

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: doktorský
Studijní obor: zoologie



Mgr. Oldřich Zahradníček

Evoluční a vývojové aspekty dentice šupinatých plazů

**Evolutionary and developmental aspects of dentition
of squamate reptiles**

Disertační práce

Školitel:

Prof. RNDr. Ivan Horáček, CSc.

Praha, 2011

Prohlášení:

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

V Praze, 18. 07. 2011

Podpis

PODĚKOVÁNÍ

Děkuji svému školiteli Prof. I. Horáčkovi za zajištění výzkumného zázemí zejména v počátku studia, za podnětné připomínky a inspiraci, které mě mnohdy pomohly vykročit z úzkého zaměření mysli a uvidět tak za roh. Další velké díky patří Dr. A. Tuckerové za všestrannou podporu, pomoc a trpělivost, nejen na rovině vědecké, ale i lidské. Velké díky za všestrannou pomoc, podporu, radostné spolutvoření a závěrečné čtení tohoto rukopisu patří M. Buchtové. Děkuji také L. Kratochvílovi, Z. Starostové, H. Jirků, L. Kubičkovi, H. Červenkoví, V. Holáňové, P. Velenskému, J. a M. Bosákovým za kontinuální poskytování velkého množství embryologického materiálu, bez kterého by tato práce nikdy nevznikla. Děkuji R. Černému za podnětné připomínky a za pomoc v klíčových okamžicích, a v neposlední řadě i A. Hoškové za zpravování grantu. Díky patří také M. Rothové, J. Catonovi a mnoha dalším, zde nezmiňovaným, kteří mě podporovali ať už to bylo v laboratoři, nebo v osobním životě. Velké díky patří za podporu rodině. Děkuji také grantové agentuře GAAV, která poskytla výzkumný grant KJB601110910, bez kterého by tento výzkum nebyl možný.

ABSTRAKT

Dentice a její evoluční modifikace sehrály v radiaci plazů důležitou roli. Za původní stav se považuje homodontní, polyfyodontní dentice s konickými až cylindrokonickými zuby, které jsou pleurodontně připojeny k čelistním kostem. Odvozeným stavem pak byla evoluce heterodontie, akrodoncie a vzácně monofyodontie. Ve srovnání se savci, kde chrup je tradičně chápán jako jeden z nejdůležitějších znaků a jeho výzkumu je průběžně věnována značná pozornost, zájem o plazi dentici byl donedávna omezen. Zaměřil jsme se tedy na vývojové a evoluční aspekty zubů linie Squamata, která zahrnuje většinu recentních druhů plazů. Při výzkumu jsem použil histologické, imunohistochemické a *in situ* hybridizační metody s doplněním o počítačovou tomografii, rentgenografii a rastrovací elektronovou mikroskopii. Cílem práce bylo (a) vybrat vhodné modelové taxony reprezentující vývojové linie šupinatých plazů, které jsou relevantní z hlediska své fylogenetické pozice v rámci Squamata a které vykazují kontrastní typy dentálních adaptací; (b) v praxi ověřit použitelnost zvolených taxonů jako modelových druhů; (c) pro tyto taxony získat vlastním výzkumem základní informace o specifikách jejich odontogeneze. Jako zástupce s generalizovaným stavem dentice, vyskytující se u velkého množství ještěřů, jsem vybral v současnosti jako nový modelový organismus prezentovaného gekona *Paroedura picta*, zastupující bazální linii Gekkota, a zaměřil jsem se zejména na charakteristiky v rozdílu vývoje mezi nultou a funkčními generacemi zubů, vývoj sklovinného orgánu v oblasti zubní korunky a zubní báze a mechanismus vývoje zubních hrbolků. V návaznosti na rozpoznání odontogenetické dynamiky u tohoto druhu jsem zkoumal charakteristiky vývoje kontrastních typů zubů a dentice jako celku u zástupců velké linie Toxicofera, a to (a) jedových zubů u chřestýšovce *Cryptelytrops albolabris* z bazální linie moderních hadů (Caenophidia), kde jsem se zaměřil na vývoj kanálku pro vedení jedu; (b) konických zubů nulté zubní generace a dýkovitých zubů s bází tvořenou plicidentinem funkčních generací u varana *Varanus indicus* (Varanoidea, Varanidae); (c) monofyodontní, akroodontní dentici s vícehrbolkovými zuby u chameleona *Chamaeleo calypttratus* (Iguania, Chamaeleonidae); (d) dentici malakofágních chamaeleolisů (*Chamaeleolis*), jejichž tvar distálních zubů se v průběhu života mění z trikonodontního na molariformní a dentici příbuzného anolise *Anolis barahoe* (Iguania, Polychrotinae), jejíž charakteristiky představují základní stav, z kterého se v linii vedoucí k chamaeleolisům vyvinulo malakofágní přizpůsobení. Mezi nejdůležitější objevy patří

(a) nalezení vrstvy „*stratum intermedium*“, která je zřejmě podobně jako u savců klíčová pro diferenciaci buněk vnitřního sklovinného epitelu v ameloblasty; (b) popsání struktur, které řídí vývoj sklovinného orgánu a vícehrbolkového tvaru a jejich interpretace jako struktur preadaptovaných pro evoluci savčích sklovinných uzlů; (c) nalezení dvou typů mechanismu vývoje zubních hrbolků u šupinatých plazů; (d) vývojová interpretace vzniku rozdílů ve velikosti a úhlu připojení bočních zubních hrbolků, které jsem pozoroval u chamaeleolisů; (e) popsání dynamiky vývoje kanálku v jedových zubech chřestýšovce *C. albolabris*.

SUMMARY

Dentition and its evolutionary modifications played important roles during the radiation of reptiles. It is generally accepted that a plesiomorphic state for reptiles is represented by homodont, polyphyodont dentition with conical or cylindroconical teeth. However, in contrast to mammalian dentition which is the object of intensive research, reptilian dentition is studied only rarely. I therefore focused on developmental and evolutionary aspects of squamate dentition and used histological, immunohistochemical and *in situ* hybridization methods, computerised tomography, rentgenography and scanning electron microscopy. The goals of this work were as following: (a) to choose the model taxa representing squamate lineages relevant from a phylogenetic position as well as possessing dissimilar types of dental adaptations; (b) to evaluate using of these taxa as model species; (c) in these taxa describe basic odontogenic features. As a species with generalized dentition gecko *Paroedura picta* was chosen, the up coming reptilian model species with features also present in a wide spectrum of other lizards. I focused mainly on the developmental differences between teeth of the null and functional generations, development of enamel organ and mechanisms of bicuspid pattern development. I then analysed odontogenic aspects of different types of teeth and dentition in members of Toxicofera lineage as a whole. I focused on (a) fangs of pit viper *Cryptelytrops albolabris*, which belongs to a basal lineage of modern snakes (Caenophidia) and examined development of venom-conducting canal; (b) conical null generation teeth and sharp functional teeth which possess dentine base formed by plicidentine in *Varanus indicus* species (Varanoidea, Varanidae); (c) monophyodont, acrodont dentition with multicuspid crown pattern in chameleon *Chamaeleo calypttratus* (Iguania, Chamaeleonidae); (d) dentition of malacophagous Cuban anole lizards of genus *Chamaeleolis*, which have distal teeth that change their shape from triconodont to molariform. For the comparative purposes its close neighbour anole *Anolis barahoeae* (Iguania, Polychrotinae) was chosen. The dentition of this species represents a basic state, which was the starting point for the mallacophagously-adapted dentition of Cuban anole lizards. The most important outcommes of this research are as the following: (a) identification of “*stratum intermedium*“, which is probably one of the key factor responsible for the ameloblast differentiation, a situation that resembles that in mammals; (b) description of structures that control differentiation of enamel organ and later bicuspid or multicuspid tooth shape, and interpretation of these structures as

preadaptations for mammalian enamel knots evolution; (c) finding two types of mechanisms of tooth cusp formation within squamates; (d) developmental interpretation of differences between size of lateral cusps and their angle of connection with the central tooth conus in Cuban anole lizards; and, last but not least (e) description of venom-conducting canal development of fangs of pit viper *C. albolabris*.

OBSAH

1. ÚVOD	13
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	15
2.1. Historie výzkumu plazí dentice.....	15
2.2. Tabule normálního vývoje a výběr modelových a satelitních druhů pro výzkum.....	16
2.3. Fylogenetické pozadí práce, výběr a charakteristiky zkoumaných druhů.....	18
2.3.1. Gekkonidae – bazální skupina s plesiomorfními znaky v dentici.....	19
2.3.2. Toxicofera, skupina s bohatými dentálními adaptacemi.....	20
2.3.2.1. Varani, skupina s dentálními adaptacemi k predaci.....	21
2.3.2.2. Chameleoni, skupina s akrodonntní, heterodontní a monophyodontní denticí.....	22
2.3.2.3. Chamaeleolisové, druhy s malakofágně adaptovanou denticí.....	23
2.3.2.4. Zmijovití hadi, skupina s jedovými zuby.....	24
2.4. <i>Shh</i> a jeho známé funkce v zubním vývoji.....	24
3. CÍLE PRÁCE	26
4. MATERIÁL A METODIKA	27
4.1. Biologický materiál.....	27
4.1.1. <i>Paroedura pict.</i>	27
4.1.2. <i>Chamaeleo calypttratus</i>	28
4.1.3. <i>Anolis barahoe</i> a chamaeleolisové.....	29
4.1.4. <i>Varanus indicus</i> a <i>Varanus niloticus</i>	29
4.1.5. <i>Cryptelytrops albolabris</i>	30
4.2. Micro CT a faxitron X-ray zobrazovací metody.....	30
4.3. Rastrovací elektronová mikroskopie.....	30
4.4. Histologická analýza.....	30
4.5. <i>In situ</i> hybridizace.....	32
4.6. Imunohistochemická detekce apoptózy – TUNEL.....	37
4.7. Imunohistochemická detekce buněčné proliferace PCNA.....	38
4.8. Imunohistochemická detekce kolagenu I, II a fibronektinu.....	39

4.9. Imunohistochemická detekce cytokeratinů.....	40
4.10. Používaná terminologie.....	41
5. VÝSLEDKY.....	43
5.1. Vývoj zubů u modelového druhu plaza: zuby nulté a funkčních generací u <i>P. picta</i>	43
5.1.1. Popis funkční dentice.....	44
5.1.2. Vývoj uspořádání zubů v dentici.....	44
5.1.3. Embryonální vývoj zubů nulté generace.....	45
5.1.4. Osud zubů nulté generace.....	48
5.1.5. Vývoj funkčních zubů v průběhu embryonálního vývoje.....	48
5.1.6. Vývoj zubní báze funkčních zubů a vývoj ankylózy 46.....	50
5.1.7. Vývoj vaječných zubů.....	51
5.2. <i>Varanus indicus</i> : vývoj zubů nulté a funkčních generací.....	52
5.2.1. Popis první funkční generace zubů.....	52
5.2.2. Vývoj zubní lišty a orálních žláz.....	53
5.2.3. Vývoj zubů nulté generace.....	55
5.2.4. Vývoj zubů funkčních generací.....	57
5.2.5. Vývoj vaječného zubu.....	61
5.3. Vývoj dentice u <i>Chamaeleo calyptratus</i> : monofyodontie, akrodoncie a heterodontie.....	61
5.3.1. Popis funkční dentice.....	62
5.3.2. Vývoj uspořádání zubů v čelisti.....	64
5.3.3. Vývoj funkčních zubů: stádium pupene až zvonku.....	65
5.3.4. Mineralizace zubní korunky.....	66
5.3.5. Vývoj zubní báze a akrodonční ankylózy.....	67
5.4. Dentice chamaeleolisů: malakofágní adaptace, změny v dentici v postnatálním vývoji.....	69
5.4.1. <i>Anolis barahoe</i>	70
5.4.2. <i>Chamaeleolis barbatus</i>	71
5.4.3. <i>Chamaeleolis porcus</i>	73
5.4.4. <i>Chamaeleolis chamaeleonides</i>	74
5.4.5. <i>Chamaeleolis guamuhaya</i>	75

5.5. Vývoj jedových zubů a kanálku pro vedení jedu u chřestýšovce	
<i>Cryptelytrops albolabris</i> : role <i>Shh</i> , apoptózy a buněčné proliferace.....	76
5.5.1. Popis jedových zubů.....	77
5.5.2. Vývoj stádií jedových zubů před započatím	
mineralizace: exprese <i>Shh</i>	78
5.5.3. Invaginace vnitřního sklovinného epitelu.....	79
5.5.4. Exprese <i>Shh</i> v průběhu tvorby jedového kanálku.....	80
5.5.5. Role apoptózy v tvorbě jedového kanálku.....	80
5.5.6. Vývoj komunikačních otvorů jedového kanálku a role	
<i>Shh</i> v jejich morfogenezi.....	81
5.6. Diferenciace sklovinného orgánu a vývoj zubních hrbolků	
u šupinatých plazů: role <i>Shh</i> , buněčné proliferace, apoptózy	
a struktury sklovinného orgánu.....	81
5.6.1. Vývoj zubních hrbolků u gekona <i>P. picta</i> : exprese <i>Shh</i> ,	
buněčná proliferace a apoptóza.....	83
5.6.2. Exprese <i>Shh</i> , buněčná proliferace a apoptóza	
ve vývoji předmineralizačních stádií zubů <i>Ch. calyptratus</i>	86
5.6.3. Vývoj zubních hrbolků u chameleolise <i>Ch. porcus</i>	87
6. DISKUZE	89
6.1. Funkční dentice v liniích šupinatých plazů.....	89
6.2. Vývoj zubního vzoru.....	91
6.3. Vývoj zubů nulté generace.....	93
6.4. Osud zubů nulté generace.....	96
6.5. Vývoj zubů funkčních generací: diferenciace sklovinného orgánu.....	98
6.6. Mineralizace zubní korunky.....	100
6.7. Vývoj zubní báze.....	101
6.8. Vývoj a charakteristika ankylózy.....	103
6.9. Vývoj jedového kanálku, role <i>Shh</i> , buněčné proliferace a apoptózy.....	104
6.10. Diferenciace sklovinného orgánu u šupinatých plazů:	
role <i>Shh</i> , buněčné proliferace a apoptózy.....	107
6.11. Vývoj pokročilejších stádií zubního zárodku a vznik zubních	
hrbolků u šupinatých plazů: role <i>Shh</i> , buněčné proliferace,	
apoptózy a depozice skloviny.....	110

6.12. Durofágní adaptace dentice chamaeleolisů, změny v charakteristice dentice v průběhu života.....	114
7. ZÁVĚR.....	119
8. LITERATURA.....	123
9. PŘÍLOHY.....	i
9.1. Seznam příloh.....	i
9.1.1. Vývoj zubů u modelového druhu plaza: zuby funkčních a nulté generace u gekona <i>P. picta</i>	ii
9.1.2. Tabule normálního vývoje pro varany: varan mangrovový (<i>Varanus indicus</i>).....	xxxix
9.1.3. <i>Varanus indicus</i> : vývoj zubů nulté a funkčních generací.....	lxvi
9.1.4. Vývoj dentice u <i>Chamaeleo calyptratus</i> , monofyodontie, akrodoncie a heterodontie.....	lxxxii
9.1.5. Dentice chamaeleolisů: malakofágní adaptace, změny v dentici v postnatálním vývoji.....	xcí
9.1.6. Vývoj jedových zubů a kanálku pro vedení jedu u chřestýšovce <i>Cryptelytrops albolabris</i> : role <i>Shh</i> , apoptózy a buněčné proliferace.....	ci
9.1.7. Diferenciace sklovinného orgánu a vývoj zubních hrbolků u šupinatých plazů: role <i>Shh</i> , apoptózy a buněčné proliferace.....	cxiii

SEZNAM ZKRATEK

A. barahoeae – *Anolis barahoeae*

A. fragilit – *Anguis fragilis*

A. mississippiensis – *Aliator*

mississippiensis

Bmp - Bone morphogenic protein

BSA –hovězí sérový albumin

(„bovine seroalbumin“)

C. kandiana – *Cnemaspis candiana*

C. albolabris – *Cryptelytrops*

albolabris

depc H₂O – voda ošetřená diethyl

pyrokarbonátem

EDTA - kyselina

ethylendiamintetraoctová

(„ethylenediaminetetraacetic acid“)

EtOH - etanol

Fgf4 – „Fibroblast grow factor“

Ch. barbatus – *Chamaeleolis*

barbatus

Ch. calyptratus – *Chamaeleo*

calyptratus

Ch. chamaeleonides – *Chamaeleolis*

chameleonides

Ch. guamuhaya – *Chamaeleolis*

guamuhaya

Ch. viridanus – *Chalcides viridanus*

Ch. porcus – *Chamaeleolis porcus*

IDE – vnitřní sklovinný epitel („inner enamel epithelium“)

I. tuberculata – *Iguana tuberculata*

L. agilis – *Lacerta agilis*

L. viridis – *Lacerta viridis*

MABT - pufr z kyseliny maleinové

(„Maleic Acid buffer“)

mCT – mikro počítačová tomografie

(„micro Computed Tomography“)

ODE – vnější sklovinný epitel („outer enamel epithelium“)

PBS - fosfátový pufr („Phosphate Buffered Saline“)

PBT – fosfátový pufr s Tween 20

PEK – primární sklovinný uzel

(„primary enamel knot“)

PFA - paraformaldehyd

Ptc1 – transmembránový protein

Patched 1

Ptc2 – transmembránový protein

Patched 2

P. picta – *Paroedura picta*

P. regius – *Python regius*

SEK – sekundární sklovinný uzel

(„secondary enamel knot“)

Shh – „Sonic hedgehog“

SI – stratum intermedium

S. punctatus – *Sphenodon punctatus*

SSC – pufr z NaCl a citrátu sodného (“sodium saline-sodium citrate buffer”) citrate at pH 7.0.

Tgf-β1 – transforming growth factor

V. indicus – *Varanu indicus*

1. ÚVOD

Předložená disertační práce shrnuje první výsledky rozsáhlého projektu, jehož předmětem je srovnávací analýza ontogenetického vývoje a evoluce dentice plazů. Jde o téma, které je z více důvodů mimořádně aktuální. Prvním z nich je skutečnost, že na rozdíl od savců, jimž je věnována drtivá většina odontologických studií, jde o skupinu, která donedávna stála mimo zájem vývojových biologů. S ohledem na skutečnost, že jde o skupinu pokrývající většinu vývojové radiace amniotních obratlovců, je úroveň současných znalostí zcela nedostatečná a neumožňuje ani orientační srovnání vývojových specifíků základních taxonů. V posledním desetiletí se tento nedostatek ukázal být problémem skutečně kritickým. Molekulárně fylogenetické analýzy ukázaly totiž potřebu radikální přestavby dosavadních představ o fylogenezi celé skupiny, struktuře jednotlivých taxonů a jejich vymezení v pojmosloví fenotypových a vývojových specifíků. Potřebný datový aparát k uspokojivému vyřešení tohoto úkolu však z naznačených důvodů není k dispozici. V neposlední řadě je třeba připomenout aktuálnost základních vývojově biologických informací v kontextu nejdynamičtější součásti dnešní organismální biologie – evoluční vývojové biologie (EVO-DEVO), kde vývoj zubu a dentice představuje jeden z nejvýznamnějších modelových objektů. Předpokladem analýzy vývojových mechanismů a jejich fylogenetických přestaveb je zde spolehlivá základní informace o embryonální dynamice příslušných struktur u jednotlivých vývojových linií resp. modelových druhů, které je reprezentují. Nedostatečná znalost poměrů u základních taxonů amniotní radiace představuje pak překážku velmi závažnou.

Všechny tyto skutečnosti se staly vstupní motivací disertačního projektu. Jeho cílem bylo (a) vybrat vhodné modelové taxony reprezentující vývojové linie šupinatých plazů, ukazující kontrastní typy dentálních adaptací a které jsou relevantní z hlediska stávajících představ o fylogenetické struktuře šupinatých plazů, (b) v praxi ověřit použitelnost zvolených taxonů jako modelových druhů (dostupnost embryonálního materiálu a technických aspektů jeho zpracování, zohlednění možností laboratorního chovu apod.) a (c) pro tyto taxony získat vlastním výzkumem základní informace o stadiální embryonálního vývoje a specifíkách odonogeneze.

V rámci projektu jsem takto zhodnotil celkem 9 taxonů reprezentujících skupiny Gekkota, Chameleonidae, Iguanidae, Varanidae a Serpentes. K dnešnímu dni byla do stádia publikačního zhodnocení dopracována jen menší část provedených sledování, souborný přehled dosavadních výsledků poskytuje ovšem výsledková část této práce. Jejím základem jsou tři publikační výstupy: jedna publikovaná práce a dva rukopisy

zaslané do zahraničních periodik, v přílohách doplněné o nepublikovaná data, která se v současnosti chystají k publikaci. Experimentální základ práce se odvíjí od klasických histologických a imunohistochemických metod, rozšířených o micro CT a rentgenové zobrazující metody a aplikaci moderních molekulárních metod ve spolupráci s Dr. A. S. Tuckerové (Kings College London) a týmem Doc. M. Buchtové (ÚŽFG AV ČR Brno) pod vedením Profesora I. Horáčka (katedra zoologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova v Praze).

Strategickým cílem práce je zasazení odontologické resp. vývojově biologické informace o jednotlivých taxonech do fylogenetického kontextu, včetně identifikace jednotlivých odontogenetických specifik v pojmosloví orientace fylogenetické morfolokliny, t.j. rozlišení plesiomorfních resp. apomorfních charakteristiky ve vývoji plazích zubů. Nosnou částí dizertace tvoří histologické deskripce vývoje zubů jednotlivých taxonů reprezentujících jak bazální, tak korunové linie šupinatých plazů, doplněné o deskriptivní charakteristiky embryonálního vývoje u varana *Varanus indicus*, které nebyly doposud k dispozici. Dosažené poznatky mohou u většiny zkoumaných druhů sloužit jako spolehlivý podklad pro návazná zkoumání za využití moderních molekulárních metod.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. Historie výzkumu plazí dentice

Přestože výzkum specifík plazí dentice a její ontogeneze započal nejméně před dvěma sty lety s rozvojem histologických technik, počet relevantních publikací o tomto předmětu je překvapivě malý. Ve srovnání se savci, kde chrup je tradičně chápán jako jeden z nejdůležitějších znaků a výzkumu této problematiky byla průběžně věnována značná pozornost, zájem o plazí dentici byl donedávna omezen. Podrobnější srovnávací informace pokrývající alespoň zástupce nejvyšších taxonů jsou poměrně vzácné. Vývoj dentice u plazů byl v minulosti podrobněji zkoumán za využití tradičních histologických metod především u archosaurů linie diapsidních plazů (např. Owen, 1840-1845; Rathke, 1866; Röse, 1894a; Woederman, 1919a,b,c, 1921ab, Bolk, 1922a,b; Kvam, 1957, 1958a,b,c; Edmund, 1960, 1962, 1969; Poole, 1961; Miller, 1968; Westergaard et Ferguson, 1986, 1987, 1990). Na druhou linii diapsidních plazů, která tvoří většinu současných druhů plazů byla zaměřena také v minulosti pozornost, nicméně ne tak detailní. Vývojem dentice hatérií (Sphenodontia), sesterské skupiny šupinatých plazů, se zabýval Harrison (1901) a Westergaard (1986). Vývoji dentice šupinatých plazů (Squamata) se částečně věnovala klasická díla Owena (1840-1845) Bolka (1922a, 1922b), Woedermana (1919a,b,c, 1921ab) či Edmunda (1960, 1969). Vývoji zubů zástupců Gekkota, bazální linie šupinatých plazů, věnovali pozornost Ogawa (1977), Westergaard (1986) a Mohammed et al. (2002). Vývoj dentice u rodu Chalcids (Scincidae) patřícího do další bazálnější skupiny šupinatých plazů, která je sesterská skupině Toxicofera a Laterata byl popsán nedávno (Delgado et al. 2005). Vývoj dentice ve skupině Laterata byl pak soustředěn na rod *Lacerta* (Cooper, 1963; Hubert, 1970; Osborn, 1971; Westergaard, 1986, 1988). Pozornost vícero rodům byla věnována skupině Toxicofera, kde v rámci Iguania zkoumali zuby Leche (1893) a Röse (1893), v rámci Anguimorpha Westergaard (1986). Největší pozornost co se týče výzkumu ontogeneze dentice byla v rámci Toxicofera věnována zejména jedovatým hadům (Tomes, 1875, 1876; Bogert, 1943; Kochva, 1963; Edmund, 1969; Lake et Trevor-Jones, 1987, 1995). Nejedovatým hadům věnovala pak věnovala pozornost Buchtova et al. (2007). Speciální pozornost pak byla věnována vaječným zubům (např. Röse, 1984b; Martin, 1901; Woederman, 1919c; Smith et al., 1953). Informace o vývojových aspektech této široké skupiny jsou oproti archosaurům spíše kusé a jejich objem je proti objemu analogických srovnávacích dat u savců zcela zanedbatelný.

Tato situace se začíná měnit teprve v tomto desetiletí, nyní mnohdy i s ohledy k aktuálním úkolům identifikovat zúčastněné molekulárně-regulační mechanismy odontogeneze a jejich taxonová specifika. V současnosti tak v několika laboratořích světa probíhá hlubší výzkum vývoje lepidosaurních zubů s využitím histologických, mCT a rentgen zobrazovacích a imunohistochemických a in situ hybridizačních metod. Moderní techniky, které přinášející nové vhledy do vývoje plazích zubů se nicméně objevují teprve v posledních letech, v neposlední řadě díky technické náročnosti (syntéza specifických primerů apod.) a finanční náročnosti. Naše laboratoř ve spolupráci s Dr. A. S. Tucker publikovala jednu z prvních prací, kde byla využita metoda in situ hybridizace prostřednictvím které se detekuje exprese morfogenů (Zahradnicek et al., 2008). Následovali další podobné práce, které byly často rozšířené o funkční studie využitím selektivních inhibitorů (Vonk et al., 2008; Buchtová et al., 2008; Handrigan et Richman, 2010a,b; Handrigan et al., 2010; Richman et Handrigan, 2011). V těchto studiích byly použity druhy jako (*Elaphe guttata*, *Python sebae*, *Cryptelytrops albolabris*, *Pogona vitticeps*, *Eublepharis macularius*). Tyto druhy nejsou příliš vhodné jako modelové organismy vzhledem k jejich reprodukčním omezením nepřinášejícím dostatek embryologického materiálu skrze celý rok, nebo k vyšším finančním, prostorovým a chovatelským nárokům. Jsou však vhodné pro doplňkové studie jako satelitní druhy. Problémem podobných studií zůstává ovšem nestandardní metodika, neujasněná stadiální vývoje a z toho pramenící mylná interpretace molekulárních dat odrážející neznalosti histologického pozadí zubního vývoje – typicky se zde setkáváme např. s porovnáváním nestejných vývojových stadií zubů apod.

2.2. Tabule normálního vývoje a výběr modelových a satelitních druhů pro výzkum

Nezbytným předpokladem srovnávací analýzy a soustavného výzkumu vývojové biologie zkoumeného druhu je dokonalá informace o průběhu normálního vývoje daného druhu. Pro rutinní použití jsou tyto poznatky uspořádávány do tabulí normálního vývoje a sekvence jednotlivých vývojových stadií. Ty pak tvoří pozadí pro výzkum a do jisté míry nám zajišťují možnost mezidruhového srovnání a následnou interpretaci trendů v evoluci tělesných plánů v jednotlivých liniích obratlovců. Mezidruhové srovnání je možné pouze do určité míry, protože neexistují pravidla pro výběr znaků a jejich klasifikaci, kterými by se řídila tvorba tabulí normálního vývoje. Autoři vybírají znaky subjektivně a často se zaměřují pouze na některé tělní struktury a jiné opomíjí. Výsledkem je, že tabule vývoje jsou pak jen omezeně srovnatelné. Jako cesta

k odstranění těchto překážek byl navrhnout systém kategorizace stádií pro obratlovce (Werneburg, 2009). Bohužel dosud, pokud je mi známo nebyl na konkrétní modelové organismy aplikován, přinejmenším proto, že jeho odpovídající použití je z více důvodů velmi náročné.

Opěrné informace o vývojové biologii se odvíjí od podrobných výzkumů modelových druhů. Z celkově asi 58 000 známých druhů obratlovců splňují dnes v plném rozsahu předpoklady universálně použitelného modelového taxonu pouze 4 modelové druhy (*Danio rerio*, *Xenopus laevis*, *Gallus domestica*, *Mus musculus*), jejichž tabule normálního vývoje byly opublikovány v druhé polovině dvacátého století vždy s určitým časovým rozpětím (Hamburger et Hamilton, 1951; Nieuwkoop et Faber, 1967; Theiler, 1972; Kimmel et al., 1995). Tyto druhy jsou vesměs až na kuře odvozené, nebo specializované a často nevhodné pro poznání vývoje plesiomorfních znaků v rámci velkých skupin obratlovců. Nedostatečný počet modelových organismů tvoří omezení, které nám neumožňuje odhalit pravděpodobně evolučně vývojové cesty k obrovskému bohatství fenotypů obratlovců. Pro pochopení evoluce tělesných plánů obratlovců tedy vyvstává potřeba rozšířit počet modelových druhů na nesespecializované druhy z bazálních skupin obratlovčích linií mající větší množství plesiomorfních znaků s doplněním o široké spektrum satelitních druhů z bazálních i korunových skupin se svými apomorfiemi. Tyto satelitní druhy nemusí splňovat přísné charakteristiky modelových druhů, jako jsou malá tělesná velikost, krátký generační čas, rychlý a stereotypní vývoj, časná separace zárodečné buňčkové linie od somatické, dobrá množivost, relativní odolnost vůči nákazám a snadné držení v laboratorní kultuře (Bolker, 1995; Bolker et Raff, 1997). Od publikování vývojové tabule ryby *Danio rerio* (Kimmel et al., 1995) uplynulo více než desetiletí a tak přirozeně vyvstala potřeba zkoumat další nový druh. Vývojoví biologové se poprvé obrátili ke skupině diapsidních plazů a navrhli jako nový modelový organismus šupinatého plaza anolise *Anolis sagrei* (Sanger et al., 2008) a opublikovali tabuli normálního vývoje tohoto druhu (Sanger et al., 2008), jehož genom byl v zápětí osekvenován. Nicméně tentokrát vědci opět sáhli po druhu, který se sice poměrně dobře množí, ale je specializovaný a součástí korunové skupiny Iguania. Pro poznání vývoje plesiomorfního stavu znaků je tedy nevhodný podobně jako myš u savců či *Danio rerio* u Actinopterygii. Tento druh je tedy z pohledu EVO-DEVO vhodný spíše jako satelitní. Ve stejné době naše pracovní skupina chystala navrhnout jako potenciální modelový druh plaza gekona *Paroedura picta*, který patří do skupiny Gekkota, která je vedle Dibamidae bazální v rámci Squamata. Nicméně stejný záměr měla japonská

skupina, která nás předběhla a opublikovala tabuli normálního vývoje s akcentem na vývoj končetin (Noro et al., 2009). Vývoj ostatních tělesných struktur však byl téměř opominut a bude tedy do budoucna nutná revize a rozšíření tabulky o popis vývoje dalších tělních struktur, zejména hlavy a oblasti krku. Tento druh je také v současnosti využíván jako modelový druh pro ekologické studie (Brillet, 1991, 1993).

