich asociaci a vznik trivalentu nezbytná.

Zajímavý je poměrně častý výskyt NORů na gonozomech haplogynních pavouků s odvozenými systémy pohlavních chromozomů. NORy byly nalezeny u zhruba poloviny zkoumaných zástupců se systémem  $X0$  (vlastní výsledky, Král *et al.* 2006, Olivera *et al.* 2007). K vysvětlení příčiny preferenčního umístění NOR oblastí na X chromozomech by bylo však potřeba hlubšího výzkumu.

## 5.2 Mygalomorfní pavouci čeledi Atypidae

Dosud byly cytogeneticky zkoumány jenom čtyři zástupci sklípkanů, z toho tři druhy žijící v České republice - *Atypus affinis*, *A. muralis* a *A. piceus* (Řezáč *et al.*, 2006). Protože jejich základní cytogenetická analýza odhalila několik zajímavostí, byl vybrán *A. piceus* jako zástupce druhu s 41 chromozomy a *Atypus affinis* s odvozenějším karyotypem složeným z pouhých 14 chromozomů pro podrobnější studium karyotypu. Pomocí C pruhování bylo zjišťováno rozložení heterochromatinu a metoda FISH byla použita pro vizualizaci NORů. U *Atypus affinis* byly výsledky FISH ověřovány ještě stříbřením.

Jak už bylo zjištěno přede mnou Suzukim (1954), jenž stanovil karyotyp čtvrtého cytogeneticky prozkoumaného druhu *Atypus karschi*, je velmi problematické zachytit u samců sklípkanů stádia, ve kterých se v gonádách odehrává meiotické dělení. Zdá se, že k meiotickému dělení progenitorů pohlavních buněk dochází ve velmi krátkém období subadultního stádia. Meiotické dělení je u dospělců již ukončeno a rozpoznání subadultního samce od samice je téměř nemožné. Proto jsem subadultní jedince na přípravu preparátů

vybírala náhodně. Ukázalo se, že v populacích sklípkánků panuje nerovnováha v poměru pohlaví. V dosti velkém vzorku populace *A. affinis* i *A. piceus* se nachází jenom minimum samců.

Pomocí C pruhování bylo v genomu *Atypus piceus* nalezeno velké množství konstitutivního heterochromatinu (až 20 % chromatinu), přítomnost takového množství není u pavouků vůbec obvyklá (Kráal, ústní sdělení). U většiny chromozomů tohoto druhu se široké a výrazné C pruhy se nacházely v oblasti telomer, o něco užší v oblasti centromer a na některých chromozomech se nacházely i tenké intersticiální pruhy. Obzvláště množství heterochromatinu *A. piceus* vynikne ve srovnání s *A. affinis*, jenž obsahuje konstitutivního heterochromatinu mnohem méně. Oba druhy se lišily i distribucí heterochromatinu, u *A. affinis* se výraznější pruhy nacházely v oblasti centromer, v oblasti telomer se nacházely pouze úzké a nevýrazné proužky. Společným znakem obou druhů byl výskyt nejdelšího heterochromatinového pruhu v sekundární konstrikci dlouhého raménka 2. autozomového páru. U *A. piceus* byla šířka pruhů na obou chromozomech shodná, u *A. affinis* se šířka heterochromatinové oblasti na homologních chromozomech 2. páru podstatně lišila. Ve všech figurách byla na jednom chromozomu zhruba dvakrát větší než na druhém.

Vizualizace NORů čeledi Atypidae byla problematická, s chromozomy samců obou druhů nehybridizovala ani jedna ze dvou 18S rDNA sond, jež jsme používali na chromozomy třesavek, ani sonda ze samice *Pholcus phalangoides* ani sonda připravená ze samice *Eresus kollari* (Eresidae). Pro výrobu sondy jsme tedy museli získat příbuznější druh. Po negativních zkušenostech s použitím sondy z *Pholcus phalangoides* na chromozomové preparáty ze stejného či příbuzných druhů, jsme upustili do přípravy sondy ze třetího druhu rodu *Atypus* žijícího na území České republiky. Místo něho jsme zvolili méně příbuzný americký druh *Aliatypus sp.* z čeledi Antrodiaetidae, jež je považována za sesterskou skupinu čeledi Atypidae.