Tabule normálního vývoje nevznikaly a nevznikají pouze v souvislosti s ustanovením modelových druhů, jejich spektrum je mnohem bohatší a popsané druhy se dají v některých případech použít jako satelitní druhy. U plazů byly publikovány tabule normálního vývoje například, u želv *Chelydra serpentina* (Yntema, 1968), u archosaurů *Alligator mississippiensis* (Murray et al., 1990), *Crocodylus porosus* (Magnusson et Taylor, 1980) and *Crocodylus niloticus* (Peterka et al., 2010) u šupinatých plazů z čeledi Scincidae *Hemiergis spp.* (Shapiro, 2002), z Gekkota již zmíněná *Paroedura picta* (Noro et al., 2009), *Eublepharis macularius* (Wise et al., 2009), z Iguania *Agama impalearis* (Mouden et al., 2000), *Chamaeleo lateralis* (Blanc, 1974), *Calotes versicolor* (Muthukkaruppan et al., 1970), *Liolaemus tenuis* (Lemus et al., 1981) a zmíněný *Anolis sagrei* (Sanger et al., 2008), z hadů *Thamnophis sirtalis* (Zehr, 1962), *Naja kaouthia* (Jackson, 2002a) a *Python sebae* (Boughner et al., 2007), z Anguimorpha: *Anguis fragilis* (Nicolas, 1904) and z Lacertidae: *Podarcis vivipara* (Dufaure et Hubert, 1961) či *Podarcis agilis* (Rieppel, 1994). Nedílnou součástí této práce je tabule normálního vývoje varana *Varanus indicus* (viz příloha 2 - Gregorovicova et al., submitted), která sloužila jako nutné pozadí pro popis vývoje dentice v průběhu ontogenze u tohoto druhu.

2.3. Fylogenetické pozadí práce, výběr a charakteristiky zkoumaných druhů

Lepidosauria, skupina s více než 8 000 recentními druhy (Zug et al., 2001) zahrnuje dva hlavní taxony: Shenodontia čítající dva recentní druhy a Squamata. Hlavní linie šupinatých plazů se pravděpodobně oddělily během krátké periody v triasu asi před 200 miliony lety (Albert et al., 2008), současnou diverzitu tvoří nicméně především moderní skupiny s poměrně nedávnou radiací, dokládající ovšem značnou rozmanitost morfologických, behaviorálních a ekologických adaptací (Zug et al., 2001; Pianka et Vit, 2003; Pough et al., 2004). O fylogenezi a klasifikaci šupinatých plazů byly dlouho vedeny spory, v devadesátých letech se stabilizovalo členění na Iguania a Scleroglossa. V poslední době došlo k radikální změně názorů na fylogenetické vztahy mezi skupinami šupinatých plazů na základě robustních molekulárních dat (Vidal et Hedges, 2004, 2005, 2009). Molekulární data ukazují, že původní rozdělení šupinatých plazů na Iguania

a *Scleroglossa* na základě morfologie jazyka nevymezuje monofyletické taxony. Bazální divergenci představuje skupina beznohých plazů Dibamidae, následované skupinou Gekkota (Vidal et Hedges, 2005, 2009). Tento nový fylogenetický náhled je podporován dentálními znaky. Obě skupiny mají dva vaječné zuby v premaxile, zatímco ostatní šupinatí plazi mají jen jeden vaječný zub a jsou spojováni ve velkou skupinu Unidentata. Další vyšší skupina obsahuje Xanthusidae, Cordylidae, Scincidae. Jejich sesterská skupina se dělí na Laterata zahrnující Teidae, Lacertidae a Amphisbaenidae a Toxicofera, již charakterizuje přítomnost jedových orálních žláz. Toxicofera se rozpadají na Anguimorpha, Serpentes a Iguania (Vidal et Hedges, 2005, 2009; Townsend et al., 2004; Whiting et al., 2003). Základním momentem jednotlivých divergencí jsou apomorfie bezprostředně spojené s technikou lovu kořisti resp. organizačními dispozicemi potravní biologie, v neposlední řadě i specifikách úpravy dentice.

2.3.1. Gekkonidae – bazální skupina s plesiomorfními znaky v dentici

Při hledání bazálního taxonu s plesiomorfním stavem zubních znaků jsme se obrátili k druhé nejbazálnější linii šupinatých plazů, ke gekonům (Gekkota) (Vidal et Hedges, 2005; Wiens et al., 2010). Nejbazálnější beznozí Dibamidae postrádají charakteristiky modelových organismů, jsou vzácní, nedostupní a pro systematické bádání tudíž nevhodní. Dentice gekonů, představující předpokládaný původní stav u lepidosaurních plazů, je charakterizována homodontními řadami malých uniformních konických až cylindrokonických zubů s pleurodontním připojením k čelistním kostem. Typem spojení je ankylóza, spoj mezi dentinovou zubní bází a čelistní kostí je tedy mineralizovaný. Takovýto zub má malou korunku krytou sklovinou a velkou dentinovou zubní bází. Gekoni podobně jako Dibamidae mají v horní čelisti dva vaječné zuby, což je interpretováno jako plesiomorfní stav (Vidal et Hedges, 2009). Charakteristickým znakem zubů gekonů Gekkota je rozdělení špičky zubu na dva hrbolky (Sumida et Murphy, 1987). Jde o znak proti presumtivně bazální konfiguraci (jednoduchý konický zub) odvozený, vyskytuje se nicméně u různých dalších forem napříč spektrem dalších korunových skupin. Často je přítomný pouze náznak tvorby těchto dvou hrbolků v podobě nízkých sklovinných hřebenů. Podobná bikuspidní korunka se vyskytuje i u některých ryb (Streelman et al., 2003) a červorů (Sumida et Murphy, 1987) a některých žab (Peyer, 1968). Dvojhrbolkové uspořádání vzniklo tedy v průběhu evoluce obratlovců několikrát konvergentním vývojem. Pro naše zkoumání jsme vybrali již výše zmíněného madagaskarského gekona *Paroedura picta* z čeledi Gekkonidae.

Gekoni rodu *Paroedura* jsou monofyletickou skupinou rozšířenou na Madagaskaru a Komorských ostrovech (Nussbaum et Raxworthy, 2000). V kladogramu se nachází na bázi Afro-Malgašského kladu (Kluge et Nussbaum, 1995). Jejich apomorfiemi jsou koosifikace kůže na hlavě a pod ní ležících kostí, splynulé nasální kosti, párové parietální kosti, neperforovaný stapes a absence epibranchiale hyoidního oblouku (Dixon et Kroll, 1974). *Paroedura picta* je xerothermní pozemní druh (Nussbaum et Raxworthy, 2000). Je velmi nenáročná co se týče chovu. Její rozmnožování probíhá v průběhu celého roku. Vajíčka klade poměrně brzy po narození. Klade 2 vejce zhruba každých 10 dní, v závislosti na teplotě a výživě (Kratochvíl, osobní sdělení). Po naklazení vejce může být zárodek ve velmi raném stádiu neuruly (osobní pozorování) a je tedy vhodná i pro studium neurulace a procesu migrace neurální lišty. In ovo vývoj zárodku trvá 60 dní při 28°C, nebo 50 dní při 30°C. Skořápka gekona je kalcifikovaná (Kratochvíl et al., 2006), což je důležitá podmínka pro in ovo experimenty. Ty jsou obtížně proveditelné u vajec s kožovitou skořápkou, jejich obsah při narušení skořápky samovolně vytéká. Další výhodou *P. picta* je, že inkubace vajec probíhá v suchu, riziko zplísnění a infekce je tedy minimalizováno. Další výhodou těchto vajec je, že po naklazení nejsou slepená dohromady a nevyvstávají tudíž potíže s oddělováním vajec od sebe, jak je časté například u hadů, kteří mají kožovitou skořápku a po naklazení se slepují navzájem k sobě. První in ovo experimenty u tohoto druhu zkoušel Noro et al. (2009) a pak naše pracovní skupina.

Základní deskripce zubního vývoje, která tvoří pozadí pro další set vývojově založených článků, již byla zaslána do časopisu *Journal of Anatomy* (viz příloha 1 - Zahradnicek et al., submitted). V návaznosti na tuto deskripci se připravuje ve spolupráci s pracovištěm v Brně a Londýně článek o mechanismu vzniku zubních hrbolků, založený na poznacích dynamiky buněčné proliferace, apoptózy, exprese morfogenu *Shh* a přítomnosti molekul extracelulární matrix v hvězdicovitém retikulu.

2.3.2. Toxicofera, skupina s bohatými dentálními adaptacemi

V průběhu evoluce dentice šupinatých plazů vznikla u odvozenějších skupin poměrně široká paleta tvaru zubů, jejich uspořádání, zubní obměny, připojení k čelistním či patrovým kostem odlišných od stavu přítomného u gekonů. V několika skupinách se vyvinula konvergentně heterodoncie jako adaptace na karnivorii či durofagii a ve skupině Acrodonta došlo k redukci počtu zubních generací až na jednu. Zaměřili jsme se na charakteristiky vývoje dentice u chameleonů, chamaeleolisů, varanů a hadů

z velké skupiny Toxicofera. Scincomorpha, sesterská skupina k linii Episquama (zahrnuje Laterata a Toxicofera) a skupina Laterata nebyly do výzkumu zařazeny, jelikož informace o struktuře dentice a výměně zubů u r. *Chalcides* (Scincomorpha) a *Lacerta* (Laterata) jsou k dispozici ve více studiích (Cooper, 1963; Hubert, 1970; Osborn, 1971; Westergaard, 1986, 1988; Delgado et al., 2005).

2.3.2.1. Varani, skupina s dentálními adaptacemi k predaci

Ze skupiny Anguimorpha jsme se zaměřili na Varanidae, další skupinu s heterodontní denticí, která čítá v současnosti 73 známých žijících druhů (Baverstock et al., 1993; Koch et al., 2010). Varani žijí v Austrálii, Jihovýchodní Asii a Africe. Její zástupci jsou terestričtí, saxikolní, semiarborikolní, arborikolní či akvatičtí, obývají široké spektrum habitatů od pouští, přes savany po tropické lesy a mangrovové bažiny. Jejich morfologie je mezidruhově konzervativní a velikost těla se pohybuje od 0,2 m u *Varanus brevicauda* (Pianka, 1994) po 3 m dlouhého *V. komodoensis* (Auffenberg, 1981). Varani mají silné nohy, dlouhý krk a ocas, jsou to výborní běžci, umí šplhat či plavat. Jejich specializací je hluboce rozeklaný jazyk (Smith, 1986), velké silné drápy. Mezi jejich apomorfie patří tupé a okrouhlé rostrum, přítomnost široké crista tuberalis, která zahrnuje paroccipitální výběžky, absence vnějšího kontaktu mezi maxillou a frontale, anteriorně umístěný spheno-occipitální hrbolek a ventrálně zahlé dentale (Conrad, 2008; Norell, 2008). Dalším specifickým znakem, který je přítomen pouze u varanů a vymřelých mosasaurů, varanům bezprostředně příbuzných, je přítomost plicidentinu (Payer, 1968). Jsou to predátoři až vrcholní predátoři (Pianka 1994; Losos et Greene, 1988), jen jeden druh *V. olivaceus* je frugivorní (Auffenberg, 1988). Varani mají specializovanou dentici se znaky heterodoncie, která byla nejvíce rozvinuta u durofágně adaptovaných druhů, mezi něž patří *V. niloticus* (Rieppel et Labhardt, 1979) a *V. exanthematicus* (Schmidt, 1919). Zuby jsou k čelistním kostem připojeny pleurodontně. Pro náš výzkum jsme vybrali v minulosti dostupný indonézský druh *Varanus indicus*. Tento druh postrádá sexuální dimorfismus, žije v mangrovech a je dobře adaptovaný na pobyt ve slané vodě. Živí se bezobratlými, obratlovci, jejich vejci a mršinami (Pianka et King, 2004). Klade 10 vajec s kožovitou skořápkou (McCoid, 1993; Velenský, osobní sdělení), které se líhnou po 180-200 dnech (Velenský, osobní sdělení). Dentice tohoto druhu obsahuje v distální části čelistí velké labio-linguálně zploštělé dýkovité zuby přizpůsobené ke karnivorii. U *V. indicus* jsme sledovali charakteristiku vývoje zubní lišty, zubů nulté a funkčních generací, a orálních žláz.

2.3.2.2. Chameleoni, skupina s akrodonní, heterodontní a monophodontní denticí

Chameleoni jsou vysoce specializovaní plazi s heterodontní denticí a specifickým charakterem vývoje uspořádání zubů, které jsou akrodonně připojeny k čelistním kostem. V dentici mají jedno až sedmihrbolkové zuby a počet zubních generací se redukoval u recentních druhů až na jednu, stejně jako u distálnějších zubů agam (mesiální jsou obměňovány a jsou pleurodonně připojeny k čelistním kostem) (Edmund, 1960). Chameleoni tvoří spolu s agamami monofyletickou skupinu Acrodonta patřící do velké skupiny Iguania (Estes et al., 1988; Townsend et Larson, 2001). Čeleď Chamaeleonidae vznikla asi před 100 – 120 miliony lety v Aficko-Madagaskarské oblasti. V současnosti je rozšířena v Africe, Madagaskaru a přilehlých ostrovech, jižní Evropě a na blízkém východě (Necas, 1999). Mezi důležité znaky definující tuto skupinu patří kromě typu specializované dentice například zygodaktylie, nezávisle se pohybující oči, balistický jazyk, který může být delší než je délka těla a u arborikolních druhů uchopovací ocas (Necas, 1999). Většina těchto adaptací je v přímé korelaci s jejich potravní strategií, která je typu sit and wait (Necas, 1999). Pro náš výzkum jsme zvolili nejčastěji rozmnožovaného a nejdostupnějšího chameleona *Chamaeleo calyptratus*, který je endemitem jihozápadní oblasti Arabského poloostrova. Živí se hmyzem, malými obratlovci, listy, květy a ovocem. Dospívá brzy, je oviparní a vajíčka klade 20-30 dní po oplození. Ta mají kožovitou skořápku a jejich počet ve snůšce je 12 – 85 (nejčastěji 30 – 40) (Necas, 1999). Po naklazení vajec jsou embrya ve stádiu gastruly. Vývoj gastruly se po naklazení zastavuje na 60 – 75 dní (Andrews, 2008). Celková doba vývoje od naklazení vajec po vylíhnutí je kolem 200 dní za předpokladu střídání teploty v průběhu dne mezi 20 – 30°C (Necas, 1999). Doba vývoje je jako u jiných plazů korelována s teplotou prostředí. V průběhu vývoje v rámci jedné snůšky inkubované ve stejných podmínkách jsem pozoroval poměrně velkou variabilitu mezi embryi ve stupni vývoje. Tento druh jsme zvolili díky jeho vlastnostem a dobré dostupnosti jako satelitní model pro systematický výzkum vzniku heterodoncie, monofyodoncie, akrodoncie a od většiny plazů částečně odlišného typu vzniku uspořádání zubů v čelistech. Zde uveřejněná deskripce vývoje zubů chameleona tvoří základ pro manuskript, který je ve fázi dokončování. Bazální deskripce je zde doplněna o analýzu exprese *Shh*, buněčné proliferace a apoptózy. Funkční studie byla zaměřena na inhibici receptoru pro *Shh in ovo*.

2.3.2.3. Chamaeleolisové, druhy s malakofágně adaptovanou denticí

Další zajímavou skupinou v rámci Iguania je rod *Anolis* ze skupiny Polychrotinae čítající v současnosti kolem 370 druhů (Poe, 2004). Rod *Anolis* se stal díky své historii modelem pro studium adaptivní radiace a jak bylo výše zmíněno byl navržen jako potenciální modelový druh obratlovce pro vývojovou biologii (Schluter, 2000; Sanger et al., 2008). Anolisové žijí v karibské oblasti. Jsou mezi nimi druhy terestrické, arboreální i akvatické (Schwartz et Henderson, 1991). V našem výzkumu jsme se zaměřili na skupinu anolisů z Kuby a Hispanioly, které jsou na základě morfologie oddělovány do odlišného rodu *Chamaeleolis*. Nicméně molekulární data ukazují, že tato klasifikace není oprávněná, a že uvedené formy jsou vnitřní skupinou rodu *Anolis* s neblížším vztahem k druhu *Anolis barahonae* (Hass et al., 1993), kterého jsme vybrali jako referenční druh se znaky v dentici původními pro tento insektivorní, saurivorní a částečně fruktivorní rod. V této práci používáme pro lepší orientaci latinský název *Chamaeleolis*. Chamaeleolisové jsou kryptičtí, pomalí s krátkýma nohama (Wilson, 1957; Beuttell et Losos, 1999). Jejich potravní strategie je typu sit and wait. Hlavu mají mohutnou, zadní část lebky vybíhá v přílbici a dentice je u dospělých molariformní (Estes et Williams, 1984; Schwartz et Henderson, 1991). Zuby jsou obměňovány v průběhu života a jsou pleurodontně připojeny k čelistem a k patrovým kostem (Estes et Williams, 1984; Mahler et Kearney, 2006). Přizpůsobení na lebce a dentici chamaeleolisů jsou zjevně součástí adaptací k malakofágnii (Estes et Williams, 1984; Rodriguez-Schettino, 1999). Morfologie zubů chamaeleolisů je odlišná nejen mezi druhy ale i mezi věkovými kohortami (Estes et Williams, 1984), což pravděpodobně koreluje s potravními preferencemi měnícími se v průběhu života. Chamaeleolisové kladou po jedno vejci s kožovitou skořápkou a jejich vývoj trvá zhruba dva měsíce (Holářová, osobní sdělení).

V našem výzkumu jsme se zaměřili na mezidruhové rozdíly charakteristik dentice čtyř známých druhů chamaeleolisů z pěti a jim příbuznému druhu *A. barahonae* v rámci první funkční generace zubů a funkční generace plně vzrostlých dospělých jedinců. Výsledky výzkumu umožnily formulovat hypotézy o příbuznosti jednotlivých druhů chamaeleolisů a stupně malakofágního přizpůsobení v rámci jednotlivých druhů a jejich věkových kohort. Mechanismus vzniku dikonodontních a trikonodontních zubů chamaeleolisů jsme zkoumali jen okrajově díky nedostupnosti embryologického

materiálu, nicméně i tento okrajový výzkum poukázal na důležité aspekty vývoje zubních hrbolků u plazů.

2.3.2.4. Zmijovití hadi, skupina s jedovými zuby

Dalším stěžejní skupinou našeho výzkumu byli hadi. Hadi mají nejistý fylogenetický původ o který se dlouhá léta vedou spory. Nová molekulární studie staví hady s nejistou podporou na bázi Anguimorpha či mezi Anguimorpha a Iguania (Vidal et Hedges, 2009). Zaměřil jsem se na jedovaté Viperidae, kteří jsou bazální skupinu moderních hadů Cenophidia. Viperidae, kteří vytvořili nezávisle na Elapidae svůj jedový aparát (Fry et al., 2008) obsahují asi 270 druhů (McDiarmid et al., 1999). Hlavní charakteristikou Viperidae je nejvíce sofistikovaný jedový aparát mezi hady, skládající se z jedových zubů s uvnitř uzavřeným kanálkem pro vedení jedu. Jedové zuby jsou umístěné na pohyblivé maxille, takže výsledkem jsou rotující zuby, které v klidu při zavřených čelistech leží podél střechy ústní dutiny a při útoku se s rotací maxilly napřimují. Tento sklopný systém umožnil zmijovitým vyvinout velké zuby, díky kterým jsou schopni zolat poměrně velkou kořist (Pough et Groves, 1983). K jedovým zubům je pak připojen vývod mohutné tlustostěnné jedové žlázy (Kochva, 1978; Mackessy, 1991). Viperidae zahrnuje bazální rod *Azemiops* a jemu sesterskou skupinu Crotalinae a odvozenější skupinu Viperinae (Wüster et al., 2008). Pro naše odontologická zkoumání jsme se zaměřili na skupinu Crotalinae, která má blízký vztah k bazálnímu rodu *Azemiops* a vybrali chovatelsky nejdostupnější stromový a živorodý druh *Cryptelytrops albolabris* (v publikaci označený pod starším názvem *Trimeresurus albolabris*) žijící v jihovýchodní Asii. Jeho potravní strategie je typu sit and wait (Cundall, 2002). Jako ostatní druhy rodu je euryfágní, což znamená že se živí endotermními a ektotermními obratlovci a bezobratlými (Mori et al., 1989). V našem zkoumání jsme se zaměřili na mechanismus vývoje jedového kanálku, kde jsme zohlednili funkci *Shh*, buněčné proliferace a apoptózy. Tato data byla již publikována (viz příloha 6 - Zahradnicek et al. 2008). Výzkum vývoje zubů bazálních hadů Haenophidia jsem do dizertační práce nezahrnul, jelikož je jedním z hlavních tématů spolupracující laboratoře Doc. Buchtové.

2.4. *Shh* a jeho známé funkce v zubním vývoji

Sonic hedgehog (*Shh*) je jeden z morfogenuů majících klíčovou roli ve vývoji různých částí těla včetně zubů (Chuong et al., 2000). V zubech plazů je jeho exprese omezena na epiteliální buňky vyvíjejícího se zubního zárodku od stádia pohárku po

pozdější stádia, kdy dochází k diferenciaci ameloblastů (Buchtova et al., 2008, Zahradnicek et al., 2008, Handrigan et Richman, 2010a). Bylo ukázáno, že *Shh* má mitogenní funkci a může být zodpovědný za lokalizovanou buněčnou proliferaci pozorovanou v průběhu zubního vývoje myši (Cobourne et al., 2001). Podobně u plazů jsme poukázali na jeho pravděpodobnou mitogenní funkci (Zahradnicek et al., 2008). Experimenty na myších ukázaly, že ektopické přidání proteinu SHH v časných stádiích odontogeneze může vést k tvorbě ektopických zubních pupenů (Hardcastle et al., 1998). Naopak ztráta exprese *Shh* vede k zastavení vývoje epiteliálního pupenu (Cobourne et al., 2001). U plazů dochází k expresi *Shh* až ve stádiu pohárku a k zastavení vývoje pupenu při blokaci *Shh* dráhy nedochází. Sonic hedgehog také hraje důležitou roli v pozdějším vývoji v přežívání buněk u myši a je také jedním ze signálních faktorů, který je exprimován ve sklovinných uzlech (Vaahtokari et al., 1996; Cobourne et al., 2001). Tato role byla nepřímo potvrzená i u plazů (Zahradnicek et al., 2008; Handrigan et Richman, 2010a). Ztráta *Shh* signalizace ve vyvíjejících se zubech vede ke ztrátě polarizace a organizace ameloblastů a odontoblastů. To indikuje centrální roli *Shh* ve vývoji vnitřního sklovinného epitelu a přilehlé tkáně (Dassule et al., 2000). Tyto znalosti nám poskytují silné pozadí pro výzkum vývoje zubů u plazů. Exprese *Shh* byla popsána ve stádiu pohárku a zvonku ve vnitřním sklovinném epitelu a buňkách střední vrstvy sklovinného orgánu u *Python regius* (Buchtova et al., 2008; Handrigan et Richman, 2010a), *Cryptelytrops albolabris* (Zahradnicek et al., 2008) a *Eublepharis macularius* (Handrigan et Richman, 2010a). V této dizertační práci jsem zohlednil funkci *Shh* při diferenciaci sklovinného orgánu a vzniku zubních hrbolků u *P. picta* a kanálku v jedových zubech *C. albolabris* (viz příloha 6 – Zahradníček et al., 2008)

3. CÍLE PRÁCE

1. Vybrat vhodné modelové taxony reprezentující vývojové linie šupinatých plazů, které ukazující kontrastní typy dentálních adaptací, a které jsou relevantní z hlediska stávajících představ o fylogenetické struktuře šupinatých plazů.
2. Vpraxi ověřit použitelnost zvolených taxonů jako modelových druhů (dostupnost embryonálního materiálu a technických aspektů jeho zpracování, zohlednění možností laboratorního chovu apod.).
3. Popsat embryonální vývoj u taxonů u nichž nebyla publikována tabulka normálního vývoje alespoň v rámci rodu.
4. Popsat základní charakteristiky vývoje dentice vybraných taxonů tradičními histologickými metodami.
5. Popsat mechanismus vývoje jedových zubů u zmijovitých hadů a zubních hrbolků u *P. picta* za použití moderních metod identifikace exprese *Shh*, buněčné proliferace a apoptózy.
6. Popsat změny v charakteru dentice v postnatálním vývoji kubánských chamaeleolisů a blízkce příbuzného druhu *Anolis barahoeae*.
7. Výsledky vývoje zubů zohlednit v rámci stávajících představ o fylogenetických vztazích linií šupinatých plazů.

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Biologický materiál

4.1.1. *Paroedura picta*

Pro výzkum bylo použito 270 embryí *P. picta* v různém stádiu vývoje, od naklazení vajec po vylíhnutí. Embrya jsme dostali darem od pracovní skupiny Dr. Lukáše Kratochvíla (katedra ekologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze). Pro popis vnější morfologie funkční dentice jsme použili dvě mláďata krátce po vylíhnutí a dva dospělé jedince. Velká část materiálu byla zpracována při zjišťování stupně variability ve vývoji tohoto druhu (100 embryí) a efektu rozdílných teplot na rychlost vývoje embryí. Tato data získaná ve spolupráci s Mgr. Zuzanou Starostovou Ph.D (katedra zoologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy) zde nerozebírám, jsou ve stádiu zpracování. Dalších 60 embryí bylo použito na experimenty s tkáňovými kulturami a in ovo experimenty, které se týkaly zablokování exprese morfogenů jako jsou *Shh*, *Fgf4*, *Tgf β 1*. V průběhu těchto experimentů jsme se potýkali s vysokou úmrtností embryí ve vajíčku, stagnací ve vývoji u tkáňových kultur a následným odumřením tkáně, tedy dosud se nám nepodařilo se nám získat dostatek dat pro publikaci. Do budoucna plánujeme další funkční experimenty a vyvinutí nového postupu kultivace, která by byla specifická a funkční pro plazí tkáně, které se zdají býti ve svých nárocích na vnější podmínky zcela odlišné od kuřecích či myších kultur. Sedmdesát embryí od 14. dne po naklazení po 60. den inkubace jsme použili pro základní popis vývoje dentice tohoto druhu. Jako základ jsme použili vlastní systém třídění embryí na základě vybraných znaků. Později jsme náš systém převedli na publikovaný systém třídění embryí *P. picta* japonskou skupinou (Noro et al., 2009). Tato embrya byla inkubována při 28°C v suchém klimaboxu. Dalších 40 embryí bylo použito pro detekci exprese morfogenů a imunohistochemickou detekci apoptózy, buněčné proliferace, kolagenu I a II a fibronektinu, proteinů typických pro extracelulární matrix savčího hvězdicovitého retikula (Thesleff et al., 1981; Webb et al., 1998). Embrya byla usmrcena anestetikem MS222 a následně fixována ve 4% PFA nebo v kyselém alkoholu přes noc. Použití mladí a dospělí jedinci, kteří byli fixováni v 70% EtOH, uhynuli přirozeně a pocházeli ze sbírek pracovní skupiny Dr. Lukáše Kratochvíla (Katedra ekologie, Přírodovědecká fakulta UK).

4.1.2. *Chamaeleo calyptratus*

Pro výzkum vývoje dentice chameleona jemenského (*Ch. calyptratus*) jsme použili 27 embryí pro histologická barvení, imunohistochemickou detekci apoptózy, buněčné proliferace, cytokeratinů a detekci exprese *Shh*. Při určování stádií jsme použili publikovanou tabuli normálního vývoje chameleona *Chamaeleo lateralis* (Blanc, 1974). V průběhu odebírání vajec jsme zjistili značné rozdíly ve stupni vývoje u stejně starých embryí v rámci jedné snůšky, která byla inkubována za stejných podmínek. Starší embrya byla často na stejném či nižším stupni vývoje než embrya mladší a naopak. Chameleony jsme získali ze dvou zdrojů (CH1 – CH20 ze ZOO Brno a CHAM-AL1 - CHAM-AL7 od firmy Tortuga s.r.o.). Oba chovatelé inkubovali vejce v odlišných podmínkách, což se také odrazilo na odlišném stupni vývoji ve stejný čas od naklazení vajec. Vzhledem k nedostatkům použité publikované vývojové tabule (Blanc, 1974) jsme doplnkově použili pro kategorizaci určení stádií hmotnost embryí. Pro přehled přikládám tabulku s hmotností embryí a určením jejich stadiality, kterou jsme pak použili při popisu vývoje dentice chameleona. Použitá embrya byla fixována přes noc v 4% pfa. Doplnkově pro zobrazení charakteru dentice a vývoje jejího uspořádání jsme použili jednoho mladého jedince a jednoho dospělého jedince, kteří přirozeně zemřeli a byli darem of Jana a Matěje Bošтікových. Tato embrya byla zamražena a teprve později před použitím fixována v 70% etanolu.

Poř.číslo	Stáří v týdnech	váha v g	stádium (Blanc, 1974)
CH 1	5	0,1197	34
CH 2	6	0,1083	35
CH 3	7	0,2238	37
CH 4	8	0,2515	39
CH 5	9	0,2628	40
CH 6	10	0,1934	40
CH 7	11	0,2401	40
CH 8	12	0,4161	41
CH 9	13	0,4245	41
CH 10	14	0,4928	41
CH 11	15	0,6626	41

CH 12	16	0,7530	42
CH 13	17	0,7563	42
CH 14	18	0,8234	42
CH 15	19	0,7309	42
CH 16	20	0,6418	43
CH 17	21	0,8008	43
CH 18	22	0,8433	43
CH 19	23	0,7079	43
CH 20	24	1,0004	44
CHAM-AL1	15	0,196	32
CHAM-AL2	15	0,198	32
CHAM-AL3	16	0,235	37
CHAM-AL4	20	0,370	40
CHAM-AL5	16	0,500	41
CHAM-AL6	24	0,720	43
CHAM-AL7	26	1,300	44

4.1.3. *Anolis barahoe* a *chamaeleolisové*

Pro studium charakteristik dentice anolisů druhů *A. barahoe*, *Ch. porcus*, *Ch. barbatus*, *Ch. chamaeleonides* a *Ch. guamuhaya* jsme použili uhynulé jedince těsně před vylíhnutím s první funkční generací zubů a uhynulé dospělé jedince. Od každého druhu jsme použili jedno embryo a jednoho dospělého jedince, kteří byli dlouhodobě fixováni v 70% etanolu a byli součástí sbírek Mgr. Veroniky Holářové (katedra zoologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy). Pro výzkum vývoje zubních hrbolků se nám také podařilo získat dvě embrya *Ch. porcus*, která byla stará 30 dní a byla tedy v polovině svého vývoje. Tato embrya byla usmrcena anestetikem MS222 a fixována přes noc ve 4% PFA.

4.1.4. *Varanus indicus* a *V. niloticus*

Druh varana *V. indicus* jsme použili pro vytvoření tabulky normálního vývoje a následného popisu vývoje jeho dentice. Použili jsme dvě snůšky dohromady se 14 vajíčky. Ta nám byla poskytnuta Petrem Velenským (Pražská zoologická zahrada). Vajíčka byla inkubována při 28°C a vlhkosti vzduchu 70%. Za těchto podmínek trvá

inkubace vajec tohoto druhu kolem 180 dní (Velenský, osobní sdělení). První Embryo bylo odebráno 2. den po naklazení vajec a poslední 161. den po naklazení. Mladší embrya byla usmrcena anestetikem MS222, starší embrya chladem při 4°C. Následně byla embrya 2 dny fixována ve 4% PFA. Fixovaná embrya s mineralizovanou tkání byla dekalcifikována ve 4% EDTA při 4°C. Nedekalcifikovaná embrya po fixaci a dekalcifikovaná embrya byla převedena do 70% etahnolu.

4.1.5. *Cryptelytrops albolabris*

Pro výzkum vývoje jedových zubů a uvnitř uzavřeného kanálku jsme použili šest jedinců chřestýšovce *Cryptelytrops albolabris* měsíc starých. Mláďata jsme anestetizovali chladem a usmrtili dekapitací. Jedinci pocházeli od soukromého chovatele. Po usmrcení jsme chřestýšovce fixovali přes noc ve 4% PFA.

4.2. Micro CT a faxitron X-ray zobrazovací metody

Pro 3D zobrazení tubulární struktury jedových zubů a dentice chameleona a gekona jsme použili microCT (Department of Craniofacial Development, Kings College London) zobrazovací techniku a rentgenové zařízení faxitron X-ray (Department of Craniofacial Development, Kings College London). Faxitron jsme také použili u některých embryí pro zjištění stupně osifikace in ovo a pro zjištění konce dekalcifikačního procesu u některých starších embryí chameleonů, gekonů a mláďat chřestýšovců.

4.3. Rastrovací elektronová mikroskopie

Čelisti mladých a dospělých jedinců *P. picta*, embryí studovaných druhů anolisů, mladého jedince *V. indicus* a *V. niloticus* byly po vyprání fixativ ve vodě očištěny od měkkých tkání napřed mechanicky a následně chemicky Savem. Očištěné čelisti se zuby jsme usušili v sušárně a převedli kvůli kompletní dehydrataci přes 100% etanol do acetonu. Po odpaření acetonu z čelistí a zubů v sušárně jsme čelisti nalepili na hliníkovou či měděnou podložku, pozlatili a pozorovali je pod rastrovacím elektronovým mikroskopem JEOL SEM 6380 LV.

4.4. Histologická analýza

Hlavy starších embryí a mláďat určených ke krájení na poloténkové řezy byly dekalcifikovány v 5% EDTA v 10% formalínu po dobu několika týdnů při 4°C. Embrya

před vylíhnutím či mladí jedinci byli vzhledem k vysokému stupni mineralizace kostí a zubů dekalcifikováni při pokojové teplotě, popřípadě při teplotě 40°C. Konec dekalcifikace jsme odhadovali na základě mechanické zkoušky tvrdosti prvních obratlů, nebo jak již bylo výše zmíněno rentgenovým zařízením faxitronem. Dekalcifikovaní jedinci a mladší nedekalcifikovaná embrya byla po fixaci v 4% PFA a po dekalcifikaci převedena do PBS, kde se fixativum nechalo vyprat z tkání. Ty pak byly odvodněny v řadě etanolu se vzrůstající percentualitou (30% - 100%) a následně převedeny do xylenu, nebo alternativně do biologických přípravků jako jsou HistoClear (National Diagnostics) či Histochoice (Sigma Aldrich). Z těchto médií byly vzorky převedeny do tří lázní parafínu Paraplast plus (Sigma Aldrich) a následně do něj zalaty. Bločky byly krájeny frontálně nebo sagitálně na rotačním mikrotomu. Šířka řezů se pohybovala od 6 µm do 12 µm, dle stupně vývinu tvrdých tkání. Řezy byly barveny trichromem (hematoxylin, eosin a alciánová modř, nebo hematoxylin, alciánová modř a červeň Sirius red). U chameleonů bylo vynecháno barvení alciánovou modří. Zde uvádím námi nejčastěji používaný protokol trichromového barvení hematoxylinem, eosinem a alciánovou modří:

Příprava barviv:

1. Mayerův hematoxylin

1000 ml H₂O dest

1 g hematoxylinu

50 g kamence draselného

0,2 g jodičnanu draselného

50 g chloralhydrátu

3. roztok alciánové modři

1 g kyseliny citronové v 1000 ml 3% vodného roztoku ledové kyseliny octové

10 g alciánové modři 8 GX

2. roztok eosinu

0,5 g eosinu

100 ml H₂O dest

Protokol:

1. Odparafinovat řezy xylenem, nebo HistoClearem či Histochoicem – 2 X 10 min
2. 96% EtOH – 2 X 10 min
3. Vyprat v tekoucí vodě a posléze nechat skla okapat
4. Obarvit roztokem hematoxylinu – 3,5 min
5. Vyprat v tekoucí vodě a nechat skla okapat

6. Obarvit roztokem alciánové modři – 10 min
7. Vyprat v tekoucí vodě a nechat skla okapat
8. Kyvetu s řezy vložit do 2% vodného roztoku NaHCO₃ – 40s
9. Vyprat v tekoucí vodě a nechat okapat
10. Barvení roztokem eosinu – 2,5 min
11. Vyprat v tekoucí vodě a nechat řádně okapat
12. 96% EtOH – 2 X 0,5 min a pak nechat okapat a lehce osušit na filtračním papíru
13. Karboxylen (nasyčený roztok fenolu v xylenu) – 5 min
14. Nechat okapat a lehce osušit na filtračním papíru
15. Převést do xylenu – 3 X 5 min
16. Zamontovat řezy do DPX mountant for histology (Sigma Aldrich).

Pro zobrazení vývoje zubního vzoru u *P. picta* a *Ch. calyptratus* jsme po fixaci vypreparovali zubní lišty se zubními zárodky a obarvili jsme mineralizující zuby alizarinem red S. U mladších embryí a embryí, kde docházelo již k tvorbě ankylózy jsme vzhledem k problematické preparaci zubní lišty obarvili alizarinem celé čelisti. Použili jsme upravený protokol barvení podle Wassersuga (1976):

1. Celé čelisti, nebo vypreparované zubní lišty byly po fixaci 4% PFA vyprány ve vodě. Doba praní se pohybovala od 2 hodin po 12 hodin.
2. Vypranou tkáň jsme vložili do 0,5% KOH a přidali jsme několik kapek 0,1% alizarinu Red S na 100 ml roztoku KOH. V tomto roztoku jsme macerovali tkáň jeden den.
3. Po obarvení kalcifikovaných tkání jsme projasňovali tkáň v zestupné koncentrační řadě roztoku glycerolu (25%, 50%, 75% a 100%). V každé koncentraci glycerolu jsme nechali tkáň zhruba jeden den, v případě vypreparovaných zubních lišt jen několik hodin. Projasněnou tkáň jsme skladovali v čistém 100% glycerolu.

4.5. *In situ* hybridizace

Použili jsme neradioaktivní *in situ* hybridizaci. UTP bylo barveno digoxigeninem. V průběhu *in situ* hybridizace byla použita sonda *Shh* specifická pro kraje *Python sebae*, u které bylo prokázáno, že hybridizuje i s *Shh* jiných druhů hadů (Buchtova et al., 2008). Plazmid byl linearizován enzymem Hind III a přepsán do RNA transkripčním enzymem T7. Řezy tkání byly natráveny proteínasou K o koncentraci 10 mg/ml po dobu 15 min. Hybridizace probíhala při 60° C. Níže uvádím použitý protokol od přípravy sondy po vlastní hybridizaci:

Příprava hybridizační sondy

Pro přípravu sondy jsme použily vektor nesoucí templát pro *Shh* (vektor pCRII-TOPO-p*Shh* (Medial) nesoucí p*Shh* Medial Fragment). Postup byl následující:

1. LINEARIZACE VEKTORU (DNA) NESOUČÍHO TEMPLÁT *Shh* RESTRIKČNÍM ENZYMEM

DNA (vektor s fragmentem p <i>Shh</i>)	15 μ l (= 15 μ g)
Stříhací Enzym Hind III	3 μ l
„Buffer X 10“	3 μ l
H ₂ O bez nukleáz	9 μ l

Celkově 30 μ l

Konečná koncentrace stříhacího enzymu je vždy menší než 12%.

Vše se promíchá v míchačce a krátce na pár sekund se zkumavka centrifuguje aby se dostal roztok z její stěny. Směs se 2 hodiny inkubuje při 37° C.

2. ZKOUŠKA JESTLI BYL VEKTOR SPRÁVNĚ ROZSTŘÍHÁN

Vezme se 3 μ l z inkubovaného roztoku z kroku jedna a přidá se 5 μ l loading Dye.

Vzniklá směs se dá na gel a podrobí zkoušce elektroforézou.

3. PŘEPIS FRAGMENTŮ DO RNA A JEJICH OBARVENÍ

Polymeráza T7	1 μ l
rozstříhnutá DNA (směs z kroku 1)	1 μ l
„Buffer X5“	4 μ l
DTT	4 μ l
„DIGOXIGENINE mix RNA“	1 μ l
<u>RNAsin (RNase inhibitor)</u>	<u>7 μl</u>

celkem 20 μ l

Vše se promíchá a 1 hodinu inkubuje při 37° C. Po hodině se přidá další 1 μ l polymerázy T7 a inkubuje se další hodinu při 37° C.

4. ZKOUŠKA PŘÍTOMNOSTI ÚSEKŮ RNA

Směs z kroku 3	1 μ l
H ₂ O bez RNaz	4 μ l
„Loading Dye“	2 μ l
celkem 7 μ l	

Celý objem se dá na gel a podrobí se testu elektroforézou.

5. ZNIČENÍ PŘÍTOMNÉ LINEARIZOVANÉ DNA

Ke zbylému roztoku z kroku 3 se přidá 1 μ l DNAzy a směs se inkubuje 20 min při 37 °C.

6. PRECIPITACE (VYČIŠTĚNÍ SONDY)

Ke směsi z kroku 5 přidáme

depc H ₂ O	100 μ l
4M LiCl	10 μ l
Absolutní EtOH	300 μ l

Směs se promíchá a nechá 1 hodinu v -80° C či přes noc v -20° C. Následně se při 13000 otáčkách 20 min centrifuguje. Po centrifugaci se tekutina vylije ze zkumavky. Na stěně by měl zůstat sediment (pelet) tvořený RNA.

K sedimentu se přidá 200-300 μ l 70% EtOH namíchaného z absolutního EtOH a depc H₂O. Směs se opět dá na jednu hodinu do -80° C či přes noc do -20° C. Poté se zkumavka zcentrifuguje při 13000 otáčkách po dobu 5 minut a tekutina se opět vylije. Zbytek tekutiny po vylití se odsaje pipetou. Zkumavku necháme na 5-10 min otevřenou. Pelet se tím osuší. Sušení probíhá při pokojové teplotě a pelet nesmí přeschnout. Nakonec se přidá k peletu 50 μ l depc H₂O a pelet se nechá na ledu rozpustit. Sonda je tímto vyčištěna a připravena k použití. Skladuje se v -20° C.

Neradioaktivní in situ hybridizace na parafínových řezech s použitím digoxigeninem barvených sond podél T Mitsiadise

A) PŘÍPRAVA VZORKŮ PŘED VLASTNÍ HYBRIDIZACÍ

Teplota skel s řezy se nechá stabilizovat při pokojové teplotě, pokud byly použity skla uložená v chladničce či mrazáku. Pro všechny kroky se používá H₂O ošetřená DEPC.

Celá procedura trvá 3 dny.

1. Odparafinování a rehydratace

Histoclear	2 X 10 min
100% EtOH	2 X 3 min
95% EtOH	1 X 3 min
90% EtOH	1 X 3 min
80% EtOH	1 X 3 min
70% EtOH	1 X 3 min
50% EtOH	1 X 3 min
2. Opláchnutí v 1% PBS	5 min
3. Proteináza K (koncentrace 10 – 20 µg/ml v TE pufru)	10 – 15 min
4. Opláchnout v 1% PBS	5 min
5. Fixace po natrávení čerstvě připraveném 4% PFA 20 min	
6. Opláchnout v depc H ₂ O	
7. Opláchnout v 1% PBS	5 min

B) HYBRIDIZACE

1. Příprava hybridizační směsi

Formamid	25ml	100%
EDTA	0,5ml	0,5M pH 8,0
kvasnicová RNA	0,05ml	zásobní 50 mg/ml
SSC	3,2 ml	20% roztok s pH 4,5
Tween 20	1,00ml	10% zásobní roztok
Heparin	1,25mg	
depc H ₂ O	doplnit do 50 ml	

Tato hybridizační směs se skladuje při teplotě -20° C a při delším skladování při -70° C.

2. Rozpuštění sondy v hybridizační směsi (začíná se s 2 µl sondy v 1ml hybridizační směsi). Dobře se vše promíchá a denaturuje při 70° C po dobu 10 min. Po denuraci se sonda v hybridizační směsi dobře promíchá a dá na na led.

3. Hybridizační směs bez sondy se nakape na skla s řezy (250 µl na 1 sklo) a vzorek se preinkubuje při teplotě hybridizace (60° C).

4. Přidá se sonda v hybridizační směsi v množství 100 µl na jedno sklo, které se přikryje krycím sklíčkem. Pod krycím sklíčkem se nesmí vyskytovat bubliny. Hybridizace probíhá při 60° C ve vlhké komůrce (je vystlaná vlhkým papírem namočeným v 50% formamidu v 1% PBS) v hybridizační peci přes noc.

C) POSTHYBRIDIZAČNÍ PROMÍVÁNÍ

1. Roztoky 1 a 2 se předeheřejí při teplotě 65° C
2. Opatrně se odstraní krycí sklíčka
3. Vzorky se dají do oplachovacího roztoku 1 1 X 30 min při 65° C
(2% SSC, 50% foramid, 0,1% Tween 20)
4. Oplachovací roztok 2 (1% SSC) 2 X 30 min při 65° C
5. Opláchnout v 1% MABT 3 X 30 min při pokojové teplotě
6. Vzorky se inkubují 1-2 hod v 10% teplem inaktivovaném kozím séru v MABT (2% blokovácí ragencie může být také použita)
7. Preadsorbuje se anti-DIG AP protilátka (Fab fragment, Boehringer cat: 1093274) v MABT s 10% kozím sérem po dobu 1-2 hod při pokojové teplotě. Koncentrace protilátky je 1 µl/ml
8. Na řezy se přidá preadsorbovaná protilátka v množství 100 µl na jedno sklo a nechá se inkubovat 1-3 hod při pokojové teplotě nebo přes noc při 4° C.

D) OPLACHOVÁNÍ A BARVENÍ

1. Vzorky se opláchnou v MABT 3-4 X 30 min při pokojové teplotě
2. Barvicí pufr 2 X 10 min při pokojové teplotě

Složení pufru: 5M NaCl – 0,5 ml

1M MgCl₂ - 1,25 ml

1M Tris-HCl pH 9,5 – 2,5 ml

Tween 20 – 0,025 ml

Levamisole 31 mg

depc H₂O – doplnit do 25 ml

3. Barvicí roztok:

Složení: 4,5 µl NBT + 3,5 µl BCIP na 1-2 ml barvicího pufru

Dejte barvicí roztok na řezy a inkubujte ve tmě. Pravidelně kontrolujte. Jakmile se objeví modrofialová barva, ukončete reakci v BPT.

4. Dehydratujte vzorky skrz vzestupnou koncentrační řadu ethanolu a obarvěte pozadí eosinem.

5. Preparáty zamontujte do „DPX mountant for histology“.

4.6. Imunohistochemická detekce apoptózy - TUNEL

Pro detekci apoptózy byl použit „ApopTag® Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit“ (Chemicon) s konverzí použitím kitu „vectastain DAB substrate kit“ (Vectalabs). V reakci se barví apoptotická tělíska skrze modifikaci DNA fragmentů využívajících terminální deoxynucleotidyl transferázu (TdT). Reagencie barví volné 3'OH DNA konce chemicky označenými a neoznačenými nukleotidy. Nukleotidy obsažené v reakčním pufru jsou enzymaticky přidány do DNA prostřednictvím terminální deoxynucleotidyl transferázy (TdT). TdT katalyzuje na templátu nezávislé přidání nukleotid trifosfátů k 3'-OH koncům dvojitěvláknové či jednovláknové DNA. Inkorporované nukleotidy tvoří oligomer složený z nukleotidů konjugovaných s digoxigeninem a z nukleotidů neoznačených v náhodné sekvenci. Na DNA fragmenty, které byly označeny konjugátem digoxigenin – nukleotid, se váže anti-digoxigenin peroxidázová protilátka. V tomto kitu je použita ovčí polyklonální protilátka.

Protokol:

1. Odparafinování a rehydratace – viz výše.
2. Opláchnout v H₂O
3. Natrávení buněčných membrán proteinázou K
4. Opláchnout řezy 2 X v PBT – 2 minuty každý
5. Blokování aktivity endogenních peroxidáz: Inkubujte v 3% H₂O₂ v PBS – 10 min
6. Opláchnout 3 X 2 min v PBT
7. Preinkubace: inkubujte řezy ve vyrovnávacím pufru – 5 – 10 min
8. TdT reakce: inkubujte řezy v TdT Enzymu (směs 100 µl reakčního pufru a 30 µl TdT enzymu) – 1h při 37° C ve vlhké komůrce
9. Stop reakce: opláchněte řezy ve Working Strength Stop/promývacím pufru - 10 min
10. Opláchnout v PBT – 3 X 2 min.
11. Detekce: inkubujte řezy s konjugátem anti-digoxigeninu (peroxidáza) – 30 min při pokojové teplotě
12. Opláchnout v PBT – 3 X 2 min

13. DAB reakce (použili jsem „DAB reaction kit”) – do 2,5 ml destilované H₂O přidáme 1 kapku pufr a zamícháme, 2 kapky DAB, zamícháme, 1 kapku H₂O₂, zamícháme a 1 kapku „Nickel solution” (pro získání černé barvy). Na každé sklo dát 0,5 ml barvicího roztoku a nechat inkubovat ve tmě až do vyvinutí signálu.
14. Opláchnout v tekoucí vodě
15. Dehydratovat a zvýraznit pozadí tkání eosinem
16. Montovat do „DPX mountant for histology”

V průběhu našeho výzkumu byla rozeznatelná kulovitá apoptotická tělíska také na histologických preparátech barvených trichromem (hematoxylin, eosin a alciánová modř).

4.7. Imunohistochemická detekce buněčné proliferace PCNA

Pro detekci buněčné proliferace byl použit „Zymed PCNA (proliferating cell nuclear antigen) detection kit“ (Invitrogen). PCNA je proliferační buněčný jaderný antigen, dříve popsáný jako cyklin, který se nachází v jádře, kde hraje roli v iniciaci buněčné proliferace. PCNA je detekovatelná v S, G₂ a M fázi buněčného cyklu.

Protokol:

Použili jsme modifikovaný protokol uváděný výrobcem.

1. Deparafinování a rehydratace skrze sestupnou procentuální řadu ethanolu
3. Opláchnout v PBS
4. Proteináza K v PBS o koncentraci 20 µg/ml – 15 – 20 min
5. Blokovat v 3% H₂O₂ v PBS – 5 – 10 min
6. K odhalení antigenů jsme použili 0,01M kyselinu citronovou s pH 6. Roztok kyseliny citronové jsme zahřáli 5 min v mikrovlnné troubě a pak do roztoku vložili kyvetu s řezy a zahřivali jsme ji dalších 5 min. Poté jsme nechali roztok s řezy 15 min chladnout.
7. Opláchnout v PBS
8. Inkubovat v 0,05% trypsinu v PBS – 2 min
9. Dát do 0,1% Tritonu v PBS – 10 min
10. Dát do 50 mM NH₄Cl
11. Opláchnout v PBS

12. Dát na sklo 2 kapky blokovacího roztoku (reagent 1) – 10 min při pokojové teplotě
13. Přidat 2 kapky biotinylované myši anti PCNA primární protilátky (reagent 2) – inkubovat 60 min při pokojové teplotě
14. Opláchnout v PBS – 3 X 2 min
15. Přidat 2 kapky Streptavidin peroxidázy (reagent 3) – 10 min při pokojové teplotě
16. Opláchnout v PBS – 3 X 2 min
17. Připravit Vector DAB barvicí roztok (5 ml H₂O, 2 kapky pufru, 4 kapky DAB roztoku, 2 kapky H₂O₂, 2 kapky „Nickel solution“). V jednotlivých krocích přípravy barvicího roztoku vše dobře promíchat. Na každé sklo se přidá 500 µl barvicího roztoku.
18. Inkubovat ve tmě dokud se neobjeví tmavý signál.
19. Reakce se zastaví v PBS.
20. Obarvené vzorky se dehydrují v řadě etanolu a tkáňové pozadí se obarví eosinem.
21. Zamontovat do „DPX mountant for histology“.

4.8. Imunohistochemická detekce kolagenu I a fibronektinu

Pro detekci kolagenu I jsme použili monoklonální protilátku M-38 (Hybridomabank) konstruovanou pro detekci protokolagenu I. Jako dárcovské zvíře při výrobě protilátky uvádí výrobce myš. Pro použití této protilátky bylo nutné fixovat tkáň v kyselém alkoholu. Pro detekci kolagenu II jsme použili monoklonální protilátku II-II6B3 (Hybridomabank). Jako dárcovské zvíře výrobce uvádí myš. Pro fixaci tkáně bylo použito 4% PFA. Fibronektin jsme detekovali za použití protilátky VA13 (Hybridomabank). Jako dárcovské zvíře při výrobě protilátky uvádí výrobce myš. Pro fixaci tkáně bylo použito 4% PFA.

Protokol:

1. Odparafinování a rehydratace: z 50% EtOH převést do PBS
2. PBS 2 X 5 min
3. Zablokovat endogenní peroxidázy v PBS + 0.9% H₂O₂ (3ml 30% H₂O₂ ve 100 ml PBS) - 20 min
4. Odkrytí antigenů v citrátovém pufru (10mM citrátu sodného; 0.05% Tween20; pH6. Zahřívát v mikrovlné troubě na plný výkon, než se citrát začne vařit, pak na střední výkon po 9 min. 10min vodní lázen v 97

5. Nechat zchladit skla – 20 min
6. 3 X PBS - 5 min
7. Obkreslit okraj skla voskovací tužkou PapPen
8. Blokovat v 10% BSA v PBS – 1 hod (může být delší doba)
9. Dát skla do vlhké komůrky a přidat primární protilátku (protilátka 1:50 v BSA) - 200 – 300 µl naředěné primární protilátky na 1 sklo. Nechat přes noc při 4° C
10. Opláchnout 3 X v PBS - 5 min
11. Přidat sekundární protilátku (Goat anti-mouse biotinylated, Dako), ředění 1:200 v 1% BSA, nechat 1 hod při pokojové teplotě
12. Opláchnout 3 X v PBS - 5 min
13. Připravit „ABC Elite Vectastain“ v průběhu inkubace tkáně se sekundární protilátkou (nejméně 30 min před upotřebením) – do 5ml PBT přidat jednu kapku reagensie A a jednu kapku reagensie B
14. „ABC Elite“ - 30 mins při pokojové teplotě
15. 3 X PBS 5 mins
16. DAB reakce (použili jsem „DAB reaction kit“) – do 2,5 ml destilované H₂O přidáme 1 kapku pufru a zamícháme, 2 kapky DAB, zamícháme, 1 kapku H₂O₂, zamícháme a 1 kapku niklového roztoku (pro získání černé barvy). Na každé sklo dát 0,5 ml barvicího roztoku a nechat inkubovat ve tmě až do vyvinutí signálu.
17. Po objevení signálu stopnout reakci v PBS.
18. Obarvené vzorky se dehydrovat v řadě etanolu a obarvit tkáňové pozadí eosinem.
19. Vzorky zamontovat do „DPX mountant for histology“.

4.9. Imunohistochemická detekce cytokeratinů

Pro detekci cytokeratinu jsme použili myši monoklonální protilátku anti pan Cytokeratin [PCK-26] (ab6401) detekující cytokeratin 5, 6 a 8. Pro fixaci tkáně bylo použito 4% PFA.

Protokol:

1. Odparafinování a rehydratace: z 50% EtOH převést do PBS
2. PBS 2 X 5 min
3. Zablokovat endogenní peroxidázy v PBS + 0.9% H₂O₂ (3ml 30% H₂O₂ ve 100 ml PBS) - 20 min
4. Odkrytí antigenů v citrátovém pufru (10mM citrátu sodného; 0.05% Tween20; pH6. Zahřívání v lázni 97° C po 10min

5. Nechat zchladit skla – 20 min
6. 3 X PBS - 5 min
7. Obkreslit okraj skla voskovací tužkou PapPen
8. Blokovat v 10% BSA v PBS – 1 hod (může být delší doba)
9. Dát skla do vlhké komůrky a přidat primární protilátku (1/1000 dilution v BSA) - 200 – 300 µl naředěné primární protilátky na 1 sklo. Nechat přes noc při 4° C
10. Opláchnout 3 X v PBS - 5 min
11. Přidat sekundární protilátku („ABC kit“), inkubovat 1 hod při pokojové teplotě
12. Opláchnout 3 X v PBS - 5 min
13. Připravit „ABC Vectastain“ v průběhu inkubace tkáně se sekundární protilátkou (nejméně 30 min před upotřebením) – do 5ml PBT přidat jednu kapku reagensie A a jednu kapku reagensie B
14. ABC - 30 mins při pokojové teplotě
15. 3 X PBS 5 mins
16. DAB reakce (použili jsem „DAB reaction kit“) – do 2,5 ml destilované H₂O přidáme 1 kapku pufr a zamícháme, 2 kapky DAB, zamícháme, 1 kapku H₂O₂, zamícháme a 1 kapku niklového roztoku (pro získání černé barvy). Na každé sklo dát 0,5 ml barvicího roztoku a nechat inkubovat ve tmě až do vyvinutí signálu.
17. Po objevení signálu stopnout reakci v PBS.
18. Obarvené vzorky se dehydrovat v řadě etanolu a obarvit tkáňové pozadí eosinem.
19. Vzorky zamontovat do „DPX mountant for histology“.

4.10. Používaná terminologie

V této práci se obecně přidržuji terminologie konvenčně používané. Při popisu umístění zubů v čelistech používám v termínech směr mesiální (anteriorní) a distální (posteriorní). Vzhledem k tomu, že čelisti tvoří oblouk, vyhýbám se termínům anteriorní a posteriorní. Další termíny zde užívané a popisující směry jsou labiální a linguální, které jsou používány v odontologii pro všechny obratlovce kromě savců, kde se používá místo termínu labiální bukální (Edmund, 1961). V rámci vývoje zubního zárodku používám termíny proximální pro část zubního zárodku, která je blíže zubní liště a distální pro část zárodku, která je vzdálenější od zubní lišty, tedy pro část oblasti cervikální kličky, nebo u starších zárodků Hertwigovy pochvy (HERS). Termín distální používám také při popisu bočních hrbolků u anolise, chamaeleolisů, chameleonů a varanů. Termín proximální a distální používám také při popisu buněk vnitřního sklovinného epitelu (IDE)

a odontoplastů. V tomto případě používám termín proximální pro část buněk, která je blíže bazální lamině tvořící rozhraní mezi IDE a mezenchymem zubní papily.

Při popisu zubu používám termín zubní korunka a zubní báze. Někteří autoři používají u plazů termínu kořen místo zubní báze. Payer (1968) zdůrazňuje, že užívání termínu kořen pro plazy je nesprávné, vzhledem k jeho odlišné morfologii. Kořen savců je úzký a uzavírá v sobě kanálek, zatímco zubní báze plazů je široká a zubní papila nemá v prostoru zubní báze charakter kanálku.

5. VÝSLEDKY

5.1. Vývoj zubů u modelového druhu plaza: zuby nulté a funkčních generací u *P. picta*

Pro tuto základní popisnou studii bylo použito 70 embryí v různých stádiích vývoje od 14. dne po naklazení po 60. den, tedy dobu líhnutí. Největší počet embryí bylo použito ze střední doby inkubace. Vzhledem k rychlému nástupu iniciace vzniku zubní lišty se nepodařilo zachytit počáteční stádium vzniku této struktury. Méně informací máme také z období těsně před vylíhnutím. V této době jsou již plně mineralizovány kosti a zuby jsou již v ankylóze. Embrya se tak musí před histologickým zpracováním až po dlouhou dobu dekalifikovat (doba dekalifikace závisí na procentualitě dekalifikačního roztoku a teplotě, při které dekalifikace probíhá). Pro určení stádií jsme měli zprvu vytvořen svůj klíč, nicméně v průběhu studia byla publikována tabulka normálního vývoje tohoto druhu (Noro et al., 2009). Tito autoři využívají systém třídění založený na číslování podle dnů inkubace. Z vlastního pozorování tento systém není přesný, doba inkubace vykazuje určitou variabilitu, embrya po naklazení vajec mohou být ve stádiu stádiu neuruly až farynguly. Tento rozdíl se pak odrážel i v dalším vývoji. Používali jsme tedy publikovaný systém dnů, ale ve skutečnosti jsme se řídili spíše vývoje tělních struktur a ne počtem dnů inkubace. Pro popis tvaru zubů v dentici jsme použili dva čerstvě vylíhnuté jedince a jednoho dospělého gekona. Byly aplikovány standardní histologické postupy včetně barvení histologických řezů trichromem (haematoxylin, eosin a alcianová modř). Pro detekci přítomnosti skloviny u zubů nulté generace se osvědčila metoda trichromu bez použití dekalifikace. Použití toluidinové modři k detekci sklovinné matrix u zubů nulté generace se ukázalo jako nevhodné, vzhledem k tenké vrstvě matrix nebyla vizuálně postřehnutelná. Pro poznání dynamiky zakládání zubů v rámci dentice jsme barvili alizarinem celé čelisti či vypreparované zubní lišty s kalcifikujícími zubními zárodky. Alternativně byl pro analýzu zubních tvarů použit rastrovací elektronový mikroskop. Výsledky jsou shrnuty v práci odeslané do časopisu *Journal of Anatomy*. Manuskript s obrazovými tabulemi, na které je odkazováno v textu je umístěn v priložené příloze 1. V textu popisujeme vývoj vaječných zubů, který nebyl součástí obsahu priloženého manuskriptu. Obrazová tabule číslo 12 v příloze 1 byla tedy připravována dodatečně. Velikost obrazových tabulí byla upravena vzhledem k jiným velikostním parametrům této dizertace.