NORy se u obou druhů nacházejí v sekundární konstrikci dlouhého raménka chromozomového páru č. 2. Zatímco intenzita hybridizačního signálu *A. piceus* je na obou homologních chromozomech stejná, u druhu *A. affinis* je vždy na jednom chromozomu intenzita signálu podstatně větší.

Tento pozoruhodný rozdíl, jenž byl zaznamenán jak při C pruhování, tak při vizualizaci NORů pomocí FISH u *A. affinis* jsem se rozhodla dále analyzovat stříbřením. Na všech figurách jsou koloidním stříbrem obarveny sekundární konstrikce na obou chromozomech, obě NOR oblasti jsou tedy v interfázi transkribovány. Po stříbření je opět

viditelný zhruba dvojnásobný rozdíl ve velikosti vizualizované oblasti, navíc menší NOR je zbarven o něco výrazněji, což značí vyšší míru jeho transkripce.

Oblasti C pruhů obou druhů rodu *Atypus* přibližně kolokalizují s oblastmi hybridizačních signálů 18S rDNA sondy, u *A. affinis* je stříbřením potvrzeno, že oblast C pruhů kolokalizuje s oblastí aktivní rDNA. To by znamenalo, že u těchto druhů nejsou C pruhy tvořeny konstitutivním heterochromatinem. Tento jev byl nalezen i u několika dalších druhů organismů (Sumner 1990).

Při analýze karyotypů dvou zástupců čeledi Atypidae jsem přišla na několik dalších velmi zajímavých skutečností. U *A. piceus* (X0) byl nalezen chromozom podobné velikosti a pruhovacího vzoru jako u gonozomu Y *A. affinis*. Studium průběhu meiotického dělení by mohlo objasnit, zda není u tohoto druhu systém pohlavních chromozomů přece jen složitější a jestli se nejedná o neopohlavní chromozom. Dalším nálezem je rozdílná šířka C pruhů v sekundární konstrikci chromozomů 2. párů u *A. affinis*, ale ještě překvapivější je kolokalizace těchto pruhů s oblastí aktivní rDNA a to jak u *A. affinis* tak u *A. piceus*. Dalším zajímavým výsledkem, který možná není na první pohled zřejmý, je výrazná fylogenetická vzdálenost mezi atypidy a araneomorfní pavouky, plynoucí z nepoužitelnosti 18S rDNA sondy jak z haplogynního, tak z entelegynního araneomorfního pavouka pro analýzu NORů atypidů. Přitom mutační rychlost tohoto úseku rDNA většinou dovoluje jeho využití i pro velmi staré události z období prekambria (Hillis a Dixon 1991).

## 6 Souhrn

Pavouci jsou z cytogenetického hlediska prozkoumání značně nerovnoměrně, většina studií se zabývá nejedvozenější skupinou entelegygních araneomorfních pavouků. Právě proto se předkládaná práce věnuje méně probádaným skupinám haplogygních a mygalomorfních pavouků. Konkrétně se zaměřuje především na zástupce dvou čeledí Pholcidae (Haplogynae) a Atypidae (Mygalomorphae). Haplogygní pavouci patří spolu se dvěma reliktními nadčeldmi Hypochiloidea a Austrochilioidea mezi bazální araneomorfní pavouky, kteří jsou považováni za sesterskou linii entelegygních araneomorfních pavouků, jež je odvozenější a početnější. Čeď Atypidae patří do nadčeďi Atypoidea, jež je považována za bazální skupinu infrařadu Mygalomorphae.