5.1.1. Popis funkční dentice

Plně vyvinutá dentice *P.picta* se skládá z podobných konických až cylindrokonických zubů s dvěma malými hrbolky na špičce zubní korunky. Tato dentice je tedy homodontní (obr. 1A). Nízké hrbolky, jejichž špičky jsou vykloněné poněkud linguálně, jsou umístěné na labiální a linguální straně zubu (obr. 1B,D). Hrbolky jsou odděleny širokým žlábkem. Mezi špičkou labiálního hrbolu a žlábkem je patrný nízký sklovinný hřeben, který nepokračuje ke špičce linguálního hrbolku. Zubní korunka tvoří pouze jednu třetinu celkové délky zubu a je kryta vrstvou aprizmatické skloviny, která je nejsilnější v oblasti hrbolků a nejtenčí v místě žlábků mezi hrbolky a po stranách korunky. Strany korunky jsou ornamentovány systémem nízkých vertikálních sklovinových hřebenů (obr. 1D). V premaxille se vyvíjejí dva vaječné zuby, které mají vytvořené místo hrbolků dva okrouhlé sklovinové hřebeny (obr. 1C). Zubní báze je tvořena pouze dentinem, který je pleurodontně připojen k linguální straně čelistní kosti. Toto spojení je mineralizované a je tudíž typu ankylózy. Na linguální straně je v místě kontaktu zubní báze a kosti patrný mineralizovaný hřeben (obr. 1E).

5.1.2. Vývoj uspořádání zubů v dentici

První zuby, které vznikají v průběhu embryonálního vývoje jsou nefunkční zuby nulté generace. Tyto zuby jsou ve srovnání s funkčními menší velikosti a jejich vznik je iniciován v interakci orálního epitelu a mezenchymu či v interakci zubní lišty a mezenchymu v blízkosti orálního epitelu. První zub vzniká v mesiální oblasti čelisti kolem 14. dne inkubace. Druhý zub vzniká distálně k prvnímu. Další zuby se vyvíjí meziálně i distálně k prvnímu a druhému zubu. Zuby nulté generace, které se zakládají později jsou většinou větší, než zuby zakládající se dříve v průběhu embryonálního vývoje. Toto pravidlo je méně patrné u funkčních zubů, kde je velikostní rozdíl mezi mineralizovanými zuby malý. Zubní zárodky nově zakládané se vyvíjejí blíže k sousednímu zubu, jehož vývoj je nejpokročilejší (obr. 2A-D). Na základě alizarinem barvených preparátů jsme zjistili, že ve 30. den inkubace jsou přítomny v čelistech mineralizující zubní zárodky nulté i první funkční generace (obr. 2A). Funkční zuby se odlišují od zubů nulté generace v některých aspektech svého vývoje, který probíhá hlouběji v mezenchymu. Z alizarinových preparátů je patrná větší šířka zubní báze funkčních mineralizujících zubů oproti zubům nulté generace (obr. 2A, B). Zuby nulté generace tvoří okolo 13 zubních pozic v každém kvadrantu čelisti. Od 35. dne jsme pozorovali na některých pozicích mineralizující zuby funkční generace nahrazující zuby

nulté generace (obr. 2C). Od 40. dne jsme pozorovali přítomnost náhradních zubních zárodků v pozicích kde se nacházeli jak zuby nulté generace, tak zuby první funkční generace. Tyto zuby tedy tvoří druhou funkční generaci (obr. 2D). Na konci embryonálního vývoje je vytvořeno kolem 30 zubních pozic v jednom kvadrantu čelisti (obr. 2E). Tento počet je korelovan s velikostí jedince. V postembryonálním vývoji počet zubních pozic narůstá a v plné dospělosti jsme napočítali 50 zubů v polovině dolní čelisti (obr. 1A). Těsně před vylíhnutím, okolo 60. dne vývoje jsme pozorovali první známky zubní resorpce. Bylo to u zubů, kde náhradní vyvíjející se zuby byly situovány v těsné blízkosti či později přímo v prostoru zubní báze předešlého zubu (obr. 2E). Zuby nulté generace jsou jednoduché, nejčastěji konické, jednohrbolkové zuby oproti dvojhrbolkovým zubům funkčním (obr. 3A-F). Tvar zubů nulté generace je variabilní od konických (obr. 3A), přes zuby s oválným koncem (obr. 3B), po cylindrické (obr. 3C) či zahnuté (obr. 3E). Z pozorování je patrné, že vývoj zubů v čelistech vykazuje pravolevou symetrii a že vývoj prvních zubů v horní čelisti předbíhá vývoj prvních zubů v dolní čelisti.

5.1.3. Embryonální vývoj zubů nulté generace

Během embryonálního vývoje se vytvářejí zuby nulté generace jako první. Vývoj prvního a druhého zubu v čelisti je iniciován interakcí orálního epitelu a mezenchymu před vznikem zubní lišty. Tyto zárodky se nachází v meziální části čelistí a tvoří se kolem 14. dne embryonálního vývoje (obr. 4A). První zub v dolní čelisti je tvořen v době, kdy ještě neprobíhá chondrifikace Mekelovy chrupavky, zatímco druhý zub se zakládá v době, kdy již Mekelova chrupavka chondrifikovat začíná. Jak již bylo zmíněno výše, první zuby v horní čelisti se začínají vyvíjet o trochu dříve než v čelisti dolní. První známkou počátku vývoje prvního a druhého zubu tvorba zubní plakody z orálního epitelu, okolo které kondenzuje mesenchym. Tato kondenzace je jen málo zřetelná (obr. 4A). První zub ve stádiu pohárku zřetelně vybíhá z povrchu orálního epitelu do dutiny ústní (obr. 4B). V tomto stádiu se skovinný orgán zubního zárodku skládá z vnitřního sklovinného epitelu (IDE) a superficiální vrstvy orálního epitelu. Mezi těmito vrstvami jsme pozorovali několik kulovitých buněk (obr. 4B). V místech prvního a druhého zubního zárodku probíhá linie tvorby zubní lišty, která vzniká invaginací orálního epitelu do mezenchymu. Dochází k tomu v době, kdy vývoj prvního zubu pokročil do stádia zvonku. Zubní lišta má podobu kontinuálního pruhu, který se zakládá v horní čelisti z jednoho premaxillárního segmentu a dvou maxillárních segmentů

a v dolní čelisti ze dvou mandibulárních segmentů. Segmenty pak v průběhu vývoje srůstají. Aktivitou vznikající zubní lišty dochází k zanoření sklovinných orgánů prvního a druhého zubu hlouběji do mesenchymu. Tyto zubní zárodky od tohoto stádia pak již více nevybíhají do dutiny ústní (obr. 4C). Ve stádiu zvonku je centrální část IDE prvního zubu v přímém kontaktu s povrchovou vrstvou orálního epitelu. Tvar buněk IDE je kubický až nízce cylindrický. Typicky polarizované ameloblasty s jádrem na distálním pólu buněk, přítomné u funkčních zubů v oblasti korunky od stádia zvonku, se zde netvoří. Centrální buňky IDE ve stádiu zvonku vykazují nižší stupeň diferenciaci oproti buňkám sousedním (obr. 4C). Buňky orálního epitelu, které jsou v přímém kontaktu s centrálními buňkami IDE podléhají apoptóze. Střední vrstva sklovinného orgánu je tvořena kulovitými buňkami. Ty jsou přítomny pouze po stranách sklovinného orgánu (obr. 4C). Distální část sklovinného orgánu tvoří hypoplastickou cervikální kličku, která je zřetelněji rozlišitelná na linguální straně sklovinného orgánu (obr. 4C). Buňky zubní papily sousedící s IDE diferencují ve stádiu zvonku v odontoblasty (obr. 4C). Ty jsou větší než zbytek mezenchymatických buněk zubní papily a jejich tvar je oválný. Odontoblasty později svou sekreční aktivitou tvoří malý dentinový zub. U funkčních odontoblastů prvních zubů nulté generace jsme nepozorovali v dentinu rozvětvené odontoblastické výběžky, které jsou typické pro odontoblasty tvořící dentinovou část zubní korunky hlouběji v mezenchymu vznikajících zubů nulté generace a zubů funkčních generací.

Sklovinný orgán druhého zubu nulté generace je spojený s vyvíjející se zubní lištou od stádia pohárku. Oproti prvnímu zubu druhý zub svou proximální částí neprominuje během svého vývoje z povrchu orálního epitelu do dutiny ústní. Sklovinný orgán druhého zubu má podobný vývoj od stádia pohárku jako o trochu později vznikající dva až tři zuby. Jejich vývoj začíná na bázi labiální strany zubní lišty poblíž orálního epitelu (obr. 5A-B). Tyto zuby se vyvíjejí záhy po 14. dni inkubace v mesiální části čelistí a to v době, kdy je již přítomná chondrifikace Mekelovy chrupavky. První známkou vzniku těchto zubů je podobně jako u prvního a druhého zubu tvorba zubní plakody (obr. 5A). Zubní mezenchym opět téměř nezatelně kondenzuje okolo plakod. Zubní plakoda se rozvíjí v zubní pohárek (obr. 5A-B). U prvních zubů nulté generace jsme nepozorovali vznik typických epitelových pupenů, které by prominovaly z orálního epitelu či zubní lišty do mezenchymu. V dalším vývoji prochází druhý zubní zárodek a následně vzniklé zubní zárodky stádiem zvonku (obr. 5C). V té době se v zubní papile tvoří malý počet odontoblastů tvořících dentin (obr. 5D). U některých zubů byl

pozorován v zubní papile v průběhu mineralizačního stádia pouze jeden odontoblast (obr. 5E). Počet buněk participujících na tvorbě zubů nulté generace je velmi malý. Odontoblasty těchto časných zubů jsou kulovité, nejeví známky polarizace a z jejich sekrečního čela vybíhá větší počet krátkých odontoblastických výběžků. Jeden velký výběžek, který byl charakteristický pro plně funkční odontoblasty funkčních zubů, byly patrné jen u nejstarších zubů nulté generace. Zuby nulté generace, jejichž vývoj započal na bázi zubní lišty tvoří hypoplastické cervikální kličky. Jejich sklovinné orgány vykazují nízký stupeň organizace podobně jako první a druhý zub. Sklovinné orgány těchto zárodků se prostorově od zubní lišty příliš nevydělují a zůstávají tak téměř celé její součástí (obr. 5D). Vnější sklovinný epitel (ODE) je hypoplastický a zřetelně oddělený od buněk zubní lišty pouze v oblasti cervikální kličky. Ve zbytku zárodku není ODE, vzhledem k jeho zanoření do zubní lišty, vytvořen, pořípadě lze říci, že vnější vrstva zárodku zároveň tvoří vnější vrstvu zubní lišty. Hranici mezi ektodermem zubního zárodku a mezenchymem pak tvoří vnější epitel zubní lišty (obr. 5A-D). Ve stádiu zvonku se buňky IDE těchto zubů prodlužují. Jejich konečná velikost ale nedosahuje velikosti zralých ameloblastů přítomných u funkčních zubů, nedochází k jejich polarizaci a tyto zárodky netvoří sklovinu podobně jako první dva zuby (obr. 5D). Na rozdíl od prvních zubů centrální buňky IDE dosahují podobného stupně diferenciaci jako okolní buňky IDE. Střední vrstva sklovinného orgánu zde obklopuje téměř celou IDE (obr. 5C-D). Později, když vznikaly zubní zárodky první funkční generace jsme pozorovali přítomnost některých mineralizovaných zubů nulté generace ve sklovinných orgánech vyvíjejících se funkčních zubů na stejné pozici. Sklovinný orgán zubu nulté generace pak byl součástí sklovinného orgánu funkčního zubu. Rozdíl ve velikosti mezi zubem nulté generace a funkčním zubem je patrný z obrázku (obr. 5E).

Další set osmi zubů nulté generace se postupně zakládá na rostoucím čele zubní lišty hlouběji v mezenchymu. Sklovinné orgány jsou zřetelněji odlišené od zubní lišty (obr. 5F). Vnější sklovinný epitel a cervikální klička jsou jasně definovány (obr. 5F). Střední vrstva sklovinného orgánu je tvořena dvěma vrstvami: vrstvou plochých buněk sousedících s IDE, které jsme nepozorovali u superficiálních zubů, a vrstvou kulovitých buněk korespondujících k hvězdicovitému retikulu funkčních zubů. Střední vrstva je tedy více organizována ve srovnání se superficiálními zuby (obr. 5F). Buňky IDE jsou kubické až cylindrické. Cylindrické buňky jsou v centru IDE polarizované, s buněčným jádrem na distálním pólu buněk. Tyto buňky se tak stávají plně zralými ameloblasty (obr. 5F). U zubů tohoto typu jsme u nedekalcifikovaných, nebo jen málo dekalifikovaných

embryí nacházeli na povrchu dentinového zuby tenkou vrstvou skloviny, na řezech značené černě (obr. 5F). Později vzniklé zuby nulté generace měly vytvořeny velmi malé dentinové zubní báze (obr. 5F, 6A, F). V některých případech tyto zuby přirůstaly svou bází k maxille. Toto spojení zubů nulté generace jsme v dolní čelisti nepozorovali, nicméně vzhledem k poměrně vzácnosti výskytu ankylózy zubů nulté generace nemusí být výskyt pouze v horní čelisti pravidlem (obr. 6E). Ankylóza těchto zubů byla pozorována na ventrálním okraji maxilly. Ve vzácných případech zub maxilla kompletně obrostla a zub se tak stával součástí funkčních čelistí (obr. 6E). Buňky sklovinných orgánů nulté generace se ke konci embryonálního vývoje zplošťují. To indikuje přípravu zuby na erupci do dutiny ústní (obr. 6A).

5.1.4. Osud zubů nulté generace

Osud zubů nulté generace je závislý na své pozici, aktivitě zubní lišty a blízké přítomnosti či nepřítomnosti funkčních zubů v pozdní fázi zubního vývoje. Zuby nulté generace jsou většinou v průběhu svého vývoje posouvány hlouběji do mezenchymu růstovou aktivitou zubní lišty. Superficiální zuby mohou být kompletně uzavřeny do buněčných vrstev zubní lišty, takže zubní papila se pak uzavírá a nekomunikuje s mezenchymem. V tomto případě pak zuby mohou být otáčeny do různých směrů aktivitou buněk zubní lišty (obr. 6A). Další možností je úplně odvržení dentinových zubů do mezenchymu, epitel sklovinného orgánu pak zůstává součástí zubní lišty (obr. 6B). Zub může být odvržen buď na labiální, nebo na linguální stranu zubní lišty. Malé základy zubů nulté generace, které se nacházejí přímo nad vyvíjejícím se funkčním zubem jdoucím do erupce jsou často inkorporovány do proximální části sklovinného orgánu těchto zubů. Tyto zuby nulté generace nakonec vypadnou do dutiny ústní (obr. 6C-D). Některé z těchto superficiálních zubů neeruptují, nýbrž jsou odstraněny odontoklasty působícími z vnější strany zuby (obr. 6F). Vzácně zuby, které se připojují k maxille, zarůstají celé do kosti a stávají se součástí funkčních čelistí (obr. 6E).

3.1.5. Vývoj funkčních zubů v průběhu embryonálního vývoje

Vývoj funkčních zubů je oproti zubům nulté generace iniciován hlouběji v mezenchymu vyvíjejících se čelistních oblouků. První zárodky vyvíjejících se funkčních zubů byly pozorovány krátce před 20. dnem embryonálního vývoje, tedy méně než týden poté, co jsme pozorovali zakládání prvních zubů nulté generace. Shluk buněk na labiální straně čela rostoucí zubní lišty tvoří typické pupeny. Okolo pupenů

kondenzuje mezenchym (obr. 7A-B). Během přechodu ze stádia pupenu do stádia pohárku se diferencují tři vrstvy sklovinného orgánu, IDE, ODE a střední vrstvy ležící mezi IDE a ODE (obr. 7C-D). První pohárky funkčních zubů byly pozorovány kolem 20.dne inkubace. Při dalším přechodu ze stádia pohárku do stádia zvonku jsme nepozorovali významné tvarové změny zubních zárodků. Tomu, že se jedná o stádium zvonku napovídaly známky diferenciacie buněk IDE v ameloblasty a přilehlých mezenchymatických buněk zubní papily v odontoblasty (obr. 8A). Cervikální kličky zubních zárodků se vyvíjí asymetricky, linguální strana cervikální kličky je delší než labiální strana (obr. 8A). Buňky IDE se postupně prodlužují a dochází k jejich polarizaci, tedy k přesunu jejich jader na distální pól buněk (obr. 8A,C). Vlna postupné diferenciacie IDE buněk v ameloblasty se šíří centrifugálně z centra IDE směrem k distální části sklovinného orgánu (obr. 8A). Největší ameloblasty vznikají v proximální části zárodku v oblasti hrbolků a jejich velikost se zmenšuje směrem distálním, tedy směrem k cervikální kličce (obr. 8F). Diferenciacie odontoblastů z mezenchymatických buněk zubní papily přilehlých k IDE se šíří v časové a prostorové synchronizaci s vlnou diferenciacie ameloblastů. Jakmile odontoblasty a ameloblasty plně dozrají, začnou vytvářet dentin a skovinu (obr. 8C-F). Mladé odontoblasty na začátku sekreční aktivity mají na svém sekrečním čele početné krátké odontoblastické výběžky zasahující do prosoru mezi vrstvou odontoblastů a ameloblastů (EDJ = „enamel-dentin junction“) (obr. 8B). Zralé odontoblasty jsou velké, cylindrické a jejich buněčná jádra jsou umístěna na distálním buněčném pólu (obr. 8A,C). V době kdy se začíná vytvářet stádium zvonku, je patrné rozdělení středních vrstev sklovinného orgánu na dvě vrstvy složené z kulovitých a plochých buněk. Tento stav je tedy podobný, jako v případě později vznikajících zubů nulté generace (obr. 8B). Kulovité buňky, které jsou situovány mezi vrstvou plochých buněk a ODE vytváří tenkou vrstvu hvězdčovitého retikula (obr. 8A-C). Depozice skloviny v průběhu mineralizace zubní korunky je asymetrická a začíná až po uložení prvních vrstev dentinu centrálními odontoblasty. Síla vrstvy uložené skloviny je v pozitivní korelaci s velikostí ameloblastů až na centrální pruh ameloblastů, které ukládají mezi hrbolky jen tenkou vrstvu skloviny. Tento rozdíl významně participuje na utváření zubních hrbolků (obr. 8E). Plně funkční odontoblasty mají jeden rozvětvený odontoblastický výběžek jdoucí skrze dentinovou prstvu až k EDJ (obr. 8G). V pozdní fázi mineralizace funkčních zubů dochází k vaskularizaci zubní papily (obr. 9B). Tato vaskularizace nebyla u zubů nulté generace pozorována.

5.1.6. Vývoj zubní báze funkčních zubů a vývoj ankylózy

V době, kdy se dotvrdí mineralizovaná zubní korunka se začíná vytvářet zubní báze, která není kryta sklovinou a která tvoří dvě třetiny velikosti zubu. Zubní báze se vytváří prostřednictvím odontoblastů, které jsou před započatím sekrece predentinu v kontaktu se sklovinným orgánem. Ten se v této části sklovinného orgánu skládá ze tří vrstev IDE, střední vrstvy a ODE. Vnitřní sklovinný epitel tvoří kubické buňky, které plně nediferencují a netvoří tak sklovinu produkující ameloblasty (obr. 9A-B). Střední vrstvu sklovinného orgánu tvoří majoritně ploché buňky (obr. 9A). Typické hvězdicovité retikulum s charakteristickými velkými extracelulárními prostory zde chybí. V této fázi zubního vývoje sklovinný orgán roste stále asymetricky. Délka linguální strany je větší než labiální (obr. 9A). Hertwigova pochva (HERS) se tvoří ze zubní kličky před koncem vývoje zubní báze. Hertwigova pochva se skládá z dlaždicovitých buněk IDE a ODE a postrádá střední vrstvu sklovinného orgánu (obr. 9B). Buňky vnitřního sklovinného epitelu HERS jsou malé, zploštělé, nediferencují v ameloblasty a neprodukují sklovinu (obr. 9B). Mezenchymatické buňky přilehlé k IDE Hertwigovy pochvy diferencují v odontoblasty tvořící distální konec zubní báze (obr. 9B). V této části zubu jsme nepozorovali v dentinu linie poukazující na přítomnost rozvětvených odontoblastických výběžků. Před koncem vývoje zubní báze se u distálního okraje HERS vytváří shluk mezenchymatických buněk (obr. 9B). Ty diferencují v odontoblasty a později vytváří distální dentinový konec zubní báze. V době tvorby ankylózy, těsně před vylíhnutím jsme pozorovali přesahující konec zubní báze přes distální konec sklovinného orgánu (obr. 9B, 10C). Distální část sklovinného orgánu, tedy úsek HERS mění v této době charakter, není již tvořena pouze dvěma vrstvami, ale obsahuje i vrstvu střední skládající se z kulovitých buněk (obr. 10C). Samotný proces vzniku ankylózy byl pozorován u embryí od 50. dne inkubace. Tvorba ankylózy byla pozorována nejdříve na labiální straně, kde největší část spojení byla tvořena přímo dentinem a kostí. Cement se vyskytoval pouze u horního okraje ankylózy (obr. 9B). Odontoblasty a cementoblasty v místě linguální části ankylózy produkovaly v prostoru mezi kostí a distálním okrajem zubní báze směs predentinu a cementové matrix (obr. 9B, 10C). Tato směs později mineralizovala a vytvářelo se tak pevné spojení mezi dentinem, cementem a kostí. Hranice mezi kostí cementem a dentinem byla patrná ve formě linie zejména v premineralizační fázi vývoje ankylózy a to jak na její linguální, tak labiální straně (obr. 10B-C, 11A). Cement byl většinou acelulární, avšak v některých případech jsme v něm našli ostrůvky uzavřených buněk (obr. 11A). Během tvorby ankylózy dochází

k postupné degradaci a ztenčení sklovinného orgánu v oblasti korunky. Sklovinný orgán se tak připravuje na erupci zubu do dutiny ústní (obr. 9B, 10A). Erupci zubů jsme pozorovali na konci zubního vývoje okolo 60. dne inkubace. V době erupce zubu kryje nadále sklovinný orgán zubní bázi (obr. 11A).

U některých zubů těsně před vylíhnutím embrya jsme pozorovali v době erupce zubu zároveň jeho postupnou resorpci, která se týkala pouze zubní báze. Zuby v procesu resorpce jsme našli na pozicích, kde k zubní bázi těsně přiléhá mineralizující náhradní zubní zárodek. V průběhu zubní resorpce docházelo také k postupné remodelaci kostní tkáně v místě připojení zubu. Náhradní zub se postupně posunoval směrem k orálnímu epitelu podél linguální strany funkčního zubu z první generace. Zubní resorbce začínala na linguální straně zubní báze. Labiální část ankylóza zůstává dlouho neporušená a zub tak často až do kompletní resorbce báze drží na své pozici (obr. 11B). V průběhu resorpce jsme pozorovali zevnitř zubní papily mnohojaderné buňky podél dentinu (obr. 11C). Na začátku zubní resorpce byly pouze na linguální straně. Jejich pozice koreluje s pozorovaným postupem zubní resorpce. Tyto buňky tedy svou aktivitou odpovídají odontoklastům.

5.1.7. Vývoj vaječných zubů

V průběhu embryogeneze gekona se vaječné zuby začínají vyvíjet mezi 18. a 20. dnem inkubace. V tomto dni jsme pozorovali poměrně mohutnou zubní lištu v premaxillární oblasti (obr. 12A). Vývoj vaječných zubů začíná ze dvou epiteliálních pupenů blízko povrchu orálního epitelu. Zárodky se v premineralizačních stádiích vyvíjí blízko sebe a jejich velikost je téměř stejná s premineralizačními stádii ostatních funkčních zubů. U embrya 22 dní starého jsme pozorovali vaječné zuby ve stádiu pohárku. V této době začaly chondrifikovat nosní pouzdra (obr. 12B). Později u 32 dní starého embrya jsme pozorovali vaječné zuby ve stádiu zvonku. V této době byly již přítomné osifikace premaxillární kosti a nosní pouzdra byla plně chondrifikována (obr. 12C). Po tomto dni začíná záhy mineralizace zubní korunky, jejíž postup je obdobný mineralizaci ostatních funkčních zubů. Třicátý pátý den inkubace byl patrný mezi mineralizujícími vaječnými zuby vyvíjející se prostřední zub v premineralizačním stádiu v úrovni distálních částí sklovinných orgánů vaječných zubů (obr. 12D). Čtyřicátý den inkubace byla mineralizace zubních korunek vaječných zubů pokročilejší. Jejich velikost byla větší než velikost ostatních mineralizujících zárodků funkčních zubů. Na pozici vaječných zubů byl v tomto stádiu patrný vývoj náhradních zubů, které se

nacházel v premineralizačním stádiu. Zárodek prostředního premaxilárního zubu vyvíjejícího se mezi vaječnými zuby byl ve stádiu mineralizace (obr. 12E). U embrya 50 dní starého jsme pozorovali pokročilý vývoj zubních bází vaječných zubů. Ostatní funkční zuby byly v této době teprve ve stádiu mineralizace zubních korunek. Náhradní zuby na pozici vaječných zubů byly ve stádiu mineralizace zubní korunky a stupeň jejich vývoje nebyl příliš vzdálený od stupně vývoje zubů první funkční generace, nepočítaje zuby vaječné. Zub nacházející se mezi vaječnými zuby byl ve stejném stupni mineralizace jako zuby první funkční generace (obr. 12F).

5.2. *Varanus indicus*: vývoj zubů nulté a funkčních generací

V průběhu zkoumání vývoje dentice *Varanus indicus* bylo rozřezáno a nabarveno trichromem (haematoxylin, eosin a alciánová modř) 16 embryí v různém stupni vývoje od 10. dne po naklazení vajec po 161. den. Výsledky byly získány ve spolupráci s Mgr. Martinou Gregorovičovou (katedra zoologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy). Jeden uhynulý čertvě vylíhlý jedinec byl vypreparován a čelistní kosti se zuby zdokumentovány rastrovacím elektronovým mikroskopem. Získaná data jsou zhodnocena v níže uvedeném textu. V odkazech na stádia vývoje embryí zmiňujeme nejen počty dnů inkubace, ale i čísla stádií, jelikož v některých případech bylo starší embryo na nižším stupni vývoje než embryo mladší. Obrazové tabule a manuskript popisující vývoj dentice v průběhu embryogeneze jsou v příložené příloze číslo 3.

5.2.1. Popis první funkční generace zubů

Dentice varana je polyfyodontní se znaky heterodontie. Zuby jsou připojeny k čelistním kostem pleurodontně k jejich linguální straně. V jednom kvadrátu dolní čelisti se nachází 11 zubních pozic a v horní čelisti 12, z toho jsou v premaxilární části vytvořeny 2 zubní pozice s funkčními zuby (obr. 1C). Vedle funkčních zubů jsme v premaxille našli také jeden miniaturní zub nulté generace, který byl připojen svou zubní bází k premaxille. Jeho pozice byla na rozdíl od funkčních připojených zubů horizontální a svou špičkou směřoval mediálně (obr. 1C). Takovýchto zubů nulté generace jsme ke konci embryonálního vývoje pozorovali více. Po vylíhnutí ale byly již téměř všechny obměněny funkčními náhradní generací funkčních zubů. Uspořádání zubů v čelisti je unikátní mezi plazi svým vykloněním buď trochu labiálně, nebo linguálně. Toto vyklonění alternuje mezi zubními pozicemi. Výsledek připomíná uspořádání zubů na listové pile (obr. 1B). Převážná většina zubu varana je tvořena zubní korunou krytou

tenkou sklovinou. Zubní korunka prominuje nad úroveň okraje čelistní kosti (obr. 1A, C, E). Dentinová báze zubu je krátká a poměrně široká, tvořená plicidentinem. Plicidentin je formován systémem rozvětvených dentinových lamel, které se spojují tenčími dentinovými anastomózami. Výsledný tvar připomíná včelí plástev (obr. 1D). Zvlnění dentinu v oblasti zubní báze bylo z vnějšího pohledu jen málo zřetelné. Ankylóza u varaních zubů působí dojem přechodného typu mezi pleurodontním a akroodontním typem. Tvar zubů v mesiální a distální části čelisti se liší. V přední části čelisti se nachází menší a subtilnější zuby s konickým tvarem a zaoblenou špičkou (obr. 1C, D). Napříč středem celé korunky těchto zubů jde mesio-distálním směrem velmi nízký sklovinný hřeben (obr. 1B, C). Linguální strana korunek je ornamentována systémem nízkých vertikálních sklovinných hřebenů (obr. 1C). Morfologie distálněji umístěných zubů je specifická svým labio-linguálním zploštěním. Výsledkem je poměrně subtilní konický střed zubu připomínající hadí zuby, z kterého vybíhají ostré a tenké boční lišty (obr. 1E). Na spodní části těchto zubů byly patrné vertikální zářezy mezi středem zubu a bočními lištami (obr. 1E). U distálních zubů jsme na linguální straně korunek nepozorovali systém nízkých vertikálních sklovinných hřebenů (obr. 1E).