Pomocí klasických cytogenetických metod jsem sestavila karyogram šesti druhů pholcidů a analyzovala průběh jejich meiotického dělení. Fluorescenční in situ hybridizací jsem detekovala polohu nukleolárních organizátorů jadérka na chromozomech čtyřech zástupců čeledi Pholcidae a *Loxosceles rufescens* (Sicariidae). Podrobněji jsem studovala karyotypy dvou sklípkánek žijících na našem území *Atypus piceus* (41,X0) a *A. affinis* (14,XY). Pomocí C pruhování jsem zjistila rozložení heterochromatinu a pomocí FISH a stříbření distribuci nukleolárních organizátorů jadérka.

Diploidní počty chromozomů se u třesavek pohybují mezi 17 a 28. V karyotypech výrazně převažují dvouramenné tzn. metacentrické či submetacentrické chromozomy. Pohlavní chromozomy sameců jsou po většinu meiotického dělení heteropyknotické a dají se tak od autozomů snadno odlišit. U zkoumaných druhů se vyskytují tři typy systémů pohlavních chromozomů, pravděpodobně ancestrální typ  $X_1X_2Y$ , dále  $X_1X_20$  a  $X0$ . Na základě získaných dat jsem navrhla nové alternativní schéma konverze systému  $X_1X_2Y$  na  $X0$ .

Třesavky mají až na jedinou výjimku, *Pholcus phalangioides*, spíše nižší počet NORů, od dvou do šesti, které se nacházejí vždy v terminálních oblastech chromozomů. U dvou druhů jsem NORy objevila také na pohlavních chromozomech a to na chromozomu X *Holocnemus hispanicus* se systémem pohlavních chromozomů  $X0$  a na obou chromozomech X *P. phalangioides* se systémem  $X_1X_2Y$ . U dalších dvou druhů s tímto ancestrálním systémem pohlavních chromozomů se NORy vyskytují pouze na autozomech a tedy nemohou hrát roli v zvláštním způsobu asociace pohlavních chromozomů v trivalentu.

U obou Atypidů se nachází jediný chromozomový pár nesoucí NOR, v obou případech se jedná o sekundární konstrikci dlouhého raménka autozomového páru č. 2. U *Atypus piceus*

bylo nálezem od *A. affinis* nalezeno nezvyklé množství heterochromatinu. Zajímavá je rovněž kolokalizace C pruhů s oblastí aktivně transkribované rDNA u *A. affinis*.

Předpokládané cíle diplomové práce byly splněny, práce přispěla k pochopení evoluce pohlavních chromozomů a karyotypů haplogynních pavouků a doplnila poznatky o karyotypech *A. piceus* a *A. affinis*.

## 7 Seznam citované literatury

- Abouheif E., Zardoya R., Meyer A. (1998) Limitations of Metazoan 18S rRNA sequence data: implications for reconstructing a phylogeny of the animal kingdom and inferring the reality of the cambrian explosion. *J. Mol. Evol.* 47: 394-405.
- Araújo D., Brescovit A. D., Rheims C. A., Cella D. M. (2005a) Chromosomal data of two pholcids (Araneae, Pholcidae): A new diploid number and the first cytogenetical record for the New World clade. *J. Arachnol.* 33: 591-596.
- Araújo D., Cella D. M., Brescovit A. D. (2005b) Cytogenetic analysis of the neotropical spider *Nephilengys cruentata* (Araneomorphae, Tetragnathidae): Standard staining, NORs, C-bands and base-specific fluorochromes. *Braz. J. Biol.* 65: 193-202.
- Araújo D., Cella D. M., Brescovit A. D. (2005c) Variabilidade cromossômica em três espécies de *Scytodes* Latreille, 1804 (Araneae, Haplogynae, Scytodidae). *Actas del primer Congreso Latinoamericano de Aracnología Uruguay: Minas.*
- Araújo, D., Rheims C. A., Brescovit A. D., Cella, D. M. (2008) Extreme degree of chromosome number variability in species of the spider genus *Scytodes* (Araneae, Haplogynae, Scytodidae). *J. Zool. Syst. Evol.* 46: 89-95.
- Benavente R., Wettstein R. (1977) An ultrastructural cytogenetic study on the evolution of the sex chromosomes during spermatogenesis of *Lycosa malitiosa* (Arachnida). *Chromosoma* 64: 255-277.
- Benavente R., Wettstein R. (1980) Ultrastructural characterization of the sex chromosomes during spermatogenesis of spiders having holocentric chromosomes and a long diffuse stage *Chromosoma* 77: 69-81.
- Benavente R., Wettstein R., Papa M. (1982) Ultrastructural analysis of the X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>X<sub>3</sub>0 sex chromosome system during the spermatogenesis of *Tegenaria domestica* (Arachnida). *J. Cell Sci.* 58: 411-422.
- Bole-Gowda B. N. (1958) A study of the chromosomes during meiosis in twenty-two species of Indian spider. *Proc Zool Soc Bengal.* 11: 69-108.
- Bole-Gowda B. N. (1950) The chromosome study in the spermatogenesis of two lynx-spiders (Oxyopidae). *Proc. Zool. Soc. Bengal* 3: 95-107 (převzato z Olivera *et. al.* 2007).
- Brum-Zorilla N., Postiglioni A. (1981) Karyological studies on Uruguayan spiders. II. Sex chromosomes in spiders of the genus *Lycosa* (Araneae: Lycosidae). *Genetica* 56: 47-53.
- Brutto S. L., Arculeo M., Sara M. (2004) Mitochondrial simple sequence repeats and 12S-rRNA gene reveal two distinct lineages of *Crocidura russula* (Mammalia, Soricidae) *Heredity* 92: 527-533.
- Bruvo-Madaric B., Huber B. A., Steinacher A., Pass G. (2005) Phylogeny of pholcid spiders (Araneae: Pholcidae): Combined analysis using morphology and molecules. *Mol. Phyl. Evol.* 37: 661-673.

- Buchar J., Kůrka A. (2001) Naši pavouci. Academia, Praha (2. vydání).
- Buchar J., Růžička V. (2002) Catalogue of spiders of the Czech Republic. Peres Publishers, Praha.
- Cattani M. V., Papeschi A. G. (2004) Nucleolus organizing regions and semi-persistent nucleolus during meiosis in *Spartocera fusca* (Thunberg) (Coreidae, Heteroptera) *Hereditas* 140: 105-111.
- Coddington J. A., Levi H. W. (1991) Systematics and evolution of spiders (Araneae). *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 22: 565-92.
- Cokendolpher J. C. (1989) Karyotypes of three spider species (Araneae: Pholcidae: *Physocyclus*). *J. New York. Entomol. Soc.* 97: 475-478.
- Cracraft J., Donoghue M. (2004) *Assembling the tree of life*, Oxford University Press, Oxford.
- Datta, S. N., Chatterjee K. (1983) Chromosome number and sex determining mechanism in fifty-two species of spiders from North-East India. *Chromosome Ing. Ser.* 35: 6-9.
- Derenzini M., Pasquinelli G., O'Donohue M., Ploton D., Thiry M. (2006) Structural and functional organization of ribosomal genes within the mammalian cell nucleolus. *J. Histochem. Cytochem.* 54: 131-145.
- Díaz M., Sáez F. A. (1966a) Karyotypes of South America Araneida. *Memórias Instituto Butantán Commemorativo* 33: 153-154.
- Díaz M., Sáez F. A. (1966b) Investagciones citogenéticas sobre algunas especies de araneidos uruguayos. *Congreso Latinoamericano de Zoología*.
- Dolejš P. (2008) Srovnání životních projevů dvou druhů pavouků *Tricca lutetiana* a *Arctosa lamperti* (Araneae: Lycosidae) Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta UK, Praha.
- Dulíková L. (2009) Studium karyotypu u pavouků infrařádu Mygalomorphae (Araneae) Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta UK, Praha.
- Dulíková L., Král J. (2007) Insights into the karyotype evolution of the spider infraorder Mygalomorphae. Abstract: 17th International Congress of Arachnology, Sao Paulo, Brazil.
- Esteve-Zarzoso B., Belloch C., Uruburu F., Querol A. (1999) Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5,8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 329-337.
- Foelix R. F. (1996) *Biology of spiders*. Oxford University Press, Inc. And Georg Thieme Verlag, New York.
- Forman M. (2008) Karyotypová evoluce stepníkovitých pavouků (Araneae: Eresidae) Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta UK, Praha.