5.2.2. Vývoj zubní lišty a orálních žláz

Zubní lišta vzniká invaginací pruhu orálního ektodermu do přilehlého mezenchymu před 24. dnem inkubace (stádium 3), v době kdy ještě nejsou vytvořeny Mekelova chrupavka a palatoquadratum. Osifikace čelistních kostí nejsou v této době také přítomny. Zubní lišta se začíná vyvíjet dříve v dolní čelisti než v čelisti horní. Podobně první zubní zárodky vznikají o něco dříve v dolní čelisti. Mladá zubní lišta u embrya starého 32 dní (stádium 5) je na příčném průřezu oproti distální části zubní lišty (myšleno ve směru proximo-distálním) u starších embryí široká, tvořená z vnější strany kompaktní epitelální vrstvou velkých buněk sousedících s mezenchymem. Mezi vnější labiální a linguální vrstvou lišty se nachází poměrně široká vrstva tvořená malými buňkami (obr. 2B). V počátku roste zubní lišta téměř kolmo k povrchu orálního epitelu (obr. 2A). Později s pokračujícím růstem se distální část zubní lišty ztenčuje (myšleno v proximo-distálním směru) (obr. 2C-D). Vnější vrstvy lišty jsou v distálním úseku u starších embryí tvořeny mnohem menšími buňkami ve srovnání s proximální částí. Střední vrstva je v distální části tvořena pouze jednou vrstvou malých kulovitých buněk (obr. 2C). Buňky vnější vrstvy zubní lišty v její proximální části vykazují znaky polarizace. Buněčná jádra se nachází na distálním pólu buněk, na straně přilehlé ke středním vrstvám lišty (obr. 3B). Směr růstu zubní lišty

se v průběhu vývoje embrya mění z kolmého na poněkud linguální (obr. 2C -D). U 130 dní starého embrya (stádium 13) je patrné, že zubní lišta tvoří hranici mezi podkožním vazivem a nediferencovaným mezenchymem (obr. 2D). Od tohoto stádia jsme pozorovali početné krátké prstovité výběžky na labiální i linguální straně zubní lišty (obr. 2D). Tyto prstovité výběžky, které jsme u plazů popsali jako první nebyly u jiných plazů pozorovány. Výběžky se v průběhu dalšího embryologického vývoje nezvětšují. Zubní lišta dává vzniku všem zubním zárodkům v průběhu embryogeneze a postnatálního života a tvoří souvislý pruh podél čelistí. Z kolika segmentů vzniká u varana nebylo možné přesně určit, vzhledem k malému množství vzácného embryologického materiálu.

Vedle zubní lišty se v průběhu vývoje embryí vytváří v dolní čelisti další invaginace dávající vzniku orálním žlázám. V horní čelisti jsme tyto invaginace v průběhu embryogeneze nepozorovali. U embrya 56 dní starého (stádium 6) jsme pozorovali v dolní čelisti vznik zubní žlázy, která se vyvíjí labiálně k zubní liště. Vzniká ze stejného základu jako zubní lišta, akorát později v době když je přítomná Mekelova chrupavka a kosti dolní čelisti již osifikují. Směr růstu této žlázy je poněkud labiální oproti zubní liště, která směřuje v této době linguálně (obr. 3A). Tato invaginace, podobně jako další invaginace orálního epitelu z kterých vznikají orální žlázy, netvoří kontinuální pruh podél čelisti ale jen krátké přerušované úseky. V časně fázi vývoje je zubní žláza tvořena vnější vrstvou menších a nepolarizovaných epiteliálních buněk vymezující vznikající žlázu vůči mezenchymu. Mezi vnějšími vrstvami se nachází střední vrstva menších buněk. Čelo zubní žlázy je v tomto stádiu zaoblené (obr. 3A). Později u 73 dní starého embrya (stádium 8) jsme pozorovali v proximální části vnější vrstvy zubní žlázy polarizované buňky s buněčným jádrem na distálním buněčném pólu. Distální část vnější vrstvy je tvořena menšími nepolarizovanými buňkami. Čelo na distálním konci zubní žlázy změnilo tvar a je na příčném průřezu téměř zašpičatělé (obr. 3B). U tohoto embrya jsme pozorovali vznik další žlázy labiálně od zubní žlázy. Tato žláza nevzniká ze stejného základu jako zubní lišta a zubní žláza. Labiální žláza a zubní žláza jsou odděleny poměrně širokým prostorem tvořeným orálním epitelem (obr. 3B). Morfologie labiální žlázy v této fázi vývoje je podobná morfologii zubní žlázy na počátku jejího vývoje. Později se v embryogenezi objevuje další žláza, která se zakládá na linguální straně k zubní liště. U embrya starého 130 dní (stádium 13) jsme pozorovali vznik vývodů u všech těchto žláz. Žlázy v této době byly již bohatě rozvětvené s vytvořenými lumeny (obr. 3C).

5.2.3. Vývoj zubů nulté generace

První zuby, které se vyvíjejí v průběhu embryogeneze jsou zuby nulté generace. Tyto zuby jsou menší s jednodušší morfologií, nestávají se funkčními, ačkoliv některé z nich se svou bází připojují k čelistním kostem. Všechny zuby se vytvářejí v interakci mezenchymu se zubní lištou. První zubní zárodky vznikají u embrya 24 dní starého (stádium 3) poměrně blízko k orálnímu epitelu. Pro obrazovou dokumentaci vývoje prvních stádií zubů nulté generace jsme použili, vzhledem k vysoké míře poškození histologických řezů, později vznikající zuby nulté generace, které jsme pozorovali ve stádiích starých 32 dní (stádium 5) a 43 dní (stádium 4). Tato dvě stádia nebyla ve svém stupni vývoje příliš mnoho od sebe vzdálena. První známkou vývoje zubu je tvorba shluku epiteliálních buněk na labiální straně čela zubní lišty. Tento shluk v sobě zahrnuje i část vnější epiteliální vrstvy zubní lišty a je zřetelně oddělen od jejích středních vrstev. Shluk buněk téměř nepromínuje z profilu zubní lišty a morfologicky tak tvoří spíše plakodu, než pupen (obr. 4A-B). Ve srovnání s *P. picta* je toto první stádium větší a skládá se z početnější populace buněk. Okolo plakody kondenzuje přilehlý mezenchym (obr. 4A-B). V této fázi vývoje v úrovni zubních zárodků je proximální část zubní lišty na své linguální straně ztlustlá. Toto ztlustění bylo nalezeno i u dalších stádií.

U embryí 43 a 32 dny starých (stádia 4 a 5) jsme pozorovali i pokročilejší stádia zubního vývoje starších zubů nulté generace. Shluk epiteliálních buněk se rozvíjí v epiteliální pohárek, kde je již diferencován sklovinný orgán s vrstvou IDE. Vnější sklovinný epitel zde není vytvořen, jeho funkci zde přebírá vnější vrstva zubní lišty. Zubní zárodek je tak zanořen do středních vrstev zubní lišty. S diferenciací vrstev sklovinného orgánu se vytváří hypoplastická cervikální klička (obr. 4C-D). Vnitřní sklovinný epitel je ve svém centru tvořen shlukem buněk (obr. 4C). Střední vrstvy sklovinného epitelu jsou tvořeny podlouhlými buňkami či kulovitými buňkami. Jejich uspořádání napovídá jejich možnému vzniku z vnějších vrstev sklovinného orgánu (obr. 4C). Se vznikem sklovinného orgánu se vytváří zubní papila vyplněná kondenzovaným mezenchymem (obr. 4C-D). V plně rozvinutém stádiu pohárku se shluk buněk v centru IDE rozšiřuje do stran podél vrstvy IDE (obr. 4D).

Stádium zvonku a sekreční stádium jsme pozorovali u embryí starých 32 a 48 dní (stádium 5). V této době nebyly osifikace čelistních kostí stále patrné. Při přechodu ze stádia pohárku do stádia zvonku dochází k diferenciaci buněk IDE v ameloblasty a vnější vrstva zubní lišty v oblasti zubního zárodku připomíná spíše ODE. Stopka mezi sklovinným orgánem a zubní lištou ale není vytvořena (obr. 5A-B). Diferenciace buněk

začíná ve středu IDE a šíří se centrifugálně. Zrající buňky se prodlužují a jsou na nich patrné známky polarizace, buněčná jádra jsou umístěna na distálním pólu buněk (obr. 5A-B). Ke středovým buňkám IDE přiléhá kulovitý shluk buněk (obr. 5B). Mimo střed sklovinného orgánu není kulovitý shluk patrný (obr. 5A). V distální části sklovinného orgánu jsou buňky IDE malé, kubické a postrádají znaky polarizace. Okolo celé IDE a kulovité struktury se nachází tenká vrstva poměrně velkých plochých buněk (obr. 5A-B). Okolo této vrstvy se v úrovni centrálního shluku buněk nachází kulovité buňky (obr. 5B). Ty jsme po stranách a v distální části sklovinného orgánu nepozorovali. Na vrstvu kulovitých buněk navazují střední vrstvy zubní lišty (obr. 6B). Buňky mezenchymu zubní papily přilehlé k diferencujícím ameloblastů dozrávají v odontoblasty, které jsou ve srovnání s okolními mezenchymatickými buňkami papily větší. Jejich tvar je kulovitý (obr. 5B). Vlna diferenciace odontoblastů se šíří centifugálně a synchronizovaně s vlnou dozrávání ameloblastů.

V sekrečním stádiu zralé odontoblasty secernují preentin, který je na řezech znázorněn modrofialovou barvou. Odontoblasty v této fázi zubního vývoje vyplňují celou zubní papilu. Jejich množství koresponduje s velikostí vznikajícího zubu. U zubů malé velikosti se v zubní papile nachází malý počet odontoblastů, zatímco u větších je v zubní papile již poměrně velká populace těchto buněk. U velkých zubů nulté generace odontoblasty postupně vycestovávají ze zubní papily a vytváří distální část dentinové zubní báze (obr. 5D). Ameloblasty jsou delší a vykazují znaky polarizace. V kulovité struktuře, která je přilehlá k centrálním buňkám IDE jsme našli apoptotická tělíška (obr. 5D). Buňky v distální části IDE zůstávají malé a nediferencují v ameloblasty. Střední vrstva sestává z jedné vrstvy plochých buněk. V proximální oblasti sklovinného orgánu, kde se vyskytují zralé ameloblasty, přiléhá k vrstvě plochých buněk vrstva nabývající charakteru hvězdicovitého retikula. Střední vrstva navazující na hvězdicovité retikulum v centru sklovinného orgánu není odlišitelná od středních vrstev zubní lišty (obr. 5C-D). Část linguální strany vnějšího epitelu v oblasti zubního zárodku se chová jako ODE funkčních zubů v pokročilejším stádiu vývoje. Vrstva se zdvojuje a její šířka se tak zvětšuje. Z tohoto místa se později vyvíjí zubní lišta, která pokračuje v růstu hlouběji do mezenchymu. Oblast rozšíření této vrstvy epitelu se může nacházet poblíž orálního epitelu v proximální části sklovinného orgánu, či ve střední části sklovinného orgánu (obr. 5C-D).

U 56 dní (stádium 6) starého embrya jsme našli první známky mineralizace preentinu po stranách zubní papily. Dentin je zde vizualizován růžovou barvou.

U tohoto embrya nebyly stále přítomny osifikace kostí horní čelisti. V této době pokračuje vývoj zubní lišty, přerůstá zubní zárodek a roste linguálně (obr. 6B). Zubní zárodky jsou buď úplně, nebo z větší části zanořeny do zubní lišty (obr. 6A-B). Velikost zubů nulté generace je dosti variabilní (obr. 6A-D). Sklovinný orgán v této fázi vývoje mění svou charakteristiku. Buňky IDE se zmenšují a vytrácí se jejich polarizace (obr. 6A-B). Kulovitá struktura ve středu sklovinného orgánu již není většinou patrná. Střední vrstvy sklovinného orgánu zanikají a IDE tak přímo sousedí se středními vrstvami zubní lišty (obr. 6A-B). U větších zubů nulté generace je dentinový zub postupně vyloučen z epitelu do mezenchymu (obr. 6B-D). Konečnou fází tohoto vyloučení jsme pozorovali u 73 dní starého embrya (stádium 8), v době úplné mineralizace predentinu. U tohoto stádia již byly přítomny kosti horní čelisti. V procesu vyloučení dentinového zubu do mezenchymu docházelo postupně k regresi distální části sklovinného orgánu, který v dřívějším stádiu částečně promínoval z profilu zubní lišty (obr. 6B-D). Zvonkovitý tvar sklovinného orgánu se postupně mění na tvar podobný pohárku (obr. 6D). Nakonec dojde k úplnému vymizí cervikální kličky a tvar zbytku sklovinného orgánu se mění z konkávního na konvexní (obr. 6C). V průběhu procesu regrese jsme nepozorovali v distální části sklovinného orgánu apoptotická tělíska.

Větší zuby nulté generace mohou přirůstat k čelistním kostem, vzniká ankylóza. Její vývoj jsme pozorovali poprvé u 63 dní starého embrya (stádium 7), kde mezi zubní bází a kostí dolní čelisti vznikají mineralizovaná jádra (obr. 6D). Ta se později ve vývoji spojují se zubem a čelistní kostí a vytváří se ankylóza (obr. 1C). V rámci nulté generace jsme pozorovali i další osudy zubů. Ty nejmenší se v průběhu embryonálního vývoje staly se svými sklovinnými orgány součástí sklovinných orgánů vyjíjejících se funkčních zubů, jak je patrné u embrya 73 dní starého embrya (stádium 8) (obr. 7A). U embrya 130 dní starého (stádium 13) jsme našli uzavřené zuby v zubní liště poblíž orálního epitelu (obr. 7B). Tyto zuby se připravovali na odvržení z epitelu do dutiny ústní, jejich sklovinné orgány v této době byly tvořeny drobnými plochými buňkami přímo sousedícími se středními vrstvami zubní lišty (obr. 7B).

5.2.4. Vývoj zubů funkčních generací

První zárodky funkčních zubů jsme našli u embrya 56 dní starého (stádium 6), tedy v době kdy ještě nebyly přítomny osifikace kostí horní čelisti. Epiteliální pupeny mající kulovitý tvar promínají oproti plakodám zubů nulté generace z profilu zubní lišty (obr. 8A). Okolo pupenu kondenzuje mezenchym (obr. 8A). Tato kondenzace je u

funkčních zubů mnohem výraznější než u zubů nulté generace. Při přechodu do stádia pohárku se populace buněk pupenu rozšiřuje centrifugálně. Toto rozšiřování probíhá zejména ve směru linguálním. Dochází k růstu pupenu a postupné diferenciaci sklovinného orgánu (obr. 8B). Ve velmi časném stádiu pohárku nejsou buňky IDE ještě příliš organizovány do zřetelně odlišitelné vrstvy od ostatních buněk vznikajícího sklovinného orgánu (obr. 8C). V plně vyvinutém stádiu pohárku je již zřetelná kompaktní vrstva IDE a ODE, mezi kterými je střední vrstva sklovinného orgánu. Vnitřní sklovinný epitel se skládá z kubických či cylindrických buněk, které nejsou v tomto stádiu polarizované. Buněčná jádra těchto buněk jsou podlouhlá či kulovitá. Uspořádání buněk IDE by mohlo napovídat, že z něj částečně vzniká střední vrstva sklovinného orgánu. Na vzniku střední vrstvy se dle pozice buněk zřejmě podílí i ODE (obr. 8D). Buňky v centrální části zubní papily přilehlé k IDE se prodlužují a zvětšují, dochází k jejich diferenciaci v odontoblasty. V této době ještě sousedící buňky IDE nejeví charakteristické známky buněčné diferenciaci v ameloblasty, jako je např. polarizace buněk (obr. 8D).

U embrya 56 dní starého (stádium 6) jsme pozorovali také přítomnost prvních zárodků funkčních zubů ve stádiu zvonku. Růst sklovinného orgánu v tomto stádiu je aktivnější na linguální straně. Buňky IDE na labiální straně jsou větší než na straně linguální (obr. 9A). Střední vrstva sklovinného orgánu je tvořena zejména plochými buňkami. Z uspořádání buněk v oblasti cervikální kličky je patrné že z její vnější vrstvy pravděpodobně vzniká distální část střední vrstvy (obr. 9A). Buňky ve středu IDE, ke kterým přiléhá shluk buněk sklovinného orgánu, začínají jevit známky polarizace (obr. 9A). Ve stádiu zvonku se začíná vytvářet hvězdicovité retikulum (obr. 9A-D). V zubní papile se centrifugálně šíří vlna diferenciaci odontoblastů. Ve středu osy zubní papily a v distální části zubní papily zůstávají buňky nediferencované (obr. 9A). V dalším stádiu začínají odontoblasty produkovat predentin do EDJ. Secernace predentinu se šíří centrifugálně a předchází vzniku skloviny. V době sekreční aktivity odontoblastů jsme pozorovali přítomnost apoptotických tělísek v kulovitém shluku buněk, který přiléhá k centrální části IDE (obr. 9B). Ve stádiu zvonku a sekrečním stádiu je v místě budoucího sklovinného hřebenu jdoucího středem napříč zubem pruh menších buněk vklíněných mezi ameloblasty. U větších zárodků funkčních zubů v sekrečním stádiu, které jsme pozorovali od 73. dne (stádium 8), je hvězdicovité retikulum vysoce rozvinuto. Výrazně patrná je také dvojitá vrstva plochých buněk sklovinného orgánu přiléhající k IDE (obr. 9C). V sekrečním stádiu lze poprvé pozorovat vznik zubní lišty z linguální strany

ODE. Ta ještě nemá zřetelně oddělenou vnější a střední vrstvy buněk (obr. 9C). U embrya tohoto stáří jsme také poprvé pozorovali vznik dentinu mineralizací predentinu (obr. 9D). Odontoblasty v sekrečním a mineralizačním stádiu jsou cylindrické a polarizované s buněčnými jádry na distálním buněčném pólu. Ze sekrečního čela odontoblastů vybíhá několik odontoblastických výběžků procházejících celou vrstvou dentinu a predentinu (obr. 9D). Struktura sklovinného orgánu je v době mineralizace podobná jako u předešlého sekrečního stádia. Poslední polarizované ameloblasty ve směru proximo-distálním se nachází v úrovni distálního dentinového čela (obr.9D). U prvních funkčních zubů, které jsou spojeny se zubní lištou, která má v místě spojení ještě mohutnou střední vrstvu, jsou buňky labiální strany ODE v úrovni dentinu velké a polarizované s buněčnými jádry na distálním pólu buněk. V distální části ODE není polarizace buněk patrná. Linguální strana ODE je v proximální části tvořena jednou až třemi vrstvami buněk. Distální část linguální strany ODE je pod vybíhající zubní lištou jednovrstevná (obr. 9D). U později vznikajících funkčních zubů, které jsme pozorovali od 88. dnu embryonálního in ovo vývoje (stádium 10) se napřed secernuje silná vrstva predentinu, v které jsou patrné odontoblastické výběžky (obr. 10A). Její mineralizace začíná později od strany přilehlé k IDE. Odontoblasty v počátku mineralizace pokračují v secernaci predentinu (obr. 10B). Vnější sklovinný epitel se na rozdíl od prvních funkčních zubů skládá v téměř celém svém úseku z malých kulovitých buněk. Výjimku tvoří velké buňky v oblasti cervikální kličky (obr. 10A-B). Vrstva plochých buněk sousedících s IDE je tvořena třemi buněčnými vrstvami. V místě špičky zubu ploché buňky přiléhají k ODE. Hvězdčovitě retikulum v tomto místě a stádiu není vyvinuté (obr. 10B). Sklovina, která je aprizmatická a jejíž vrstva je tenká vzniká poměrně pozdě v průběhu mineralizace. U většiny zubů sklovina nebyla zachována díky dekalifikaci. V místě kde byla před dekalifikací sklovina přítomna pak často vzniká volný prostor (obr. 10C). Na konci vývoje zubní korunky dochází k výrazným změnám ve struktuře sklovinného orgánu, který se stává dvojevrstevný. Střední vrstvy mizí, ameloblasty se zmenšují a zpošťují a vytrácí se jejich polarizace. Buňky IDE pak přímo sousedí s vrstvou ODE (obr. 10D). Uvnitř zubní papily byly v tomto pozdním mineralizačním stádiu patrné cévy (obr. 10D).

Ke konci mineralizace zubní korunky se začíná vytvářet krátká, zato mohutná dentinová zubní báze skrze interakci diferencujících odontoblastů s HERS. Hertwigova pochva vyrůstá z cervikální kličky, je dvojevrstevná, skládající se z IDE a ODE. Její buňky nejeví známky polarizace a netvoří sklovinu (obr. 11A-C). U embrya 130 dní

starého (stádium 13) jsme pozorovali u některých zubních zárodků v oblasti zubní báze jen jednu rozpadající se vrstvu buněk HERS (obr. 11D). U 161 dní starého embrya (stádium 14) byl na některých zubních zárodcích patrný proces vznikání plicidentinu a na jiných proces vzniku pleurodontní ankylózy. Vznik zubní báze doprovází vznik četných invaginací IDE do mezenchymu zubní papily. Vznikne tak zvlněná struktura sklovinného orgánu v oblasti HERS. V místech invaginace IDE jsme pozorovali další buňky, pravděpodobně střední vrstvy sklovinného orgánu, která běžně v oblasti HERS není přítomna, nebo je jen málo rozvinutá. Tyto buňky byly pozorovány pouze v proximální části invaginace. Distální čela buněk z protilehlých stran invaginovaného IDE se tak dostávaly do vzájemného kontaktu. Buňky IDE tvořící invaginaci jsou polarizované s buněčnými jádry na svých distálních pólech (obr. 12A-B). Přilehlé mezenchymatické buňky zprvu nejeví znaky diferenciaci a jsou malé (obr. 12A-B). Později mezenchymatické buňky dozrávají a vytvářejí dentinovou vrstvu (obr. 12C-D). Vzhledem k nedostatku embryologického materiálu se nám nepodařilo podrobně popsat dynamiku invaginace IDE při formování plicidentinu a pozdější vznik anastomóz mezi jednotlivými záhyby.

Vznik ankylózy mezi funkčními zuby a čelistními kostmi jsme pozorovali od 130. dne (stádium 13) inkubace. Mezi zubní bází a čelistní kostí se vytváří mineralizovaná centra cementu. Tato centra většinou v prostoru blízko zubní báze neobsahují v sobě uzavřené buňky. Naopak v části, která je blízko kosti v sobě buňky uzavírá (obr. 13A). Rozdělení cementu na celulární („bone of attachment“) a acelulární část je zřetelnější u embrya 161 dní starého (stádium 14), tedy v pozdějších fázích vývoje ankylózy (obr. 13B-D). Na konci zubního připojení ke kosti je patrná v záhybech plicidentinu světlejší lososová barva, což patrně znamená, že záhyby plicidentinu jsou vyplněny acelulárním cementem (obr. 13D). Na fotografiích z rastrovacího elektronového mikroskopu pak nejsou záhyby plicidentinu z vnějšího pohledu příliš výrazné (obr. 1D). Báze jednotlivých záhybů dentinu jsou nohovitě rozšířené, zvětšuje se tak plocha připojení zubu ke kosti (obr. 13D). V době těsně před vylíhnutím je vývoj náhradních zubů na některých zubních pozicích pokročilý – na těchto zubech již může být patrná tenká vrstva skloviny. Takovýto zubní zárodek těsně přiléhá k zubní bázi zubu první funkční generace, který je svou bází spojen s čelistní kostí (obr. 14A). Na rozdíl od *P. picta* a anolisů nedochází ke konci vývoje při těsném kontaktu vyvíjejícího se náhradního zubu se zubem předchozí generace k iniciaci zubní resorbce (obr. 14B). Na

konci *in ovo* vývoje jsme pozorovali u *V. indicus* tři generace funkčních zubů (obr. 14C). Náhradní zuby vznikají i na pozici vaječného zubu (obr. 14D).

5.2.5. Vývoj vaječného zubu

Počátek vývoje vaječného zubu nebyl zachycen. K iniciaci jeho vývoje dochází před 56. dnem inkubace (stádium 6). V tomto stádiu je vaječný zub ve stádiu pohárku. Jeho proximální část je ve spojení se zubní lištou v premaxilární oblasti horní čelisti. Zub se vyvíjí vzniká v blízkosti orálního epitelu (obr. 15A). Ve srovnání s ostatními zuby je stádium pohárku obrovské. První stádia se vyvíjí v horizontální poloze a sklovinný orgán směřuje svou proximální částí distálně (ve směru mesio-distálním). Střední vrstva sklovinného orgánu složená z plochých buněk odděluje zubní zárodek od středních vrstev zubní lišty (obr. 15A). Později u embrya 63 dnů starého (stádium 7) byla již vytvořena tenká vrstva dentinu. Příčný průřez zubem má v tuto dobu oválný tvar (obr. 15B). Z pozorování vnější morfologie starších embryí je patrné, že proximální část sklovinného orgánu zůstává po celou dobu svého vývoje v blízkosti orálního epitelu (obr. 15C). U embrya 103 dní starého (stádium 12) byla patná pokročilá mineralizace vaječného zubu. Došlo ke změně jeho tvaru. Vytvořily se rozšířené ostré boční hrany tvořené dentinem a tenkou vrstvou skloviny. Hvězdčité retikulum bylo v této fázi vývoje značně rozvinuté (obr. 15D). U embrya 130 dní starého (stádium 13) je patrná degradace sklovinného orgánu. Buňky IDE jsou malé a nepolarizované. Struktura středních vrstev se mění a začínají degradovat (obr. 16A). Před vylíhnutím u embrya 161 dní starého byl zub rotován svou proximální částí meziiálně a dostal se tak do funkční polohy kdy směřuje ven z tlamy. Báze vaječného zubu je široká, tvořená plicidentinem a připojuje se k premaxille širokou vrstvou celulárního a tenčí vrstvou acelulárního cementu (obr. 16B).

5.3. Vývoj dentice u *Chamaeleo calyptatus*: monofyodontie, akroodontie a heterodontie

Výsledky popisující vývoj dentice u chameleona *Ch. calyptatus*, zde prezentované, byly získány ve spolupráci s pracovní skupinou Doc. M. Buchtové (ÚŽFG AV ČR, Brno). Dvacet embryí bylo nakrájeno na příčné řezy a obarveno haematoxylinem a eosinem. Některé řezy byly použity pro imunohistochemickou detekci cytokeratinu. Deset embryí bylo nabarveno alizarinem a projasněno v glycerolu. Tato embrya byla použita pro interpretaci vývoje uspořádání zubů. Číslování zubních pozic nezáviselo na pořadí vzniku zubů, ale na jejich umístění v zubní řadě. Číslování probíhalo ve směru

mezio-distálním. Vzhledem k dlouhé inkubaci vajec chameleonů a jejich poměrně vysoké ceně se nám nepodařilo přesně vymapovat vývoj každého zubního zárodku. Vývoj zubního vzorce byl odvozen od stupně mineralizace přítomných zubů u vhodně vybraných stádií, kde byl tento rozdíl v mineralizaci patrný. Tato bazální deskripce nám sloužila jako pozadí pro návaznou molekulární detekci exprese *Shh* u předmineralizačních stádií zubů. Obrazové tabule, na které se v textu odkazují, jsou v příložené příloze číslo 4.

5.3.1. Popis funkční dentice

U *Ch. calypttratus* se vytváří v průběhu života pouze jedna generace funkčních zubů. Dentice chameleona je tedy monophyodontní. Zuby nulté generace, které jsou přítomny u širokého spektra šupinatých plazů a archosaurů jsme u chameleona nepozorovali. Zuby jsou připojeny k čelistním kostem akroodontně. Typem připojení je ankylóza (obr. 2C-D). Počet zubních pozic není po vylíhnutí konečný, nýbrž s věkem jedince roste. Embrya ke konci inkubace mají vytvořeno 9 zubních pozic v jednom kvadrátu dolní čelisti a 11 v kvadrátu horní čelisti. V premaxillární části se nachází vaječný zub a po jeho stranách je po jednom premaxillárním zubu v každém kvadrátu. U dospělého a plně vzrostlého chameleona jsme napočítali 21 zubních pozic v kvadrátu dolní čelisti a 25 v kvadrátu horní čelisti. Vaječný zub po vylíhnutí vypadává a v celé premaxille zůstávají pouze dva zuby (obr. 2B). Počet zubů v premaxille se po vypadnutí vaječného zubu v průběhu života nemění. Počet zubů v dolní čelisti je u embryí těsně před vylíhnutím stejný jako počet zubů v oblasti maxilly.

Zuby v dentici se mezi sebou odlišují tvarem a velikostí (obr. 1D, 2A,C-D). Velikost zubů roste v Mesio-distálním směru (obr. 2A,C-D). Výjimku tvoří vaječný zub, který je signifikantně větší než ostatní zuby mineralizované v průběhu embryogeneze (obr. 3A). Nejdistančnější zub je naopak o trochu menší než jeho mesiálně umístěný sousední zub (obr. 1D, 2A,C,D). Dentice dospělých zvířat je rozdělena do tří skupin odlišujících se velikostí zubů (obr. 2C-D). Prvních devět zubů v dolní čelisti a devět v horní čelisti (nepočítaje vaječný zub, který vypadl po vylíhnutí) má malou velikost (obr. 2A,C-D). Tyto zuby kalcifikují v průběhu embryonálního vývoje. Premaxillární zuby tvořící druhou zubní pozici v každém kvadrátu jsou nejmenší v rámci celé dentice (obr. 2B). Druhá skupina pěti zubů byla pozorována u vzrostlého dospělého jedince a mláděte. U dospělého tvoří druhá skupina zubů střední část dentice (obr. 2A,C-D). Tyto zuby jsou větší než zuby mesiálně umístěné skupiny. První zuby této skupiny začínají

vznikat ke konci embryonálního vývoje. Třetí skupina zubů byla přítomna v distální část dentice dospělého jedince. Tyto zuby, kterých jsme napočítali v maxillární oblasti devět a v mandibulární sedm v kvadrátu, byly největší v dentici (obr. 2C-D). U mladého jedince byla mezi premaxillárními zuby na druhé pozici mezera po vypadlém vaječném zubu. Vzhledem k tomu, že u chameleona nedochází k zubní obměně, zůstává tato mezera přítomna po celý život jedince (obr. 2B). Další mezera u mladého jedince byla pozorována mezi zubem na druhé a třetí pozici, tedy mezi posledním premaxillárním zubem a prvním maxillárním zubem (obr. 2B). Stejná mezera byla patrná i u dospělého jedince. Báze zubů jsou stmeleny dohromady cementem (obr. 2C-D). Výjimku tvoří premaxillární zuby, které se navzájem nespojují a nespojují se ani se svým sousedním zubem v premaxille (obr. 2B). Mesiální a distální konce sousedních zubních bází se částečně překrývají (obr. 2B). Zuby jsou svou mesiální částí vykloněny trochu linguálně, zatímco distální částí labiálně (obr. 2B). Labiální strana zubů dolní čelisti se dostává při skusu do kontaktu s linguální stranou zubů horní čelisti. Premaxillární zuby na druhé pozici jsou vykloněny mediálně. Toto vyklonění vzniká v průběhu embryogeneze, kdy je také přítomen vaječný zub.