- Gerbi S. A., Borovjagin A. V., Lange T. S. (2003) The nucleolus: a site of ribonucleoprotein maturation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 318-325.
- Giribet G., Ribera C. (2000) A review of arthropod phylogeny: New data based on ribosomal DNA sequences and direct character optimization. *Cladistics* 16: 204-231.
- Graham D. E. (1978) The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms or large tissue masses. *Anal. Biochem.* 85: 609-613.
- Hackmann W. (1948) Chromosomenstudien an Araneen mit besonderer Berücksichtigung der Geschlechtschromosomen. *Acta Zool. Fennica* 54: 1-101.
- Hedges S. B., Moberg K. D., Maxson L. R. (1990) Tetrapod phylogeny inferred from 18S and 28S ribosomal RNA sequences and a review of the evidence for amniote relationships. *Mol. Biol. Evol.* 7: 607-633.
- Hedin M., Bond J. E. (2006) Molecular phylogenetics of the spider infraorder Mygalomorphae using nuclear rRNA genes (18S and 28S): Conflict and agreement with current system of classification. *Mol. Phyl. Evol.* 41: 454-471.
- Hetzler S. (1979) Some studies of spider chromosomes. *Am. Arachnol.* 20: 20.
- Hillis D. M., Dixon M. T. (1991) Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Q. Rev. Biol.* 66: 411-453.
- Howell W. M., Black D. A. (1980) Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia* 36: 1014.
- Hozák P., Schofer Ch., Sylvester J., Wachtler F. (1993) A study on nucleolar DNA: isolation of DNA from fibrillar components and ultrastructural localization of different DNA probes. *J. Cell Sci.* 104: 1199-1205.
- Huang S. (2002) Building an efficient factory: where is pre-rRNA synthesized in the nucleolus?. *J. Cell Biol.* 157: 739-741.
- Huber B. A. (2000) New world pholcid spiders (Araneae: Pholcidae): A revision at generic level. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* 254: 1-347.
- Jackson R. R., Brassington R. J., Rowe R. J. (1990) Anti-predator defences of *Pholcus phalangoides* (Araneae, Pholcidae), a web-building and web-invading spider. *J. Zool. Lond.* 220: 543-552.
- Jarman S. N., Nicol S., Elliott N. G., McMinn A. (2000) 28S rDNA evolution in the Eumalacostraca and the phylogenetic position of krill. *Mol. Phylogenet. Evol.* 17: 26-36.
- Jocqué R., Dippenaar-Schoeman A. S. (2006) Spider families of the world. Royal Museum for Central Africa, Tervuren.
- John B. (1990) Meiosis. Cambridge Univ. Press.