Zuby chameleonů jsou labio-linguálně zploštělé s výjimkou premaxillárních zubů, které mají cylindro-konický tvar (obr. 3B-D). Vaječný zub je na konci svého vývoje vykloněný ven z dutiny ústní. Jeho boční strany mají ostré hrany (obr. 3A). Špička premaxillárních zubů na druhé pozici je zakončena malým hrbolem (obr. 3A). Maxillární a mandibulární zuby, které se tvoří v průběhu embryonálního vývoje mají dva až šest hrbolek (obr. 3B-D). Centrální hrot těchto zubů je rozdělen na dva malé hrbolek umístěné labiálně a linguálně. První tři maxillární zuby a dva mandibulární zuby jsou tvořeny pouze centrálním dvojhrbolkovým hrotem (obr. 1D, 3B). Další zub má vedle centrálního dvojhrbolkového hrotu ještě menší hrbolek na mesiální straně (obr. 3B). Zuby na dalších pozicích jsou nejčastěji čtyřhrbolkové s centrálním dvojhrbolkovým hrotem a menším mesiálním a distálním hrbolem (obr. 3C). Distální zuby mohou mít 5 – 6 zubních hrboleků, přičemž 5. a 6. hrbolek jsou umístěny mesiálně a distálně na spodním okraji zubní korunky (obr. 3D). V případě přítomnosti pěti hrboleků, může být 5. hrbolek buď na mesiální, nebo na distální straně. Labiální a linguální hrbolek je na špičce centrálního hrotu tvořen sklovinným hřebenem (obr. 5C). Hřebeny obou hrboleků se na mesiální a distální straně zubu spojují v jeden mesiální a jeden distální hřeben který jde dále napříč celou zubní korunkou až k její bázi (obr. 5D). Zuby, které kalcifikují postnatálně jsou čtyřhrbolkové s centrálním konem rozděleným na malý labiální a

linguální hrbolek. Na meziální a distální straně zubní korunky se nachází velmi malé hrbolky (obr. 2A,C-D). Pátý a šestý hrbolek na bázi zubní korunky jsme u mladého a dospělého jedince nepozorovali, pravděpodobně díky jejich vymizení při abrazi zubů. Tvar zubů mineralizujících v průběhu embryonálního vývoje se v průběhu života mění díky zubní abrazi. U dospělého jedince byly zuby obroušeny téměř až k vrstvě cementu spojujících báze zubů dohromady. Vznikla tak ostrá hrana podobná okraji čelistí želv (obr. 2C-D).

5.3.2. Vývoj uspořádání zubů v čelisti

Vývoj dentice u chameleona začíná vývojem vaječného zubu v premaxillární oblasti. V době, kdy vaječný zub kalcifikuje již mineralizují také čelistní kosti. Později ve stádiu 38, v době když jsou vytvořeny mineralizované čelistní kosti po celé délce čelistních oblouků, byly přítomny dva kalcifikující zubní zárodky v maxillární oblasti. Mandibula byla v této době bez kalcifikujících zubních zárodků, vývoj zubů v horní čelisti tedy začíná o něco dříve. Na základě stupně mineralizace je evidentní, že první zub v maxillární oblasti vzniká v její distální části na zubní pozici 9, zatímco druhý zub se tvoří meziálně k prvnímu na pozici 7 (obr. 1A). Mezi těmito zubními zárodky je přítomna široká mezera bez kalcifikujících zubů (obr. 1A). Mineralizace vaječného zubu byla u tohoto embrya mnohem pokročilejší ve srovnání se zuby nalezenými v maxille (obr. 1A). Embryo ve 40. stádiu mělo přítomno 8 kalcifikujících zubních zárodků v kvadrátu dolní čelisti (obr. 1B) a devět v kvadrátu horní čelisti (počítaje s vaječným zubem – celkově tedy 17 zubů v horní čelisti). Stupeň mineralizace zubů byl o trochu pokročilejší v horní čelisti než v čelisti dolní. Ze stupně mineralizace zubů je i v tomto stádiu patrné, jak se zubní vzor ustanovuje mezi stádiem 38 a 40. V dolní čelisti se první zub vyvíjel na pozici 7, druhý na pozici 5, třetí na pozici 3, čtvrtý na pozici 6, pátý na pozici 8, šestý na pozici 4, sedmý na pozici 1, osmý na pozici 2 (obr. 1B). Postup vývoje uspořádání zubů v maxille je podobný jako v čelisti dolní. Později ve stádiu 41 jsme našli devět kalcifikujících zubů v dolní čelisti, přičemž devátý zub vzniká na 9. zubní pozici (obr. 1C). V horní čelisti jsme našli jedenáct kalcifikujících zubních zárodků. Na základě stupně mineralizace zubů vzniká jedenáctý zub pravděpodobně na druhé pozici a je tedy zubem premaxillárním. Blízko konce embryonálního vývoje jsme pozorovali na histologických řezech v dolní čelisti vyvíjející se desátý zub na desáté pozici a v horní čelisti dvanáctý zub na dvanácté zubní pozici. Tyto zuby vznikají hlouběji v mezenchymu, kalcifikují až postnatálně a tvoří první zub druhé série větších zubů

popsaných výše. Z uvedeného postupu vývoje uspořádání zubů v dentici je patrné, že ke konci embryonálního vývoje se začínají tvořit nové zuby na distálním konci zubní řady. Charakter tohoto vzniku nových zubních pozic pak pokračuje v postnatálním životě chameleona.

5.3.3. Vývoj funkčních zubů: stádium pupene až zvonku

Všechny zuby, které se vyvíjí u chameleona vznikají jako manifestace procesu interakce zubní lišty a mezenchymu. Zuby, které mineralizují v průběhu embryogeneze se zakládají blízko orálního epitelu. Zuby mineralizující postnatálně se zakládají hlouběji v mezenchymu. První stádia vývoje zubů jsme pozorovali u embryí stádia 37 a 39, ačkoliv úplně první zuby začaly vznikat o něco dříve. Známkou počínajícího vývoje zubů je přítomnost kondenzovaného mezenchymu okolo distálního čela zubní lišty. Přítomnost této kondenzace předchází vzniku histologicky zřetelného epiteliálního pupenu (obr. 4A). Ten vzniká později z vnější epiteliální vrstvy zubní lišty, která sousedí s mezenchymatickou kondenzací. Pupen se vyvíjí na distálním konci labiální strany zubní lišty (obr. 4B). Tvoří ho shluk buněk jasně odlišitelných od okolních buněk zubní lišty (obr. 4B). Tato struktura se s rozvojem pupenu rozrůstá centrifugálně a nabývá tvaru plochého disku složeného z několika vrstev buněk (obr. 4C). Jejím nejširším místem je v jejím středu. Z vrstvy buněk plochého disku sousedící s mezenchymem se v průběhu přechodu ze stádia pupenu do stádia pohárku diferencuje IDE vznikajícího sklovinného orgánu. Celá struktura při tom nabývá konkávního tvaru (obr. 4B). Kulovité a kubické buňky IDE se v časném stádiu pohárku prostorově organizují ve zřetelnou vrstvu. V distální části sklovinného orgánu se diferencuje cervikální klička s menšími buňkami ve svém vnějším epitelu. Cervikální klička, ODE a střední vrstva buněk sklovinného orgánu jsou od sebe jasně morfologicky odlišitelné od stádia pohárku (obr. 4D). Ve středu původně diskovité struktury jsme na konci stádia pohárku pozorovali první apoptotická tělíčka (obr. 4E). Na základě prostorového uspořádání buněk vzniká z původně diskovité struktury částečně střední vrstva sklovinného orgánu. Ve centru původně diskovité struktury lze rozeznat kulovitou strukturu, která je patrná po celou dobu trvání stádia pohárku (obr. 4D-E). Buňky původně diskovité mnohvrstevné struktury přilehlé k IDE jsou tvořeny buňkami téměř celými vyplněnými buněčnými jádry. Část středních vrstev vzdálenějších od IDE nabývá charakteru hvězdicovitého retikula, které není ve stádiu pohárku histologicky odlišitelné od střední vrstvy zubní lišty (obr. 4D-E). V průběhu tohoto stádia začíná růst sklovinný orgán asymetricky a linguální

strana sklovinného orgánu je v této fázi vývoje zubního zárodku delší ve srovnání se stranou labiální. Linguální strana je přitom tenčí oproti straně labiální (obr. 4E).

Při přechodu ze stádia pohárku do stádia zvonku, které jsme pozorovali na některých zubních pozicích také u stádia 37, se střední vrstvy sklovinného orgánu začínají odlišovat od středních vrstev zubní lišty (obr. 5A). Několikvrstevná struktura buněk původně tvořící disk je v tomto stádiu stále zřetelná. Jádra buněk v centru IDE jsou větší ve srovnání s pozdním stádiem pohárku a poukazují na počátek diferenciaci těchto buněk v ameloblasty (obr. 5A). Asymetrický vývoj sklovinného orgánu je ve stádiu zvonku více zřetelný. Linguální strana sklovinného orgánu je ve stádiu zvonku širší oproti labiální. Dochází tedy k inverzi šířky stran sklovinného orgánu ve srovnání se stádiem pohárku. Vrstva hvězdovitého retikulum je na linguální straně mohutnější než na straně labiální (obr. 5A). Vnější sklovinný epitel je tvořen kompaktní vrstvou buněk. Velikost těchto buněk je podobná jako u IDE v oblasti cervikální kličky. Mezenchymatické buňky zubní papily sousedící s IDE jsou kulovité a větší než zbytek buněk uvnitř papily. To poukazuje na jejich postupnou diferenciaci ve funkční odontoblasty (obr. 5A). Okolo zubního zárodku je patrná vrstva mezenchymatických buněk tvořící zubní váček (obr. 5A).

5.3.4. Mineralizace zubní korunky

Proces mineralizace zubní korunky jsme pozorovali od 40. stádia vývoje embrya. Mineralizace zubů s mesiálními a distálními hrbolky začíná vznikem centrálního hrotu (obr. 5B). Mesiální a distální hrbolky mineralizují později a nezávisle a postupně fúzí s mineralizujícím centrálním konem (obr. 1C). Tvorba dentinu začíná dříve než tvorba skloviny a to v proximální části zubní papily sousedící s centrální vrstvou IDE. Depozice dentinu následuje vlnu diferenciaci odontoblastů a šíří se centrifugálně směrem distálním (obr. 5B). Uvnitř dentinu jsou patrné rozvětvené odontoblastické výběžky vybíhající ze sekrečního čela odontoblastů. Odontoblasty jsou cylindrické a polarizované s jádry umístěnými na distálních buněčných pólech (obr. 5B). Buňky IDE postupně dozrávají ve funkční polarizované ameloblasty s jádry na distálních buněčných pólech. Nejzralejší a největší ameloblasty se v této fázi vývoje nachází ve středu IDE. Vlna zrání ameloblastů se šíří podobně jako volna odontoblastů centrifugálně od centra IDE. Velikost buněk IDE se zmenšuje směrem distálním, což odráží stupeň jejich zralosti (obr. 5B). Znamky diferenciaci ameloblastů končí v úrovni distálního čela zvětšující se dentinové části zubu. Od této úrovně jsou buňky IDE tvořící distální část sklovinného orgánu kubické či

kulovité (obr. 5B). Hvězdicovité retikulum je v tomto stádiu ve srovnání se stavem u gekona *Paroedura picta* (Zahradnicek et al., submitted) hypertrofované. Mezi centrální částí IDE a zubní lištou se nachází buněčná struktura nemající podobu retikula. Tato struktura, zřejmě pocházející z původní diskovité struktury, tvoří u chameleona pruh buněk jdoucí mesio-distálním směrem (obr. 5B).

Další vývoj je charakteristický tvorbou skloviny a další depozicí dentinu. V průběhu mineralizace sklovinný orgán dále roste a jeho proximální část se dostává do blízkosti orálního epitelu (obr. 5C-D). Vnější sklovinný epitel se dostává do kontaktu se zubní žlázou, která se diferencovala ze stejného základu jako zubní lišta (obr. 5C). Asymetrie sklovinného orgánu byla v pozdním stádiu mineralizace méně patrná ve srovnání s předešlými stádii (obr. 5C-D). Labiální strana sklovinného orgánu v oblasti cervikální kličky byla na průřezu užší než strana linguální (obr. 5C-D). Z prostorového uspořádání buněk vyvozujeme, že v oblasti cervikální kličky se tvoří distální část střední vrstvy sklovinného orgánu z IDE. Tato vrstva nemá v oblasti cervikálních kličky retikulární charakter (obr. 5C-D). V této fázi vývoje zubu se začíná diferencovat z linguální strany ODE poblíž cervikální kličky zubní lišta (obr. 5C-D). Prvním znakem iniciace jejího vývoje z ODE je hypertrofie této vrstvy v místě jejího vzniku (obr. 5C-D). Zralé ameloblasty v mineralizačním stádiu dávají vznik sklovině. Její tvorba se šíří centrifugálně od středu IDE a tvoří kryt dentinové části zubu (obr. 5C-D). Rozdílnou depozicí skloviny se vytváří podobně jako u *P. picta* labiální a linguální zubní hrbolk na centrálním konu zubu (obr. 5C). Nejmhutnější vrstva skloviny se nachází v oblasti hřebenů a nejtenčí mezi labiálním a linguálním hrbolkem (obr. 5C). Přes meziální a distální část zubu jde sklovinný hřeben ve směru mesio-distálním, který vzniká podobně jako labiální a linguální hrbolk odlišnou depozicí skloviny (obr. 5D). Buněčná struktura bez velkých mezibuněčných prostor v proximální části sklovinného orgánu je stále patrná (obr. 5C-D). Pozdější mineralizace meziálních a distálních hrbolků u vícehrbolkových zubů má podobný průběh jako tvorba centrálního konu s tím rozdílem, že se na špičce těchto bočních hrbolků nevytváří hrbolky dva (obr. 5D). S postupem mineralizace bočních hrbolků a centrálního hrotu dochází k jejich fúzi v jeden mohutný mnohohrbolkový zub.

5.3.5. Vývoj zubní báze a akrodontní ankylózy

Počátek vývoje krátká dentinová zubní báze jsme pozorovali u zubů embrya ve 44. stádiu vývoje. Mineralizace zubní korunky byla v tuto dobu u konce. Proximální

část sklovinného orgánu se dostává do přímého kontaktu s orálním epitelem a zubní zárodek zřetelně promínuje do dutiny ústní (obr. 6A). Zubní žláza je v přímém kontaktu s labiální stranou sklovinného orgánu v oblasti zubní korunky (obr. 6A, D). Organizace sklovinného orgánu je v oblasti zubní báze charakteristická jednodušším uspořádáním. Buňky IDE jsou v oblasti zubní báze menší a nedozrávají ve funkční ameloblasty (obr. 6A-E). Hranice mezi ektodermem a mezenchymem zde není mnohdy patrná. Vizualizovali jsme tedy ektoderm, který je charakteristický přítomností cytokeratinů, imunohistochemicky. Přítomnost cytokeratinů je v obrazové dokumentaci znázorněn tmavě hnědou barvou (obr. 6B-C, E). Sklovinný orgán v oblasti formování zubní báze je na své labiální straně tvořen dvěma vrstvami, IDE a ODE (obr. 6D). Na některých řezech bylo nalezeno mezi IDE a ODE několik buněk střední vrstvy sklovinného orgánu (obr. 6B). Struktura této části sklovinného orgánu má tedy charakter HERS. Linguální strana sklovinného orgánu je v úseku tvorby zubní báze tvořena třemi vrstvami. Střední vrstva je zde více rozvinutá a spojitá (obr. 6A,C). Z linguální strany sklovinného orgánu vybíhá zubní lišta, která však neprodukuje v průběhu embryogeneze žádné zubní zárodky náhradních zubů (obr. 6A,C). Buňky mezenchymu přilehlé k IDE sklovinného orgánu v oblasti zubní báze diferencují ve funkční odontoblasty a tvoří dentin, v kterém jsme nepozorovali zřetelné odontoblastické výběžky (obr. 6D).

Distálního okraje sklovinného orgánu, jehož růst se zastavuje před tvorbou ankylózy, je obklopen skupinou zrajících odontoblastů (obr. 6E). Tyto buňky pak vytvářejí samotný konec dentinové zubní báze, která v konečném stádiu přesahuje úroveň distálního konce sklovinného orgánu (obr. 6A). Zubní báze se v dalším stádiu vývoje spojuje prostřednictvím cementu s čelistní kostí. Z histologických řezů je patrné že kulovité cementoblasty mají původ z mezenchymatických buněk a produkují cement, v kterém jsme pozorovali kolagenová vlákna jdoucí mezi kostí a dentinem (obr. 6F). Akrodontní ankylóza se tvoří mezi výběžky čelistních kostí a zubní bází (obr. 7B,D). Rozdíly mezi cementem, kostí a dentinem jsou patrné na odstínech lososové barvy u ještě ne plně mineralizované tkáně (obr. 7B). Později, když je mineralizace ankylotického spojení kompletní, není hranice mezi kostí, cementem a dentinem s použitím barvení haematoxylinem a eosinem rozlišitelná. Prostřednictvím cementu se také k sobě připojují zubní báze sousedních zubů (obr. 7B). V průběhu vzniku ankylózy se buňky IDE v oblasti zubní korunky zmenšují a buňky hvězdicovitého retikula a ODE se zplošťují (obr. 7C). Ve sklovinných orgánech meziálních zubů jsme našli velký shluk buněk na linguální straně sklovinného orgánu blízko orálního epitelu (obr. 7B-C). V případě těchto

zubů se zplošťování buněk hvězdicovitého retikula a ODE týkalo jen strany sklovinného orgánu, kde nebyla tato buněčná struktura přítomna. Podobná masa buněk nebyla v mladších vývojových stádiích přítomna (obr. 7C). V distálních zubech jsme ve sklovinném orgánu tuto strukturu nepozorovali. V době tvorby ankylózy již byly v zubní papile přítomny cévy (obr. 7D).

5.4. Dentice chamaeleolisů: malakofágní adaptace, změny v dentici v postnatálním vývoji

Tato studie byla vypracována díky poskytnutí embryonálního materiálu a uhynulých dospělých zvířat Mgr. Veronikou Holářovou (katedra zoologie, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy). Chamaeleolisové jsou známí svou malakofágní adaptací, která se výrazně projevila na dentici (Estes et Williams, 1984). U dvou druhů určitých druhů bylo posáno, že dochází v průběhu života ke změnám tvaru zubů v zadní části čelisti z trikonodontních na molariformní s širokou zaoblenou korunkou. Detailní popis těchto změn však publikován nebyl. V této publikaci jsme se zaměřili na detailní identifikaci změn v dentici mezi první funkční zubní generací a funkční generací zubů u plně vzrostlých dospělých jedinců. Z charakteru dentice jak první funkční generace tak funkční generace dospělých zvířat jsme vyvodili jejich pravděpodobné potravní adaptace o kterých se z volné přírody de facto nic neví. Z níže uvedeného popisu je také zjevné, že charakteristika dentice pravděpodobně odráží fylogenetické vztahy jednotlivých druhů. To jestli je tato hypotéza správná do budoucna ukáže případná molekulární studie. Při výzkumu jsme použili dolní čelisti čtyř známých druhů chamaeleolisů z pěti. Jako druh s plesiomorfními znaky v dentici, který není malakofágně přizpůsobený jsme vybrali chamaeleolisům fylogeneticky blízký druh *Anolis barahoe*. Vzhledem k přirozenému úhynu nebyla porovnávány stejně stará embrya ani dospělí jedinci. To se promítlo zejména na charakteristikách zubního připojení a známek zubní resorpce v dentici embryí před vylíhnutím. Například u *A. barahoe* nebyla většina zubů ještě připojena k čelistním kostem. U jiných naopak byla pozorována resorbce zubní báze některých zubů, poukazující na přípravu k jejich obměně zuby náhradní generace. Vzhledem k vzácnosti bylo použito od každého druhu po jednom jedinci. Obrazová dokumentace, ke které se v textu odkazují, je v příložené příloze číslo 5.

5.4.1. *Anolis barahoe*

U embrya před vylíhnutím bylo přítomno v dolní čelisti 18. vytvořených zubních pozic. Většina zubů u tohoto jedince je ve fázi pokročilé mineralizace zubní báze před vytvořením ankylózy (obr. 1A-D). Pouze 6 zubů je připojeno ke kosti. Mezery mezi jednotlivými zuby jsou velké. Zubní korunky výrazně přesahují okraj čelistní kosti (obr. 1A). Velikost zubů se v dentici zvětšuje ve směru mesio-distálním (obr. 1A). Na prvních devíti pozicích se nachází konické až cylindrokonické zuby s náznakem rozdělení špičky na labiální a linguální zubní hrbolek. V místě hrbolků jsou vytvořeny nízké sklovinné hřebeny jdoucí napříč špičkou zubu v mezio-distálním směru (obr. 1B-C). Na 10. zubní pozici se nachází malý konický zub nulté generace, který je připojen k čelisti. Špička tohoto zubu není rozčleněna sklovinnými hřebeny na dva hrbolky (obr. 1C). Na 11. zubní pozici se ještě nachází cylindro-konický zub. Jeho mesiální a distální část je však oproti předešlým zubům rozšířena (obr. 1C). Podobnou morfologii má mineralizující zub na pozici 12, u kterého je vyvinuta jen špička korunky. Z pohledu na rostoucí distální část korunky (ve smyslu proximo-distálním) tohoto zubu je patrné, že rozšíření zubu do stran nevzniká pouhou mohutnější depozicí skloviny, ale také rozšířením zubní papily do stran a pozdější depozicí dentinu tento tvar fixujícího (obr. 1C). Korunka zubu na pozici 13. má vedle masivního centrálního hrotu vytvořen mesiální a distální boční hrbolek a je tedy trikonodontní. Tyto boční hrbolky jsou připojeny k centrálnímu konu poměrně nízko a úhel mezi stranou bočního hrbolku přivrácenou k centrálnímu konu a vertikálou (dále jen úhel nasazení bočního hrbolku) je tupý (obr. 1C). Další zub na pozici 14. je konický a subtilnější než zub předchozí. Svou morfologií připomíná spíše zuby z meziální části čelisti, nebo vyvinutější zub nulté generace (obr. 1C). Na 15. zubní pozici se nachází opět trikonodontní zub. Úhel nasazení bočních hrbolků je pravý. Tyto hrbolky jsou připojeny k centrálnímu hrotu nízko (obr. 1D). Zuby na 16. až 18. zubní pozici jsou také trikonodontní. Úhel nasazení bočních hrbolků je ostrý. Boční hrbolky u těchto zubů jsou připojeny k centrálnímu konu také poměrně nízko (obr. 1D).

U dospělého jedince jsme napočítali v dolní čelisti 33 zubních pozic. Mezery mezi zuby jsou menší než u embrya. Větší mezery jsou mezi korunkami a menší či téměř chybějící v oblasti zubních bází. Okraj čelisti přesahují pouze konce zubních korunek (obr. 2A). Zubní resorpce, pokud je přítomna, začíná nejčastěji ve středu či mírně mimo střed zubní báze v místě linguální části ankylózy (obr. 2B-D). Prvních 18. zubů je konických, zub na 14. pozici je vypadlý a náhradní zub byl ztracen v průběhu

preparace (obr. 2B-C). Zub na 19. pozici má zřetelně rozšířenou mesiální a distální stranu zubu (obr. 2C). Zuby na 20. a 21. pozici jsou tvořeny dvěma rovnocennými hrboly. Tyto zuby z vnějšku vypadají jako by vznikly splynutím dvou konických zubů (obr. 2C). Dvacátý druhý zub je trikonodontní. Úhel nasazení bočních hrbolků je tupý (obr. 2C). Dvacátý třetí a 24. zub mají vytvořený mesiální boční hrbol s tupým úhlem nasazení. Distální strana těchto zubů má místo hrbolku patrné rozšíření (obr. 2C). Zub na 25. pozici nemá boční hrbolky, na jeho meziální a distální straně je patrné rozšíření zubu (obr. 2D). Dvacátý šestý zub má drobný mesiální boční hrbol s pravým úhlem nasazení. Jeho distální boční strana je rozšířená (obr. 2D). Dvacátý sedmý zub má jen centrální konus s bočním rozšířením na mesiální a distální straně. Tyto dva zuby jsou signifikantně menší než 25. a následný 28. zub, jehož rozšíření do boků nabývá téměř charakteru hrbolků s tupým úhlem nasazení (obr. 2D). Dvacátý devátý zub má vytvořený mesiální hrbol s tupým úhlem nasazení k centrálnímu hrotu. Jeho distální strana má charakter rozšíření (obr. 2D). Třicátý až 32. zub jsou trikonodontní. Boční hrbolky svírají s vertikálou pravý úhel. Třicátý zub je signifikantně menší než 31. a 32. zub (obr. 2D). Třicátý třetí zub je oproti 32. zubu menší a má na meziální straně boční hrbol s tupým úhlem nasazení. Jeho distální strana je pouze rozšířená (obr. 2D).

5.4.2. *Chamaeleolis barbatus*

V dolní čelisti embrya těsně před vylíhnutím jsme napočítali 18. zubních pozic (Obr. 3A-C). Všechny zuby až na zuby na 4. a 13. pozici jsou připojené ke kosti (obr. 3B-C). Mezery mezi zuby jsou oproti *A. baracoae* menší. Zubní korunky velkou částí přesahují okraj kostí dolní čelisti. Sedm připojených zubů vykazuje na své zubní bázi známky resorbce (obr. 3B-C). Ta začíná ve středu či v distální (ve smyslu mesio-distálního směru) části linguálního okraje zubní báze. Resorbce distální části bází zubů byla přítomna zejména v distální polovině dentice. Zuby jejichž báze byly resorbovány se připravovaly k obměně již před vylíhnutím (obr. 3A-C). Špičky konických až cylindrokonických zubů, nebo špičky centrálních konů u vícehrbolkových zubů jsou rozděleny na labiální a linguální malý hrbol (obr. 3B-C). Délka zubů a jejich mohutnost se mesio-distálním směrem až na výjimky zvětšuje (obr. 3A). Prvních sedm zubů je konických až cylindrokonických (obr. 3B). Osmý až 11. zub má distální boční hrbol. Jeho úhel nasazení k centrálnímu hrotu je ostrý. Hrbolky jsou připojeny k centrálnímu hrotu poměrně nízko (obr. 3B-C). Dvanáctý, 14. a 16. – 18. zub jsou trikonodontní s bočními hrboly vysoko připojenými k centrálnímu konu. Jejich úhel

nasazení je ostrý. Na 13. zubu není patrný jeho výsledný tvar jelikož jeho vývoj je v časně fázi mineralizace. Patnáctý zub je na své mesiální straně rozšířen. Distální stranu tohoto zubu tvoří hrbolek s ostrým úhlem nasazení (obr. 3C).

U dospělého jedince bylo v dolní čelisti 20 funkčních zubů (obr. 4A-C). Velikost zubů a jejich mohutnost se zvětšuje v mesio-distálním směru s výjimkou dvou nejdistančnějších zubů, které jsou menší než mesiálně umístěné sousední zuby (obr. 4A). Pokud jsou u zubů přítomny boční hrboleky, jsou miniaturní, téměř neznatelné (obr. 4B). Mezery mezi zuby jsou poměrně velké v mesiální části dentice, naopak v distální části se sousední zuby téměř dotýkají a náhradní zuby se stávají funkční zároveň se zbytky zubů předchozí funkční generace (obr. 4A-C). V této části dentice je tak vytvořeno kompaktní, místy dvojřadé zubní pole (obr. 4C). Zubní korunky významněji přesahovaly okraj čelistní kosti pouze v mesiální polovině dentice (obr. 4A-B). V přední části dentice vznikají náhradní zuby v oblasti středu spodního okraje zubní báze (obr. 4B). Ve střední části dentice jsme našli náhradní zuby umístěné mírně mesiálně od středu právě funkčního zubu (obr. 4B). V distální části dentice jsou náhradní zuby umístěné distálně, nebo meziálně od středu funkčních zubů předešlé generace. V této oblasti jsme našli známky resorbce i ve střední části spodního okraje zubní báze (obr. 4C), což napovídá o umístění náhradního zubu ve stejné pozici jako je umístěn právě funkční zub. Prvních pět zubů je konických až cylindrokonických (obr. 4B). Šestý a 7. zub mají vytvořeny miniaturní distální boční hrboleky připojené nízko k centrálnímu hrotu. Osmý až 11. zub má vytvořen mesiální i distální miniaturní zubní hrbolek (obr. 4B). Od 11. zubu narůstá výrazně masivnost a zaoblenost zubů. Středem zubní korunky tohoto a následných zubů jde mesio-distálním směrem malý sklovinný hřeben (obr. 4B). Dvanáctý zub podléhá resorbci, která probíhá v mesiální polovině zubní báze. Distální část zubu je bez patrných znaků po resorbci (obr. 4B). Třináctý zub má celou distální polovinu resorbovanou. V místě resorbce se nachází náhradní 14. zub, který je patrně již funkční stejně jako polovina jeho předchůdce (obr. 4C). Patnáctý zub je z jedné třetiny resorbován ve své distální části. Známky resorbce jsou patrné i ve středu okraje zubní báze. To poukazuje že tento zub je nahrazován postupně dvěma zuby (obr. 4C). Šestnáctý zub zaplňuje prostor resorbované distální části 15. zubu a je tedy jeho náhradním zubem. Stejně jako v případě 14. zubu je tento zub pravděpodobně funkční zároveň se zbývajícím částí zubu předešlé generace (obr. 4C). Sedmnáctý zub je téměř kompletně resorbován, zbývá z něj jen malá horní část korunky. Tento zub je nahrazován 16. zubem a zároveň 18. zubem, který je pravděpodobně také již funkční (obr. 4C). Devatenáctý zub je menší než 18. zub a

poslední nejdálší 20. zub je miniaturní v porovnání s předešlými distálními zuby (obr. 4C).

5.4.3. *Chamaeleolis porcus*

U embrya před vylíhnutím bylo přítomno v dolní čelisti kolem osmnácti zubních pozic. Zuby na prvních třech až pěti pozicích byly ztraceny v průběhu preparace čelistí. Jejich množství jsme odhadli na základě morfologie povrchu čelistní kosti, kde jsou patrná místa připojení zubů. Jejich tvar jsme odhadli z tvaru zubů v přední části horní čelisti a z tvaru zubů v přední části dolní čelisti u dospělého jedince. Vzdálenost mezi sousedními zuby je velká. Většina zubů je spojena svou bází s kostí (obr. 5A-C). Výjimku tvoří zuby ve fázi růstu na pozicích 11, 16 a 18 (obr. 5B-C). Zubní korunky výrazně přesahují okraj kostí dolní čelisti (obr. 5A-C). Šest zubů vykazuje znaky zubní resorbce, která povětšinou začíná ve středu či v distální části spodního okraje zubní báze (obr. 5B-C). Všechny pozorované zuby mají na zubní korunce vytvořen labiální a linguální malý hrbolek, či alespoň jejich náznak (obr. 5B-C). Prvních 8 zubů je konických až cylindrokonických (obr. 5B). Devátý a 10. zub mají na distální straně poměrně nízko pod špičkou centrálního konu vytvořené zřetelné rozšíření distální strany (obr. 5B). Jedenáctý zub je ve vývojové fázi mineralizace korunky. Rozšíření jeho bočních částí je patrné po obou stranách, přičemž na distální straně je zřetelnější a nabývá téměř charakteru hrbolku s tupým úhlem nasazení k centrálnímu hrotu (obr. 5B). Dvanáctý a 14. zub jsou trikonodontní se zřetelným mesiálním a distálním bočním hrbolkem s ostrým úhlem nasazení k centrálnímu konu. Tyto hrbolky jsou k centrálnímu hrotu připojeny nízko (obr. 5C). Třináctý zub je cylindrokonický s charakterem meziálních zubů. Je mnohem menší než jeho sousední zuby (obr. 5C). Patnáctý až 18. zub je podobný 12. a 14. zubu s tím, že jejich boční hrbolky jsou připojeny o trochu výše k centrálnímu hrotu (obr. 5C). Šestnáctý a 18. zub jsou ve fázi mineralizace zubní korunky (obr. 5C).