- Klásterská I. (1977) The concept of the prophase of meiosis. *Hereditas* 86: 205-210.
- Král J. (1994) Přehled cytogenetiky pavoukoců. *Biol. listy* 59: 282-306.
- Král J., Musilová J., Šťáhlavský F., Řezáč M., Akan Z., Edwards R. L., Coyle F. A. Almeje R. C. (2006) Evolution of the karyotype and sex chromosome systems in basal clades of araneomorph spiders (Araneae: Araneomorphae). *Chromosome Res.* 14: 859-880.
- Král J. (2007) Evolution of multiples sex chromosomes in the spider genus *Malthonica* (Araneae: Agelenidae) indicates unique structure of the spider sex chromosome systems *Chromosome Res.* 15: 863-879.
- Lanzome C., Souza M. J. (2006) Chromosome complement and meiosis in three species of the Neotropical bug genus *Antitechus* (Heteroptera, Pentatomidae, Discocephalinae) *Genet. Mol. Biol.* 29: 49-55.
- Levan A., Fredga K., Sandberg A. A. (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Lokwood A. M. P. (1961) „Ringer“ solutions and some notes on the physiological basis their ionic composition. *Comp. Biochem. Physiol.* 2: 241-289.
- Maddison W. P. (1982) XXXY sex chromosomes in males of the jumping spider genus *Pellenes* (Araneae: Salticidae). *Chromosoma* 85: 23-27.
- Mandrioli M., Bizzaro D., Giusti M., Manicardi G. C., Bianchi U. (1999) The role of rDNA genes in X chromosome association in the aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Genome* 42: 381-386.
- McKee B. D., Karpen G. H. (1990) *Drosophila* ribosomal RNA genes function as an X-Y pairing site during male meiosis. *Cell* 61:61-72.
- McKee B. D., Habera L., Vrana J. A. (1992) Evidence that intergenic spacer repeats of *Drosophila melanogaster* rRNA genes function as X-Y pairing site in male meiosis, and a general model for achiasmatic pairing. *Genetics* 132: 529-544.
- McClintock Turbeville J., Pfeifer D. M., Field K. G., Raff R. A. (1991) The phylogenetic status of arthropods, as inferred from 18S rRNA sequences. *Mol. Biol. Evol.* 8: 669-686.
- Moss, T., Stefanovsky V. Y. (1994) Promotion and regulation of ribosomal transcription in eukaryotes by RNA polymerase I. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 50: 25-66.
- Nyffeler M., Moor H., Foelix R. F. (2001) Spiders feeding on earthworms. *J. Arachnol.* 29: 119-124.
- Odorico D. M., Miller D. J. (1997) Variation in the ribosomal internal transcribed spacers and 5,8S rDNA among five species of *Acropora* (Cnidaria, Scleractinia): Patterns of variation consistent with reticulate evolution. *Mol. Biol. Evol.* 14: 465-473.

- Oliveira R. M., de Jesus A. C., Brescovit A. D., Cella D. M. (2007) Chromosomes of *Crossopriza lyoni* (Blackwall 1867), intraindividual numerical chromosome variation in *Physocyclus globosus* (Taczanowski 1874), and the distribution pattern of NORs (Araneomorphae, Haplogynae, Pholcidae). *J. Arachnol.* 35: 293-306.
- Olson M. O. J., Dundr M., Szebeni A. (2000) The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol.* 10: 189-196.
- Page J., Berríos S., Rufas J. S., Parra M. T., Suja J. A., Heyting Ch., Fernández-Donoso R. (2003) The pairing of X and Y chromosomes during meiotic prophase in the marsupial species *Thylamys elegans* is maintained by a dense plate developed from their axial elements. *J. Cell Sci.* 116: 551-560.
- Page J., Fuente R., Gómez R., Calvente A., Viera A., Parra M. T., Santos J. L., Berríos S., Fernández-Donoso R., Suja J. A., Rufas J. S. (2006) Sex chromosomes, synapsis, and cohesins: a complex affair. *Chromosoma* 115:250-259.
- Painter T. S. (1914) Spermatogenesis in spiders. *Zool. Jahrb.* 38: 509-576.
- Parida B. B. , Sharma N. N. (1987) Chromosome number, sex mechanism and genome size in 27 species of Indian spiders. *Chromos. Inf. Serv.* 43: 11-13.
- Park H.S., Yamamoto M.T. 1995 The centric region of the X chromosome rDNA functions in male meiotic pairing in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*, 103: 700–707.
- Patau, K. (1948) X- segregation and neterochromasy in the spider *Aranea reaumuri* *Heredity.* 2: 77-100.
- Pederson T. (1998) The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res.* 26: 3871-3876.
- Pickett-Heaps J. D. (1970) The behavior of the nucleolus during mitosis in plants *Cytobios* 6: 69-78.
- Platnick, N. I. (2009). The world spider catalog, version 10.0. American Museum of Natural History, online at <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>.
- Ramalho M. O., Araújo D., Schneider M. C., Brescovit A. D., Cella D. M. (2008) *Mesabolivar brasiliensis* (Moenkhaus 1898) and *Mesabolivar cyaneotaeniatus* (Keyserling 1891) (Araneomorphae, Pholcidae): close relationship reinforced by cytogenetic analyses. *J. Arachnol.* 36: 453-456.
- Raška I. (2003) Oldies but goldies: searching for Christmas trees within the nucleolar architecture. *Trends Cell Biol.* 13: 517-525.
- Rodríguez-Gil S. G. , Mola L. M., Papeschi A. G. , Scioscia C. L. (2002) Cytogenetic heterogeneity in common haplogyne spiders from Argentina. *J. Arachnol.* 30: 47-56.
- Rodríguez-Gil S. G. (2007) Cytogenetics in three species of *Polybetes* Simon 1897 from Argentina (Araneae, Sparassidae) I. Karyotype and chromosome banding pattern. *J. Arachnol.* 35: 227-237.

- Rowell D. M. (1985) Complex sex-linked fusion heterozygosity in the Australian huntsman spider *Delena cancerides* (Araneae: Sparasidae). *Chromosoma* 93: 169-17.
- Ruppert E. E., Fox R. S., Barnes R. D. (2004) *Invertebrate zoology: A Functional Evolutionary Approach*. Thomson - Brooks/Cole Learning, Belmont (7. vydání).
- Růžička V., Buchar J. (2008) Dodatek ke katalogu pavouků České republiky 2001-2007. Supplement to the catalogue of spiders of the Czech Republic 2001-2007. *Sborník Oblastního muzea v Mostě, řada přírodovědná* 29/30.
- Řezáč M., Král J., Musilová J., Pekár S. (2006) Unusual karyotype diversity in the European spiders of genus *Atypus* (Araneae: Atypidae). *Hereditas* 143: 123-129.
- Sakamoto T., Araújo D., Brescovit A. D., Zacaro A. A. (2007) Cytogenetic analysis of *Pholcus phalangioides* (Fuesslin, 1775) (Araneae: Pholcidae) from Vicosa (Minas Gerais, Brazil). Abstract: 17th International Congress of Arachnology, Sao Paulo, Brazil.
- Sharma G. P., Gupta B. L., Parshad R. (1959) Cytological studies on the Indian spiders. III. An analysis of the chromosomes in the male germ cells of the spider *Crossopriza lyoni* (Blackwall), Fam. Pholcidae. *Research Bull. of the Panjab Univ.* 10: 49-53.
- Sharma G. P., Parida B. B. (1987) Study of chromosome in spider from Orissa. *Pranikee* 8: 71-76.
- Shukla M. S., Pidiyar V., Bhave N. A., Patole M. S., Shouche Y. S. (2001) PCR amplification and sequencing of mitochondrial 12S rRNA gene fragment from *Muntiacus muntjak* (Indian muntjac) *Curr. Sci. India* 80: 617-618.
- Scheer U., Thiry M., Goessens G. (1993) Structure, function and assembly of the nucleolus. *Trends Cell Biol.* 3: 236-241.
- Silva, D. (1988) Estudio cariotípico de *Lososceles laeta* (Araneae: Loxoscelidae). *Revista peruana de Entomología* 31:9-12.
- Silva R. W., Klisiowicz D. R., Cella D. M., Mangili O. C., Sbalqueiro I. J. (2002) Differential distribution of constitutive heterochromatin in two species of brown spider: *Loxosceles intermedia* and *L. laeta* (Araneae, Sicariidae), from the metropolitan region of Curitiba, PR (Brazil). *Acta Biol. Par. (Curitiba)* 31: 123-136.
- Smetana K. (2003) Are nucleoli participating in programmed cell death? (review) *J. Appl. Biomed.* 1: 93-97.
- Sokolska I. (1925) Les hétérochromosomes pendant la spermatogenèse de l'Araignée domestique (*Tegenaria domestica*). *Bull. Inst. Acad. Cracovie, Cl. Sc. Math. Nat.* 38: 561-566.
- Srivastava, M. D. L., Shukla S. (1986) Chromosome number and sex determining mechanism in forty seven species of Indian spiders. *Chromosome Inf. Serv.* 41: 23-26.