V dolní čelisti dospělého jedince bylo 16. zubních pozic (obr. 6A-C). Nejmenší a nejsubtilnější zuby se nachází v mesiální části čelisti. Ve střední a distální části čelisti je velikost zubů podobná. Mohutnost zubů se však v distální polovině dentice výrazně zvětšuje (obr. 6A). Mezery mezi zuby jsou zřetelné a to i v distální části čelisti. Zubní korunky velkou částí přecházejí přes okraj čelistních kostí (obr. 6A). Zubní resorbci jsme pozorovali pouze u 4 zubů a to ve střední části okraje zubní báze, popřípadě v distální části spodního okraje zubní báze (obr. 6B-C). Mesiální a distální zubní hrbolky jsou

přítomny pouze u zubů ve střední části dentice. U těchto zubů jsou hrbolky miniaturní (obr. 6B-C). První až 7. zub je konický až cylindrokonický (obr. 6B). Osmý zub má téměř nezřetelný mesiální a distální boční hrbolek s pravým úhlem nasazení. Tyto hrbolky jsou připojeny k centrálnímu hrotu poměrně vysoko (obr. 6B). Devátý zub nemá zubní hrbolky, ani zřetelné rozšíření bočních částí. Tvar jeho korunky je zaoblený (obr. 6B). Desátý zub má mesiální i distální boční hrbolek s ostrým úhlem nasazení. Jedenáctý zub nemá boční hrbolky, ale pouze mesiální a distální boční rozšíření korunky (obr. 6C). Dvanáctý a 13. zub má pouze náznak přítomnosti bočního hrbolku a to na mesiální straně (obr. 6C). Zuby na 14. až 18. pozici jsou mohutnější oproti meziálněji umístěným sousedům. Tyto zuby postrádají boční hrbolky (obr. 6C). Osmnáctý zub je ve stádiu mineralizace zubní korunky.

5.4.4. *Chamaeleolis chamaeleonides*

Embryo před vylíhnutím mělo v dolní čelisti vytvořeno 20 zubních pozic. Velikost zubů směrem mesio-distálním výrazně neroste, s výjimkou mesiálních zubů, které jsou mnohem menší oproti zbylým zubům v dentici. Mohutnost zubů se naproti tomu směrem distálním zvětšuje. Mezi zuby jsou poměrně velké mezery. Většina zubů je připojena k čelisti, pouze v distální části jsou dva mineralizující zuby. Zubní korunky velkou částí přecházejí přes okraj čelistních kostí (obr. 7A-C). Zubní resorbce, pokud je přítomná, začíná ve středu, v mesiální nebo distální části spodního okraje zubní báze. Špička korunky všech zubů je rozdělena na malý labiální a linguální hrbolek, nebo je přítomen alespoň náznak jejich vzniku (obr. 7B-C). Prvních jedenáct zubů je konických až cylindrokonických (obr. 7B). Dvanáctý zub má malý distální boční hrbolek nízko připojený k centrálnímu hrotu s tupým úhlem nasazení. Třináctý zub má malý mesiální i distální boční hrbolek s tupým úhlem nasazení k centrálnímu hrotu (obr. 7C). Trikonodontní 14. a 15. zub má vytvořený mesiální i distální boční hrbolek. Ty jsou připojeny k centrálnímu hrotu poměrně nízko. Úhel nasazení mesiálního bočního hrbolku u obou zubů je tupý, u distálního hrbolku 14. zubu ostrý a u 15. zubu tupý (obr. 7C). Šestnáctý až 20. zub má oba boční hrbolky zřetelnější než zuby předchozí. U nejdistančnějších zubů jsou boční hrbolky připojeny k centrálnímu konu poměrně vysoko a vytváří tak větší drtící plochu. Úhel nasazení těchto hrbolků je ostrý (obr. 7C). Osmnáctý zub nemá ještě úplně dotvořenou zubní bázi a 20. zub je ve stádiu mineralizace zubní korunky. Sedmnáctý zub podléhá resorbci, která je patrná jak na distální části zubní báze,

kde v prostoru resorbce dorůstá 18. zub, tak také ve středu spodního okraje zubní báze, kde se vyvíjí další náhradní zub (obr. 7C).

U dospělého jedince bylo přítomno v dolní čelisti 23 zubních pozic. Velikost zubů roste mesio-distálním směrem. Ve stejném směru výrazně roste i mohutnost zubů. Zuby velkou svou částí přečnívají přes okraj čelistních kostí pouze v mesiální části dentice. V distální části přečnívají zubní korunky přes okraj čelisti jen malou částí. Boční hrbolky nejsou přítomny vůbec. Mezery mezi zuby jsou přítomné. Zubní resorbce začíná vždy od středu spodního okraje zubní báze (obr. 8A-C). Prvních devět zubů je menších konických až cylindrokonických (obr. 8B). Zuby na 10. až 17. pozici jsou mohutnější se zaoblenější korunkou, svým tvarem tvoří přechod mezi mesiálními a distálními zuby (obr. 8B-C). Osumnáctý až 21. zub je mohutný molariformní s výrazně zaoblenější zubní korunkou ve srovnání s předešlými zuby (obr. 8C). Dvacátý druhý a 23. zub je malý. Dvacátý třetí zub ještě není připojen k čelistní kosti (obr. 8C).

5.4.5. *Chamaeleolis guamuhaya*

U embrya před vylíhnutím bylo přítomno v dolní čelisti 17 zubních pozic. Patnáct zubů bylo připojených ke kosti, dva zuby v distální části čelisti byly na počátku vývoje mineralizace. Velikost i mohutnost zubů směrem distálním poměrně výrazně roste. Mezery mezi sousedními zuby jsou velké. Velká část zubních korunek přečnívá nad úroveň okraje kostí dolní čelisti (obr. 9A-C). Špička centrální části korunky je u všech zubů rozdělena na labiální a linguální hrbolek, nebo je vytvořen alespoň náznak tohoto rozdělení. Zubní resorbce není patrná u žádného ze zubů patrná (obr. 9B-C). Prvních devět zubů je konických až cylindrokonických. První tři zuby a sedmý zub jsou významně menší ve srovnání s ostatními mesiálními zuby (obr. 9B). Desátý zub má vytvořený distální boční hrbolek, který je připojen k centrálnímu konu nízko. Jeho úhel nasazení je pravý (obr. 9C). Boční hrbolky u následujícího 11. až 13. zubu jsou připojeny k centrálnímu konu přibližně ve stejné výšce jako u 10. zubu. Úhel nasazení je ostrý. Jedenáctý zub má vytvořený mesiální i distální boční hrbolek, dvanáctý zub má pouze distální zubní hrbolek (obr. 9C). Třináctý, 14. a 16. zub mají vytvořen meziální i distální zubní hrbolek, přičemž 14. a 16. zub má boční hrbolky připojeny k centrálnímu hrotu ve srovnání s předchozími zuby výše (obr. 9C). Patnáctý a 17. zub je teprve na počátku své mineralizace. Jejich finální tvar se tak dá pouze odhadnout.

U dospělého jedince bylo přítomno v dolní čelisti 25 zubních pozic. Velikost a masivnost zubů se zvětšuje mesio-distálním směrem. Nejdistanější čtyři zuby se ve

směru distálním naopak zmenšují. Mezery mezi zuby jsou poměrně velké. Všechny funkční zuby, až na čtyři nejdistanější, přesahují velkou částí své korunky okraj dolní čelisti (obr. 10A-D). Mesiální a distální boční hrbolky jsou malé, ale ve srovnání s dospělými jedinci ostatních druhů chamaeleolisů poměrně výrazné ve střední části dentice. Zubní resorbce začínala vždy ve středu či mírně mimo střed spodního okraje zubní báze (obr. 10A-D). První až 4. zub jsou konické s patrným rozdělením špičky na labiální a linguální hrbolek (obr. 10B). Pátý a 6. zub mají vytvořen distální boční hrbolek, který je připojený nízko k centrálnímu hrotu korunky. Jeho úhel nasazení je u těchto zubů pravý (obr. 10B). Sedmý zub je podobně jako u embrya malý a konický. Jeho zubní báze je téměř úplně resorbována a tento zub je tak těsně před vypadnutím (obr. 10B). Tvar náhradního zuby se nám nepodařilo zjistit díky ztrátě zubů následných generací v průběhu preparace. Osmý až 13. zub mají podobně jako 6. zub pouze distální zubní hrbolek, který je nízko připojený k centrálnímu konu. Jeho úhel nasazení je pravý (obr. 10B-C). U 13. zuby je patrný náznak vzniku mesiálního bočního hrbolku (obr. 10C). Čtrnáctý a patnáctý zub mají vytvořeny dva boční hrbolky. Úhel nasazení mesiálního hrbolku je ostrý a distálního hrbolku tupý (obr. 10B-C). Šestnáctý zub má vytvořené pouze mesiální a distální rozšíření zubní korunky (obr. 10C). Sedmnáctý zub má vytvořen pouze mesiální boční hrbolek s pravým úhlem nasazení. Distální část zuby je rozšířena (obr. 10C). Osmnáctý až 25. zub boční hrbolky nemá. Tyto zuby jsou rozšířené na mesiální i distální straně (obr. 10D).

5.5. Vývoj jedových zubů a kanálku pro vedení jedu u chřestýšovce *Cryptelytrops albolabris*: role *Shh*, apoptózy a buněčné proliferace

Výzkum vývoje kanálku v jedových zubech chřestýšovce *Cryptelytrops albolabris* proběhl ve spolupráci s Dr. A. S. Tucker (Kings College London, Velká Británie). Tento projekt byl započat jako reakce na sporné názory ohledně vývoje kanálku v jedových zubech hadů.

Jedové zuby hadů fascinovaly vědce od 19. století, avšak až do doby publikace našeho článku o vývoji jedového zuby u chřestýšovce (Zahradníček et al., 2008) se vedly stále spory ohledně jeho vývoje. Materiál byl vzácný a všechny výzkumy byly omezeny na histologická zkoumání nebo pozorování povrchu vyvíjejících se zubů za využití rastrovací elektronové mikroskopie. V minulosti se vývoj kanálků snažili vysvětlit dvě teorie. První a zároveň učebnicová teorie říká, že jedový kanálek se vyvíjí skrze invaginaci části sklovinného orgánu jedového zuby (Tomes, 1876; Kochva, 1963;

Edmund, 1969; Haas, 1980; Lake et Trevor-Jones, 1987, 1995). Podle této teorie je první známkou vývoje kanálku vytvoření žlábků podél vyvíjejícího se jedového zubu. Tento žlábek se postupně prohlubuje a jeho boční strany splývají za vzniku centrálního kanálku. Šev patrný na vnější morfologii zubů u Elapidae a Atractaspidae a milná představa o fylogenetickém vztahu těchto skupin tak zapadaly do představy o postupné evoluci kanálku, na jejímž vrcholu byl jedový zub zmijovitých hadů. Tato teorie tedy brisně vysvětlovala přechod od zubů s žlábkem k zubům s uzavřeným kanálkem a podélným švem na povrchu a ve finále k zubům zmijovitých s kanálkem bez patrného švu na povrchu zubu. Recentní studie ale ukázala, že bazální skupinou moderních hadů jsou zmijovití a korunovou skupinou korálovcovití hadi (Vidal et al., 2007). Nemůže tedy platit předpoklad říkající že zmijí jedový zub se vyvinul z jedového zubu korálovcovitých. Druhá hypotéza pojmenovaná „brick chimney” říká, že jedový kanálek je tvořen přímo depozicí dentinu na distálním konci vyvíjejícího se jedového zubu od špičky k zubní bázi podobně jako když se staví komín (Klauber, 1939, 1956; Bogert, 1943). Tyto hypotézy byly na počátku 21. století testovány srovnáním vyvíjejících se jedových zubů zmijovitých a korálovcovitých hadů (Jackson, 2002b). V této práci byl pozorován povrch vyvíjejících se zubů zmije *Bitis arietans* (Viperidae) a kobry *Naja melanoleuca* (Elapidae) rastrovacím elektronovým mikroskopem. U všech zkoumaných jedinců se zuby vyvíjely přidáváním zubního materiálu na bázi rostoucího zubu bez patrných známek primárního vzniku invaginace (Jackson, 2002b). Tato data tak podporovala „brick chimney” hypotézu. Jacksonová (2002b) zmiňovala, že teorie invaginace byla vytvořena na milné interpretaci histologických řezů skrze pozorování otvorů kanálku. Jacksonová ale také zmínila, že hypotéza brick chimney je omezena na vizualizaci mineralizované tkáně a že invaginace může vznikat v časnějším stádiu vývoje zubů. K finálnímu zodpovězení otázky jak se jedový kanálek vyvíjí jsme se obrátili k metodám molekulární biologie a k imunohistochemii a zkoumali expresi *Shh*, buněčnou proliferaci a apoptózu ve vyvíjejících se jedových zubech *C. albolabris* (v publikaci uvedeného jako *Trimeresurus albolabris*). Na základě zkoumání vyvíjejících se jedových zubů šesti mláďat *C. albolabris* jsme zjistili níže uvedené. Obrazová dokumentace, ke které se v textu odkazují, je v příložené příloze číslo 6.

5.5.1. Popis jedových zubů

Plně vyvinuté jedové zuby *C. albolabris* jsou dlouhé, zahnuté a spojené s maxillou (obr. 1A). Uvnitř jedového zubu je uzavřen mineralizovaný kanálek, kterým

prochází jed ze zubní žlázy do kořisti. Kanálek nezabíhá až do špičky zubu, ale vyústí uje otvorem pod ní na ventrální straně zubní korunky. Tento otvor slouží k injikaci jedu do těla kořisti popřípadě útočníka. Druhý otvor, ke kterému se připojuje jedová žláza, se nachází na ventrální straně báze zubní korunky. Povrch zubu mezi otvory je hladký, bez známky přítomnosti švu, jehož přítomnost by mohla napovídat tomu, že kanálek vzniká invaginací sklovinného orgánu do zubní papily (obr. 1B–D). V horní čelisti bylo nalezeno osm kalcifikovaných či kalcifikujících zubů v různém stádiu vývoje (obr. 1E). Pouze jeden zub byl ale funkční a pevně připojený k maxille (obr. 1E-F). Sedm dalších zubů tvořilo náhradní jedovou dentici. Postup mineralizace jedových zubů probíhá od špičky k zubní bázi s postupnou tvorbou otvorů a kanálku (obr. 1E). Z příčných histologických řezů je evidentní, že jedový kanálek není umístěn volně v zubní papile, ale je spojen s ventrální stěnou zubu dentinem (obr. 2A-B). Toto spojení má charakter dvojvrstvé lamely. Mezi těmito dvěma vrstvami dentinu v lamelle je patrná linie švu (obr. 2C). Hloubka ani šířka této dvojvrstvé dentinové lamely není podél své délky konstantní. V oblasti hraničící s otvory je její hloubka redukována a v místě otvoru mizí (obr. 2D). U nejstaršího jedového zubu je kanálek prázdný a průchodný pro jed (obr. 2A-B), zatímco u náhradních zubů je vyplněn buňkami (obr. 2D).

5.5.2. Vývoj stádií jedových zubů před započatím mineralizace: exprese *Shh*

První stádia vývoje jedových zubů jsou velmi podobná vývoji zubů zbytku dentice. Procházejí stádiem pupenu, pohárku a zvonku. Ve stádiu pohárku jsme pozorovali tři morfologicky odlišné vrstvy sklovinného orgánu: IDE, ODE a střední vrstvu korespondující s hvězdicovitým retikulem. Vnitřní sklovinný epitel přechází v místě cervikální kličky v ODE. Cervikální klička aktivně roste a tvoří hraniční okraj vstupu do zubní papily. Buňky IDE exprimují ve stádiu pozdního pohárku *Shh*. Exprese *Shh* je v tomto stádiu slabá a je přítomná pouze v centru IDE (obr. 3A). Během časného stádia zvonku začínají centrální buňky IDE diferencovat v ameloblasty. Vlna diferenciacie ameloblastů se pak šíří centrifugálně směrem k cervikální kličce. V těchto diferencujících buňkách byla nalezena silná exprese *Shh*, která tak koresponduje s diferenciací vlnou ameloblastů (obr. 3B). Během stádia zvonku začínají být vrstvy mezi IDE a ODE více rozvinuté. Jakmile je diferenciacie ameloblastů u konce a ty začínají produkovat sklovinu, exprese *Shh* se vytrácí. K této ztrátě dochází nejprve v centru IDE a šíří se centrifugálně směrem distálním (obr. 3C-D). V průběhu těchto stádií zůstávají buňky IDE v oblasti cervikální kličky nediferencovány a jsou negativní na přítomnost *Shh*. Podobná dynamika

exprese *Shh* byla pozorována i v v IDE vyvíjejících se mandibulárních a palatálních zubů (obr. 3E–H). V tomto bodu se další vývoj jedových zubů a zubů zbytku dentice liší. Mandibulární a palatální zuby postupně vstupují do interakce s kostí a vytváří se ankylotické spojení, zatím co u jedových zubů se začíná vytvářet jedový kanálek s komunikačními otvory.

5.5.3. Invaginace vnitřního sklovinného epitelu

První známkou vývoje jedového kanálku je invaginace IDE do mezenchymu zubní papily (obr. 4A-C). Proces invaginace začíná na ventrální straně jedového zubu poblíž cervikální kličky a končí v době diferenciaci buněk invaginovaného IDE v ameloblasty. Vrstva IDE invaginuje hluboko do zubní papily a na příčném průřezu zubním zárodkem vytváří smyčku (obr. 4D). Společně s IDE invaginuje do zubní papily také střední retikulární vrstva sklovinného orgánu a vyplňuje prostor mezi stěnami smyčky z IDE. Kolem invaginovaného sklovinného orgánu se řadí buňky mezenchymu a vytváří vrstvu. Buňky této vrstvy se postupně prodlužují a dozrávají v tyčinkovité odontoblasty (obr. 4E). Diferenciaci mezenchymatických buněk v odontoblasty začíná na ventrální straně zubního zárodku, zatímco na dorzální straně ještě buňky zubní papily nediferencují. Jak se zub vyvíjí, dostávají se obě strany IDE v proximální části invaginace do kontaktu a vytvářejí tak dvojvrstvu mezi ventrální stěnou zubu a vznikajícím jedovým kanálkem. Střední vrstva buněk sklovinného orgánu v místě dvojvrstvy IDE mizí. Buňky retikula vyplňují trubici (na příčném řezu smyčku) tvořenou IDE a jsou izolovány od retikula zbytku sklovinného orgánu dvojvrstvou z IDE (obr. 4E). Buňky invaginovaného IDE nevykazují v iniciální fázi tvorby kanálku expresi *Shh*. Nalezli jsme pouze několik *Shh* pozitivních buněk v IDE na bázi invaginace (obr. 4F). Vlastní proces invaginace IDE a indukce diferenciaci odontoblastů je tedy nezávislá na signalizaci *Shh*. Stupeň buněčné proliferace v zárodcích jedových zubů jsme vizualizovali prostřednictvím imunohistochemické detekce PCNA (obr. 4G). Zárodky jedových zubů v časné fázi svého vývoje obsahují velké množství proliferujících buněk, jak v mezenchymu zubní papily, tak v epitelu sklovinného orgánu. V tomto stádiu dochází v invaginovaném IDE k buněčné proliferaci ve stejné míře jako v okolním IDE (obr. 4H).

5.5.4. Exprese *Shh* v průběhu tvorby jedového kanálku

Vymizení buněk retikula z oblasti dvojvrstvy tvořené IDE je následována rozpadem a vymizením buněk této dvojvrstvy. V procesu vymizení IDE dvojvrstvy se izoluje epiteliální kanálek od vnější stěny sklovinného orgánu. V tomto bodě vývoje jedového kanálku se objevuje na ventrální straně kanálku exprese *Shh* a to jak v IDE buňkách, tak v retikulární vrstvě (obr. 5A). Ve stejné době je pozorována exprese *Shh* na ventrální straně vnější části IDE. Exprese *Shh* se později šíří dorzálně a silně narůstá ve vrstvě retikula (obr. 5B). Tento nárůst koinciduje se zvýšením proliferační aktivity uvnitř kanálku a s jeho expanzí (obr. 5D–F). Exprese *Shh* byla také pozorována v IDE buňkách participujících na tvorbě skloviny vnější části zubu. Zde bylo také přítomno značné množství proliferačních buněk (obr. 5B, E). Míra buněčné proliferace je v této fázi vývoje kanálku větší v epiteliální části, než v mezenchymu zubní papily. Vymizení buněk z IDE dvojvrstvy umožnilo protilehlým odontoblastům dostat se do kontaktu svými sekrečními čely. Tyto odontoblasty pak naproti sobě produkují dentin za vzniku dentinové dvojvrstvy. V této době se vytváří i vrstva dentinu tvořící vlastní dentinový kanálek (obr. 5C). Vznikající kanálek je tak spojen dentinovou lamelou s vnější dentinovou stěnou zubu (obr. 2C). *Shh* pozitivní buňky IDE participující na vzniku kanálku. Se ztrátou exprese v IDE kanálku dochází také k vymizení signálu v retikulu, které kanálek vyplňuje (obr. 5G). Ztráta exprese *Shh* probíhá ve ventro-dorzálním směru. Ztráta exprese *Shh* v retikulárních buňkách kanálku je doprovázena sníženou proliferační aktivitou buněk retikula (obr. 5J). Jakmile ameloblasty plně dozrají, *Shh* exprese se úplně vypne a to jak v kanálku, tak ve sklovinném orgánu participujícím na vzniku vnější stěny zubu (obr. 5H). Synchronizace exprese *Shh* ve vnější vrstvě IDE a v IDE kanálku je vizualizována na sagitálních řezech (obr. 5K).

5.5.5. Role apoptózy v tvorbě jedového kanálku

Jakmile je kanálek vytvořen, je potřeba odstranit buňky z centra kanálku a vytvořit tak prostor pro průtok jedu (obr. 2A). Bylo ukázáno, že apoptóza hraje důležitou roli v procesu vzniku tvaru zubu u savců (Matalova et al., 2004) a také bylo ukázáno, že je přítomna ve stádiu pohárku a zvonku ve středních vrstvách sklovinného orgánu zubů nejedovatých hadů (Buchtova et al., 2008). Apoptózu jsme našli ve stádiu pohárku v buňkách přilehlých k centrálním buňkám IDE (data neukázána). Apoptóza nebyla pozorována v časných stádiích invaginace sklovinného orgánu a tvorby kanálku a ani v později mizející dvojvrstvě IDE v proximální části invaginace. Ztráta těchto buněk tedy

není řízena apoptózou (obr. 6A). Vysoký počet apoptotických buněk byl naopak pozorován v buňkách kanálku v jeho pozdním vývoji po vypnutí exprese *Shh*. Apoptotické buňky vyplňovaly jedový kanálek a ten byl tak postupně vyčištěn od buněk (obr. 6B-C). Apoptotické buňky byly také pozorovány okolo špičky zubu v místě ostrých hran zubu ve vrstvě buněk sklovinného orgánu přilehlé k IDE. Přítomnost apoptózy v tomto místě může souviset s přípravou zubu na erupci. Apoptóza tak usnadňuje jeho snadnější prožezání orální mukózou (obr. 6D).

5.5.6. Vývoj komunikačních otvorů jedového kanálku a role *Shh* v jejich morfogenezi

Otvory jedového kanálku se vyvíjejí podobně jako jedový kanálek s několika rozdíly. Pruh invaginovaného IDE a retikula je mnohem širší než v případě kanálku. Při invaginaci se tak na průřezu vytvoří půlměsíčitý tvar. Široká invaginace způsobí, že se nedostanou protilehlé IDE vrstvy do kontaktu a nevytváří se tak kanálek oddělený dvojvrstvou IDE a později dentinu. Hloubka a šířka invaginovaného IDE není konstantní. Pozorovali jsme postupné zmenšování šířky a zvětšení hloubky invaginace v místě otvoru poblíž špičky zubu ve směru proximo-distálním a v místě přechodu ke vstupnímu otvoru postupné zvětšování šířky a redukci hloubky invaginace ve směru proximo-distálním. Tato dynamika je patrná z histologických řezů (obr. 7A–F). Podobně jako u jedového kanálku exprimují buňky IDE *Shh*. Expres *Shh* se šíří ventro-dorzálním směrem. *Shh* se exprimuje v celém průběhu invaginujícího IDE na rozdíl od invaginace vytvářející jedový kanálek (obr. 7G-H). Buněčná proliferace byla pozorována ve zvýšené míře v distální části invaginovaného sklovinného epitelu (obr. 7I), což v případě kanálku nebylo pozorováno (obr. 4G). Je tedy pravděpodobné, že buněčná proliferace v oblasti otvorů participuje na vzniku širší invaginace IDE a retikula.

5.6. Diferenciace sklovinného orgánu a vývoj zubních hrbolků u šupinatých plazů: role *Shh*, buněčné proliferace, apoptózy a struktury sklovinného orgánu

Evoluce zubních hrbolků hrála jednu z důležitých rolí v radiaci obratlovců. Molekulární báze vzniku zubních hrbolků je relativně dobře známa z výzkumu vývoje myšího moláru, kde je jejich vývoj řízen z velké míry přechodnými signálními centry, sklovinnými uzly, skládajících se z neproliferujících buněk (Jernvall et al, 1994). Tato centra regulují vznik tvaru zubu specifickou expresí signálních molekul jako jsou *Shh*, *Fgf*, *Bmp* a *Wnt*, které ovlivňují buněčnou proliferaci v IDE a mezenchymu zubní papily

(Jernvall et al, 1994; Vaahtokari et al, 1996; Kettunen et al, 1998; Keranen et al., 1998; Jernvall et Thesleff, 2000; Salazar-Ciudad et Jernvall, 2002; Tucker et Sharpe, 2004). Sklovinné uzle vznikají v průběhu vývoje moláru několikrát. Primární sklovinný uzel (PEK) vzniká v pozdním stádiu pupene v meziální části špičky epitelálního pupene (Jernvall et al., 1994). Později ve stádiu pohárku je PEK situován ve středu sklovinného orgánu. Primární sklovinný uzel je důležitý pro diferenciaci sklovinného orgánu a tedy pro přechod zubního zárodku ze stádia pupene do stádia pohárku v jehož průběhu mizí prostřednictvím apoptózy (Lesot et al., 1996; Vaahtokari et al, 1996a; Jernvall et al, 1998, Peterkova et al., 2003). Sekundární sklovinné uzle (SEK) se objevují v molárech na místech vzniku zubních hrbolků moláru na konci stádia pohárku a začátku stádia zvonku (Jernvall et al., 1994; Kettunen et Thesleff, 1998). Bylo zjištěno že právě sekundární sklovinné uzle regulují uspořádání hrbolků zubní korunky (Jernvall et al., 1994) před tím, než jsou apoptózou odstraněny (Vaahtokari et al., 1996b). Expresí signálních molekul v PEK začíná v pozdním stádiu pupenu s objevením se tohoto signalizačního centra (Vaahtokari et al, 1996a; Jernvall et al, 1998). Dynamika exprese morfogenů v SEK je podobná jako u primárního sklovinného uzle (Keränen et al, 1998; Kettunen et al. Thesleff, 1998; Luuko et al., 2003). Sekundární a u myšího moláru ještě později pozorované terciární sklovinné uzle nevznikají v průběhu vývoje myších řezáků, tedy zubů s jednoduchým tvarem. Kromě savců byl sklovinný uzel pozorován pouze u krokodýlů, ale jen jako morfologicky rozlišitelná struktura identifikovaná na histologických řezech (Westergaard et Ferguson, 1987) bez molekulární evidence možné role signalizačního centra této struktury. Jestli buňky této struktury prolifерují a později podléhají apoptóze nebylo popsáno. Další morfologické studie zabývající se vývojem zubů u nesavčích obratlovců také neukázaly přítomnost sklovinných uzlů (Huysseune et Sire, 1998). Skrze současné poznání se věří, že sklovinné uzle jsou se svými charakteristikami signalizačních přechodných center výlučně savčí apomorfii. Vystávají tedy otázky, jakým mechanismem je řízen vznik zubních hrbolků u plazů a anamniot a jestli mají některé části zubních základů plazů charakteristiku blízkou sklovinným uzlům savců. Pokud ano, co je plesiomorfním stavem signalizačních center. K zodpovězení těchto otázek jsme zkoumali vývoj dvojhrbolkového zubu u gekona *P. picta* a zubů trikonodontních s mohutným centrálním konem, často rozděleným na malý labiální a linguální hrbolek, a s mesiálním a distálním menším bočním zubním hrbolkem u zástupců linie Iguania, chameleona *Ch. calyptratus* a *Ch. porcus*. Ve výzkumu jsme se obrátili k metodám molekulární biologie a imunohistochemie a zaměřili se na detekci

exprese *Shh*, jednoho z genů, který je exprimován v savčích sklovinných uzlech již od pozdního stádia popenu (Jernvall et al., 1994), v průběhu zubního vývoje *P. picta* a *Ch. calyptratus*. Pro pochopení buněčné dynamiky v zárodcích zubů v průběhu vývoje zubních hrbolků jsme se zabývali imunohistochemickou detekcí buněčné proliferace a apoptózy s doplněním o imunohistochemickou detekci proteinů extracelulární matrix, jako jsou kolagen I a II a fibronectin, které jsou součástí hvězdčovitého retikula savců (Thesleff et al., 1981, Webb et al., 1998). Pro srovnání jsme použili recentně publikovaná data exprese *Shh*, buněčné proliferace a apoptózy u několika druhů plazů (Buchtova et al., 2008, Zahradnicek et al., 2008, Handrigan et Richman, 2010a). U chamaeleolise, který má oproti chameleonovy výraznější mesiální a distální hrbolky a polyfyodontní dentici se nám podařilo, vzhledem k vzácnosti a nedostatku embryologického materiálu (měli jsme k dispozici pouze dvě embrya), vyzískat histologická data poukazující na mechanismus vzniku těchto bočních hrbolků. Níže uvedené výsledky byly získány ve spolupráci s Dr. A. S. Tucker. Obrazová dokumentace, ke které se v textu odkazují, je v příložené příloze číslo 7.