- Stack S., Anderson L. K. (2001) A model for chromosome structure during the mitotic and meiotic cell cycles (Review). *Chromosome Res.* 9: 175-198.
- Starrett J., Hedin M. (2006) Multilocus genealogies reveal multiple cryptic species and biogeographical complexity in the California turret spider *Antrodiaetus riversi* (Mygalomorphae, Antrodiaetidae) *Mol. Eco.* 16: 583-604.
- Sumner A. T. (1990) Chromosome banding. Unwin hyman, London
- Sumner A. T. (2003) Chromosomes: organization and function. Blackwell Science, Oxford
- Suzuki S. (1954) Cytological studies in spiders. III. Studies on the chromosomes of fifty-seven species of spiders belonging to seventeen families with general considerations on chromosomal evolution. *J. Sci. Hiroshima Univ. B* 15: 23-136.
- Swarzacher H. G., Wachtler F. (1993) The nucleolus. *Anat. Embryol.* 188: 515-536.
- Thiry M., Lafontaine D. L. J. (2005) Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol.* 15: 194-199.
- Traut W. (1976) Pachytene mapping in the female silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera). *Chromosoma* 58: 275-284.
- Traut W. (1991) *Klasische und molekulare cytogenetik.* Springer-Verlang, Berlin.
- Tugmon C.R., Brown J. D., Horner N. V. (1990) Karyotypes of seventeen USA spider species (Araneae, Araneidae, Gnaphosidae, Loxoscelidae, Lycosidae, Oxyopidae, Philodromidae, Salticidae and Theridiidae) *J. Arachnol.*: 18:41-48.
- Ueshima N. (1979) *Animal Cytogenetics. Insecta 6. Hemiptera II.* Bebruder Borntraeger, Berlin – Stuttgart.
- Vicari M. R., Artoni R. F., Bertollo L. A. C. (2003) Heterochromatin polymorphism associated with 18S rDNA: a differential pathway among *Hoplias malabaricus* fish populations. *Cytogenet. Genome Res.* 101: 24-28.
- Wachtler F, Stahl A. (1993) The nucleolus: a structural and functional interpretation. *Micron* 24: 473-505.
- Wallace L B. (1909) The spermatogenesis of *Agelena naevia*. *Biol. Bull.* 17:120-160.
- Wang S., Zhao M., Li T. (2003) Complete sequence of the 10.3 kb silkworm *Attacus ricini* rDNA repeat, determination of the transcriptional initiation site and functional analysis of the intergenic spacer. *DNA Sequence* 14: 95-101.
- Wang Y., Song D., Wang X., Yang Z. (1993) Preliminary studies on the chromosome of four species of spiders. *Acta Arachnol. Sinica* 2: 110-113.
- Wang, X. Z., Cui S. J., Yang Z. L, Wang J. P., Wang Y. J. (1997) On karyotype of the *Pholcus affinis* (Araneae: Pholcidae). *Acta Arachnol. Sinica* 6:19–22.

White M. J. D. (1973) *Animal cytology and evolution*. Cambridge University Press, London.

Wise D. (1983) An electron microscope study of the karyotypes of two wolf spiders. *Can. J. Genet. Cytol.* 25: 161-168.

Wolf K. W. (1994) How meiotic cells deal with non-exchange chromosomes. (Review) *BioEssays* 16: 107-114.

Yang Z. (1996) Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses. *Tree* 11: 367-372.

Yang Z. (2007) PAML 4: Phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1586-1591.