5.6.1. Vývoj zubních hrbolků u gekona *P. picta*: exprese *Shh*, buněčná proliferace a apoptóza

V časném stádiu pohárku, kdy se vyvíjí vrstvy sklovinného orgánu, jsme pozorovali shluk buněk labiálně od centra sklovinného orgánu. Tento shluk zahrnoval i buňky diferencující se vrstvy IDE a na druhé straně přímo sousedil s buňkami ODE (obr. 1A). Shluk buněk vykazuje od časného stádia pohárku vysokou míru exprese *Shh*, kterou jsme detekovali ve slabší míře i v okolních buňkách diferencující se vrstvy IDE. Expres *Shh* byla také přítomna na linguální straně orálního epitelu sousedícího se zubní lištou (obr. 1B). Na konci stádia pohárku tvořili buňky IDE zřetelnou epiteliální vrstvu. Labiálně od centra sklovinného orgánu je patrný pruh buněk sklovinného orgánu vmezeřený mezi distální částí IDE buněk. Tento pruh buněk se nachází v místě kde byl přítomný kulovitého shluku buněk ve stádiu pupenu a časného pohárku. Linguálně od vmezeřených buněk je vytvořena nad místem centra IDE vrstva z plochých buněk participující na středních vrstvách sklovinného orgánu. Střední vrstva je ve zbytku sklovinného orgánu tvořena kulovitými buňkami (obr. 2A). Ve pozdním stádiu pohárku je proliferačně aktivní celá vrstva IDE a ODE. Ve střední vrstvě sklovinného orgánu jsme buněčnou proliferaci nepozorovali (obr. 2B). Ve stádiu zvonku je patrný pruh vmezeřených buněk také na linguální straně IDE poblíž jeho centra. Buňky IDE se v

prostoru mezi vmezeřenými buňkami diferencují v ameloblasty, prodlužují se a stávají se cylindrickými. Buňky IDE v okolí tohoto shluku jsou vývojově na zřetelně nižším stupni diferenciace, jsou menší, ale jeví již známky polarizace. Centrální shluk buněk vytváří pruh jdoucí mezio-distálním směrem. Proximální čela centrálního shluku buněk se prodlužují při svém vývoji směrem do zubní papily. Papila tak získává tvar mající dva rohy. Tímto je vytvořen základ pro vznik labiálního a linguálního hrbolku (obr. 2C). Vrstva plochých buněk střední vrstvy sklovinného orgánu přiléhající k IDE, která je nejmohutnější v oblasti centrálního pruhu ameloblastů, expanduje centrifugálně a pokrývá téměř celou vrstvu IDE. V centrální části vytváří jakousi čepičku (obr. 2C). Mezenchymatické buňky zubní papily sousedící s centrálním shlukem ameloblastů jsou velké a diferencují v odontoblasty (obr. 2C). Expresi *Shh* jsme ve stádiu zvonku a časném stádiu sekrece pozorovali v IDE a slaběji ve vrstvě sklovinného orgánu sousedící s IDE. V době, kdy byla vytvořena tenká vrstva predentinu v místě přiléhajícím k centrálnímu pruhu IDE jsme pozorovali největší intenzitu a centrum exprese *Shh* v buňkách tvořících hranici mezi labiálním okrajem centrálního pruhu ameloblastů a labiální částí IDE. Další centrum silnější exprese bylo na protější straně taktéž v hraniční oblasti s centrálním pruhem ameloblastů. Oblast centrálního shluku ameloblastů a zbytek IDE až na cervikální kličku vykazovaly menší míru exprese *Shh* (obr. 2D). Ve stádiu zvonku v centrální části IDE tvořené ameloblasty a v místech největší exprese *Shh*, tedy na hranici s centrálním pruhem ameloblastů jsme nepozorovali buněčnou proliferaci. Ta byla naopak přítomna ve zbylé části IDE. Proliferačně aktivní byla také celá vrstva ODE a cervikální klička. Střední vrstva sklovinného orgánu nevykazovala proliferaci aktivitu (obr. 2E). V místě čepičky, kterou tvoří střední vrstva sklovinného orgánu nad centrálním shlukem ameloblastů jsme ve stádiu zvonku pozorovali masivní apoptózu. (obr. 2F).

Později na počátku mineralizace je základní dvojhrbolkový tvar zubní papily fixován sekrecí dentinu, která začíná od centra vrstvy odontoblastů, tedy v místě přilehlém k centrálnímu pruhu ameloblastů (obr. 3A). Ve stádiu mineralizace a tvorby zubních hrbolků byla stále patrná hranice mezi centrálním pruhem ameloblastů a sousedních ameloblastů. Vmezeřené buňky v tomto prostoru, který leží přesně v místech vznikajících hrbolků, byly stále přítomné (obr. 3A-B). Vrstva plochých buněk byla s postupem mineralizace v oblasti skloviny posunována blíže k ODE. Na konci tvorby sklovinných hrbolků byla vrstva plochých buněk přímo v kontaktu s ODE, který byl v místě přechodu v tkáň zubní lišty vícevrstevný. Expresi *Shh* postupně vymizela z

funkčních ameloblastů a byla soustředěna do buněk IDE, které právě diferencovaly a nebyly ještě sekrečně aktivní. Centrální pruh ameloblastů a ameloblasty přilehlé a hraniční buňky tedy expresi *Shh* v průběhu tvorby skloviny již nevykazovaly. Expres *Shh* nebyla přítomna také v cervikální kličce (obr. 3C). Buněčná proliferace byla v této fázi soustředěna do distální části IDE, cervikální kličky a celé vrstvy ODE a nevyskytovala se ve zrajících ameloblastech pozitivních na expresi *Shh* a ve zralých ameloblastech (obr. 3D). Vlastní zubní hrbolky se vytváří v průběhu mineralizace odlišnou depozicí skloviny, která je nejmohutnější v místech sklovinných hřebenů. Základem pro vznik labiálního a linguálního zubního hrbolku je tedy tvorba sklovinných hřebenů. Pruh centrálních ameloblastů vytváří ve středu zubu pouze velmi tenkou vrstvu skloviny. Vzniká tak žlábek mezi hrbolky tvořenými sklovinou (obr. 3D, F). Nad vznikajícími sklovinnými hřebeny nejsou distální části ameloblastů po obou stranách rozhraní v IDE v kontaktu. Vmezežené buňky zde stále tvoří klín. Naopak sekreční čela těchto ameloblastů v kontaktu jsou a svírají mezi sebou úhel, který je na počátku sekrece skloviny tupý. Tento úhel se postupně se růstem sklovinných hřebenů mění a stává se ostrým (obr. 3A-B, D,F). Ameloblasty po obou stranách rozhraní tedy secernují sklovinu naproti sobě. Vytváří se tak mohutnější vrstva skloviny. Tím jak se úhel mezi sekrečními čely stává ostrým, zmenšuje se šířka vrstvy skloviny a vytváří se ostrý sklovinný hřeben, který je základem hrbolků. V průběhu mineralizace jsme pozorovali apoptotické buňky nad centrálním pruhem ameloblastů (obr. 3E) a později i v centrálních buňkách IDE (obr. 3E). Vmezežené buňky v oblasti rozhraní mezi centrálním pruhem ameloblastů a sousedními ameloblasty a buňky přilehlé střední vrstvy sklovinného orgánu byly taktéž v průběhu pozdní mineralizace zubní korunky odstraněny apoptózou (obr. 3E-F).

V průběhu mineralizace zubní korunky jsme sledovali v zubních zárodcích přítomnost kolagenu I, II a fibronektinu. Kolagen I byl přítomen pouze v dentinu, predentinu a kostech, ale nebyl patrný ve středních vrstvách sklovinného orgánu (obr. 4A). Kolagen II jsme vůbec v zubních zárodcích nedetekovali, byl ale přítomen v chrupavkách. Fibronektin jsme pozorovali ve středních vrstvách sklovinného orgánu mimo centrum, které patrně nemá retikulární charakter. Fibronektin byl dále přítomen v predentinu a na hranici epiteliálních struktur a mezenchymu (obr. 4B).

5.6.2. Exprese *Shh*, buněčná proliferace a apoptóza ve vývoji předmineralizačních stádií zubů *Ch. calyptratus*

První stádium, ve kterém jsme detekovali expresi *Shh* v zubech *Ch. calyptratus* bylo stádium pohárku podobně jako u *P. picta*. V té době k IDE přiléhá více vrstev sklovinného orgánu pocházejících z původně diskovité struktury patrné na konci stádia pupenu. Z této diskovité struktury se diferencuje i vrstva IDE. Vrstva IDE ještě není v této fázi vývoje plně organizována do podoby kubického. Vrstva přilehlá k IDE je nejsilnější ve středu sklovinného orgánu a má podobu čepičky. Směrem k cervikální kličce se pak ztenčuje. Centrum vrstvy přilehlé k IDE je evidentně původním centrem diskovité struktury, která tvořila na svém počátku existence epiteliální pupen v jeho pozdní fázi vývoje. V oblasti cervikální kličky není tato vrstva patrná (obr. 5A). Exprese *Shh* je patrná ve stádiu pohárku ve vrstvě buněk IDE a to pouze v místech, kde k ní přiléhají další vrstvy buněk původní diskovité struktury. Největší koncentrace se nachází na labiálním okraji centrální části IDE. Slabá exprese byla pozorována v téměř celé vrstvě IDE mimo oblast cervikální kličky (obr. 5B). Na konci stádia pohárku se je proliferačně aktivní celá vrstva IDE kromě její centrální části, kde je patrný pokles proliferační aktivity. To označuje počínající diferenciaci centrálních buněk IDE v ameloblasty. Proliferace byla také přítomna v přilehlé vrstvě buněk sklovinného k IDE. Celý vnější sklovinný epitel vykazoval vysokou míru buněčné proliferace. Na počátku stádia zvonku má centrální a lingvální část IDE podobu kubického epitelu. Na labiální straně se ještě plně buňky IDE neodlišují od přilehlých buněčných vrstev původně diskovité struktury. Centrální buňky IDE v této fázi vývoje jeví morfologické známky diferenciaci v ameloblasty (obr. 5D). Střední vrstva sklovinného orgánu, přiléhající k vrstvě IDE, tvoří rozhraní mezi IDE a rozvíjejícím se hvězdovitým retikulem. To je mohutnější na lingvální straně sklovinného orgánu (obr. 5D). Na počátku stádia zvonku byla přítomna exprese *Shh* v celém nově definovaném IDE kromě cervikální kličky, a v přilehlých vrstvách sklovinného orgánu, pocházejících ze stejné buněčné populace jako IDE (obr. 5E). V pozdějším stádiu zvonku exprese *Shh* mizí z centra IDE, kde jsou již buňky plně diferencovány v ameloblasty, a přilehlé vrstvy buněk sklovinného orgánu (obr. 5F). Exprese *Shh* pak byla přítomná v diferencujících buňkách IDE a k nim přilehlé vrstvě buněk sklovinného orgánu. Nejsilnější expresi jsme pozorovali ve vrstvě buněk přímo přilehlé k IDE. Samotná IDE vykazovala nižší stupeň exprese *Shh* (obr. 5F). To bylo pravděpodobně způsobeno metodickým postupem a ne téměř chybějící expresí *Shh*. Ve stádiu zvonku jsme pozorovali apoptotické buňky ve střední vrstvě sklovinného

orgánu tvořící čepičku nad centrálními ameloblasty (obr. 6A). V pozdních mineralizačních stádiích vícehrbolkových zubů byla apoptóza patrná v buňkách přilehlé vrstvy k IDE a to v oblasti centrálního hrotu zubu a špiček bočních hrbolků. (obr. 6B). Apoptóza se v této fázi vývoje zubu nevyskytovala v hvězdicovitém retikulu.

5.6.3. Vývoj zubních hrbolků u chameleolise *Ch. porcus*

V distální čelisti *Ch. porcus* se nachází trikonodontní zuby s centrálním hrotem rozděleným na malý labiální a linguální hrbolok, podobně jako u *P. picta* nebo *Ch. calyptratus*. Mesiální a distální zubní hrbolky trikonodontních zubů první funkční generace jsou poměrně velké (obr. 7A) a vznikají později v době, kdy již centrální konus mineralizuje. Je to patrné z obr. 7A, kde sklovina pokrývá pouze špičku centrálního hrotu a zbytek zubu, včetně bočních hrbolků, je tvořen pouze centimem. Ten je charakteristický po vysušení popraskaným povrchem (obr. 7A). Dále je patrný pozdější vznik bočních hrbolků z obr. 7C, kde je přítomná mineralizace pouze centrálního hrotu a vývoj bočního hrbolku je teprve ve fázi diferenciacie buněk IDE a mezenchymu zubní papily. Centrální hrot s dvěma hrbolky se vyvíjí podobně jako u gekona či chameleona. Na detailu zubního zárodku s plně vytvořenou vrstvou skloviny v oblasti labiálního a linguálního zubního hrbolku je patrný centrální pruh ameloblastů. Jeho okrajové buňky svírají na jedné straně tupý úhel s ameloblasty druhé strany rozhraní v IDE a na straně druhé úhel ostrý. Toto rozhraní je vyplněné přilehlou střední vrstvou sklovinného orgánu, v které je přítomno větší množství apoptotických buněk (obr. 7B). Přilehlá vrstva k IDE vytváří v centru sklovinného orgánu charakteristickou čepičku z několika vrstev buněk. Vrstva sklovinného orgánu přilehlá k IDE je v tuto fázi vývoje zubu mimo oblast čepičky tvořena jednou vrstvou plochých buněk (obr. 7B).

Vývoj mesiálního a distálního zubního hrbolku jsme zachytili v jejich předmineralizačním stádiu. Toto stádium poukazuje na důležité aspekty vývoje trikonodontie. Vnitřní sklovinný epitel centrálního hrotu je tvořen diferencovanými velkými ameloblasty, ke kterým přiléhá vrstva plochých buněk. Ameloblasty se prudce zmenšují v místě ohybu sklovinného orgánu (tedy v místě žlábků mezi mineralizujícím centrálním hrotem a budoucím bočním hrbolkem). V samotném ohybu buňky IDE nejeví známky diferenciacie, jsou malé, nepolarizované a nejsou v kontaktu s plochými buňkami vrstvy přilehlé k IDE. Strana IDE bočního hrbolku, která je přilehlá k centrálnímu konu, je tvořena diferencovanými ameloblasty. Jejich velikost prudce narůstá od místa přechodu mezi hrbolky směrem ke špičce budoucího bočního hrbolku. Tyto ameloblasty vytváří

pruh buněk podobný centrálnímu pruhu ameloplastů v oblasti mezi labiálním a lingválním hrbolkem centrálního hrotu. V místě budoucí špičky bočního hrbolku je vytvořené zřetelné rozhraní mezi diferencovanými meloplasty a sousedními ameloplasty na druhé straně IDE, které v této fázi vývoje teprve začínají diferencovat. V prostoru rozhraní jsou patrné vmezežené buňky. Sekreční čela ameloplastů na jedné straně rozhraní a čela teprve diferencujících ameloplastů na druhé straně rozhraní spolu svírají úhel. To je, jak již bylo výše zmíněno, nutný předpoklad pro tvorbu sklovinného hřebenu, popřípadě hrbolku. V úžlabině je mezi IDE centrálního hrotu a k němu přilehé vrstvy IDE bočního hrbolku patrná mohutná vrstva buněk sousedící na druhé straně s hvězdicovitým retikulem. Ta je tvořena poměrně velkými podlouhlými buňkami a mimo tento úsek navazuje na vrstvu tvořenou plochými buňkami.

6. DISKUZE

6.1. Funkční dentice v liniích šupinatých plazů, plesiomorfie, apomorfie

Tvar zubů, jejich velikost, struktura, uspořádání, počet v čelisti, typ připojení ke kostem odráží potravní adaptace druhů. Za plesiomorfni stav, co se považuje homodontní, polyfyodontní a pleurodontní dentice s konickým či cylindrokoničným tvarem zubů. Tento stav byl přítomen u všech časných plazů a odpovídal jejich potravním nárokům karnivorů a piscivorů. U některých skupin byly tyto zuby labiolingválně zploštělé s ostrými hranami (Edmund, 1969). U recentních plazů se tento typ zubů vyskytuje u krokodýlů (Romer, 1956) a u některých šupinatých plazů, jako například většiny druhů varanů (Edmund, 1960) a hadů (Romer, 1956), tedy ve skupině Toxicofera. Zcela ojedinělá dentice haterií (Sphenodontia), která je autapomorfii této sesterské skupiny šupinatých plazů, je monofyodontní a akroodontní s tesákovitými zuby v přední části horní čelist (Harrison, 1901). Další typem dentice s malými konickými až cylindrokoničnými homodontními zuby, pleuroodontně připojenými k čelistním kostem, se nachází u většiny druhů ještěřů (Edmund, 1960). Tento typ zubů, který může být pro ještěry původním, se nachází u námi zkoumaného gekona *P. picta* z bazální skupiny šupinatých plazů. Špičky zubů *P. picta* jsou rozděleny na malý labiální a linguální zubní hrbolk, což souvisí s jejich insektivním způsobem života. Zubní kounka, která je krytá sklovinou, tvoří jen jednu třetinu celého zubu, a je pod hrbolky ornamentována systémem nízkých vertikálních sklovinných hřebenů. Podobný systém vertikálních sklovinných hřebenů byl popsán u širokého spektra druhů gekonů (Sumida et Murphy, 1987). Tento systém nízkých sklovinných hřebenů se vyskytuje i v další bazální linii šupinatých plazů Scinciformata (Delgado et al., 2005). V linii Toxicofera pozorován například u hadů (Leydig, 1872) a námi u varana *V. indicus*. Tyto struktury byly popsány překvapivě také u archosaurní linie diapsidů (Poole, 1961) a představují tedy pravděpodobně plesiomorfni stav. Přítomnost labiálního a linguálního zubního hrbolku, pozorovaná u *P. picta*, byla popsána u všech sledovaných zástupců gekonů (Sumida et Murphy, 1987). Tento bikonodontní typ zubu byl také nalezen u Scinciformata (Delgado et al., 2005) a pozorovali jsem ho v rámci skupiny Toxicofera u anolise *A. barahoe*, malakofágně přizpůsobených chamaeleolisů a chameleona *Ch. clyptratus*. Dvojhrbolkové rozčlenění zubní korunky je tedy velmi starým konzervativním znakem šupinatých plazů, který se často udržel i u potravních specialistů, jako jsou malakofágně přizpůsobení chamaeleolisové či částečně karnivorně a fruktivorně přizpůsobení chameleoni.

Určitou inovaci v rámci dentice, která vznikla mnohokrát u různých skupin šupinatých plazů, je heterodontní dentice (Edmund, 1969). Jen ve skupině Toxicofera, jejíž zástupce jsme zkoumali, se vyvinula několikrát nezávisle na sobě. U chameleona *Ch. calyptratus*, anolisů a mláďat chamaeleolisů (u některých druhů i u dospělých jedinců) se v heterodontní dentici nachází zuby s centrálním hrotem, jehož mediální a distální stranu tvoří boční hrbolky. Podobné vícehrbolkové zuby jsme našli také u *V. niloticus* (viz příloha 7, obr. 8A-D). Většina ostatní druhy varanů mají zuby dýkovité, rozšířené do mesiální a distální strany s ostými hranami. Mesiální a distální zubní hrbolky se povětšinou nachází u labio-linguálně zploštělých zubů. Toto zploštění, které jsem u anolisů, chamaeleolisů a chameleonů pozoroval v oblasti mezi cylindrokonickými a vícehrbolkovými zuby, je pravděpodobně vývojovým předstupněm vzniku bočních zubních hrbolků. Z fylogenetického vztahu skupin z linie Toxicofera, majících trikonodontní zuby, je patrné, že mesiální a distální zubní hrbolky vznikly v průběhu evoluce Toxicofera několikrát.

Dvě třetiny zubu tvoří u *P. picta* dentinová zubní báze, která je pleuroodontně připojená k čelistní kosti. Zubní báze prvních funkčních zubů je širší než zubní korunka a její tvar je konický. Později vzniklé funkční zuby mají stejně širokou zubní bázi i korunku a tvar zubu je spíše cylindrický. Podobný rozdíl byl popsán u *Chalcides viridanus* z linie Scinciformataa (Delgado et al., 2005). U anolisů, chamaeleolisů a chameleona jsme pozorovali konické a cylindrokonické zuby v mesiální části dentice. Naopak v distální části byli přítomny vícehrbolkové zuby. Tvarová transformace zubů u těchto skupin tedy probíhala v průběhu evoluce v distální části čelisti. Tvar zubu v mesiální části je obecně u šupinatých plazů stabilní. Velikost zubní báze je u varanů malá. Většinu zubu zde tvoří velká zubní korunka krytá tenkou vrstvou skloviny. Velmi krátká zubní báze se nachází také u hadů, kde je zubní korunka kryta také velmi tenkou vrstvou skloviny. Tyto dvě skutečnosti budou spíš odrazem dentálních adaptací na život predátora, než fylogenetických vztahů hadů a vranů. Široká vrstva skloviny přítomná u druhů šupinatých plazů s korunkou rozdělenou na labiální a linguální hrbolek je pak přizpůsobením k insektivorii a stejně jako přítomnost dvou hrbolků je znakem poměrně stabilním. Varani mají velmi specifickou plástvovitou strukturu zubní báze tvořenou plicidentinem (Maxwell et al., 2010) Tentom systém zvětšuje povrch zubní báze a pevnost ankylózy, která je důležitá pro potřeby vrcholného predátora. Varan tak efektivně kompenzoval relativní zmenšení povrchu dentinové báze, způsobené zkrácením.

Počet zubů u šupinatých plazů může v průběhu života vzrůstat, nebo může být stabilní. U gekona *P. picta* počet zubů vzrůstá a kompenzuje se tím rostoucí velikost čelistí. Nové zubní pozice vznikají podél celé čelisti. U *Ch. viridanus* byl popsán stabilní počet zubních pozic v průběhu života. Rostoucí velikost čelistí je u tohoto druhu kompenzována změnou tvaru zubů z cylindrického na konický (Delgado et al., 2003). U anolise *A. baracoae* jsme pozorovali nárůst počtu zubních pozic i zvětšování zubů. Nové zubní pozice vznikaly podél celé čelisti. U většiny druhů chamaeleolisů byl pozorován také rostoucí počet zubů a zároveň změna tvaru zubů. U *Ch. porcus* a *Ch. barbatus* počet zubních pozic nerostl a tvar zubů se měnil. U chamaeleolisů se tedy nacházejí obě možnosti kompenzace růstu čelistí, které mohou odrážet jejich fylogenetický vztah. Původním typem u rodu *Anolis* je rostoucí počet zubních pozic. U chameleona s monofyodontní denticí přibývají s věkem nové zubní pozice pouze v distální části čelisti, která se prodlužuje právě jen ve své distální části. Čelist v oblasti již připojených zubů ale nestagnuje vrůstu, nýbrž zvětšuje svou mohutnost. Z uvedeného je patrné, že plesiomorfním stavem znaku je vzrůstající počet zubních pozic, které vznikají podél celé čelisti jako se to děje v případě *P. picta*. Typ růstu počtu zubních pozic u chameleona je pravděpodobně reakcí na monofyodoncii. U *Ch. porcus* a *Ch. barbatus*, u kterého počet zubů neroste, se pravděpodobně jedná o extrémní přizpůsobení k malakofágii.

6.2. Vývoj zubního vzoru

Vývoj zubního vzoru v průběhu embryogeneze je u většiny recentních skupin plazů, jak archosaurů, tak lepidosaurů, v mnoha aspektech podobný. Všechny funkční zuby a většina zubů nulté generace, pokud se vyvíjejí, vzniká interakcí labiální strany zubní lišty a přilehlého mezenchymu. Vznik dentice začíná iniciací vývoje jednoho zubu v každém kvadrantu horní i dolní čelisti téměř u všech diapsidních plazů. Pro tyto zuby byl použit termín zubní determinant (Osborn, 1973). Tyto zuby se nacházejí v mesiální části čelisti, jak jsme pozorovali u *P. picta*. Ve stejné části čelisti se zakládají i u archosaurů a hatérií (Westergaard, 1986, Westergaard et Ferguson, 1986). U chameleona, u kterého se nevytváří zuby nulté generace, se projevuje odlišná dynamika zakládání prvních zubů. Prvním vznikajícím zubem v horní čelisti byl zub vaječný, zatímco u ostatních šupinatých plazů vzniká vaječný zub až v době zakládání prvních funkčních zubů. U chameleona je vaječný zub následován zubem maxilárním, který se zakládá v distální části čelisti. U chameleona došlo tedy pravděpodobně ke skutečnému vymizení

zubů nulté generace a jejich charakter zakládání zubů odpovídá do určité míry charakteru zakládání prvních zubů první funkční generace. Toto vymizení zubů nulté generace by pak vyvracelo ideu, že tyto zuby jsou nutné pro vývoj zubního vzoru. Iniclace vzniku prvního zubu je známkou zpuštění vývojového programu periodického generování dalších zubních zárodků. Vlny indukce nových zubních zárodků se šíří od zubního determinantu mesiálně i distálně. Vmezežené zuby se tvoří v rostoucím prostoru mezi nejdříve iniciovanými zuby jak u archosaurů (Westergaard et Ferguson, 1986), tak u šupinatých plazů (Westergaard, 1986). Přítomnost tohoto systému zakládání u šupinatých plazů jsme pozorovali i u *P. picta*, *Ch. calyptratus* a *V. indicus*). Obecně u plazů se později zakládající zub vyvíjí blíže k nejvíce vyvinutému sousednímu zubu, a později vznikající zuby jsou větší než dříve iniciované (Westergaard, 1986). Toto pravidlo týkající se rozdílu ve velikosti u dříve a později iniciovaných zubů platí u *P. picta* pouze v rámci zubů nulté generace. Není ale použitelné u funkčních zubů, u kterých rozdíl ve velikostech není příliš významný. Pravidlo také neplatí u funkčních zubů druhů s heterodontní denticí, kde na některých pozicích může velikost později vznikajících zubů být menší, než těch dříve vznikajících. Tuto skutečnost jsme pozorovali u *Ch. calyptratus*. Je rovněž otázkou, jaký mechanismus řídí iniciaci vzniku zubních zárodků u plazů. Existuje několik potencionálních aktivátorů iniciace zubního vývoje. První molekulární data ukázala, že kandidátní gen *Shh* hraje roli během determinace a růstu odontogenního pruhu orálního ektodermu, z kterého se následně vyvíjí zubní lišta (Buchtová et al., 2008). Stejný výsledek jsme získali sledováním exprese *Shh* u *Cryptelytrops albolabris*, *P. picta* a *Ch. calyptratus*. Bylo rovněž zjištěno, že *Shh* hraje rovněž roli v determinaci odontogenního pruhu u cichlid, kde tato molekula účinkuje pospolu s genem *Pitx2* (Fraser et al. 2008). Zdá se tedy, že mechanismus řízení vzniku odontogenního pruhu je konzervativní napříč skupinami obratlovců vybavených zubní lištou. Odontogenní pruh orálního epitelu plazů je schopen produkovat zuby před objevením se zubní lišty, jak jsme pozorovali u *P. picta*, kde vývoj prvních dvou zubů byl iniciován z orálního epitelu v místě odontogenního pruhu. U archosaurů první zuby vznikají dokonce mimo zónu, z které se zubní lišta vyvíjí (Westergaard et Ferguson, 1986). Zubní lišta u není zcela nezbytná k iniciaci zubních zárodků, nicméně je kritická pro tvorbu funkčních zubů se sklovinou a vznik polyfyodontní dentice. Iniclace vzniku prvních zubů před diferenciací zubní lišty je tedy plesiomorfním stavem.

6.3. Vývoj zubů nulté generace

Zuby nulté generace u nesavčích obratlovců byly podrobněji popsány u ocasatých obojživelníků (např. Röse, 1895; Davit-Béal et al., 2006; Davit-Béal et al., 2007) a v diapsidní linii plazů, jak u archosaurů, tak u lepidosaurních plazů (např. Leche, 1893; Röse, 1894; Cooper, 1963; Westergaard et Ferguson, 1986, 1987; Westergaard, 1986, 1988; Sire et al., 2002). Vznik první zubů u archosaurů druhů *Crocodylus porosus* (Röse, 1894) a *Alligator mississippiensis* (Westergaard et Ferguson, 1986) je iniciován v interakci orálního epitelu a mezenchymu před vznikem zubní laminy. U *Alligator mississippiensis* (Westergaard et Ferguson, 1986) jsou tyto zuby iniciovány vedle prostoru, kde se začne vyvíjet zubní lišta. Podobně, ale v oblasti budoucí zubní lišty je iniciován vývoj prvních zubů u lepidosaurních plazů. V rámci skupiny Sphenodontia byly nalezeny u *Sphenodon punctatus* (Westergaard, 1986). V sesterské skupině Squamata pak v jedné z bazálních linií Scinciformata u *Mabuya aurata* (Mohammed et al., 2002), v linii Laterata u *Lacerta viridis* (Cooper, 1963) a *Lacerta agilis* (Westergaard, 1988) a v linii Toxicofera u *Iguana tuberculata* (Leche, 1893) a *Anguis fragilis* (Westergaard, 1988). Podobnou iniciaci prvních zubů nulté generace jsme našli u *P. picta* z linie Gekkota, bazálních šupinatých plazů. Na rozdíl od těchto druhů u gekona *Cnemaspis kandiana* (Gekkota) (Westergaard, 1986), *Liolaemus grawenhorsti* (Iguania) (Lemus et al., 1980) a *Pogona vitticeps* (Agamidae) (Handrigan et Richman, 2010a) byl popsán vznik prvních zubů ve spojení se zubní lištou. U chameleonů, sesterské linii k Agamidae vůbec tyto první zuby nevznikají. U aligátorů je první známkou vzniku zubů nulté generace formování epiteliální zubní plakody, okolo které kondenzuje mezenchym (Westergaard et Ferguson, 1986). U *A. fragilis* se objevuje zubní plakoda před vznikem kondenzace mezenchymu okolo vyvíjející se epiteliální části zubního zárodku (Westergaard, 1988). U *P. picta* mělo iniciační stádium prvních zubů také charakter plakody. Okolo plakody jsme pozorovali slabou kondenzaci mezenchymu. Pozdější stádía vývoje těchto prvních zubů u *P. picta* pak již byla spojená s vyvíjející se zubní lištou. První zuby u *V. indicus* naopak vznikaly přímo ze zubní lišty. Zuby nulté generace nebyly pozorovány také u hadů (Buchtová et al., 2007, osobní pozorování). Bylo pozorováno, že u *A. mississippiensis*, *S. punctatus*, *C. kandiana*, *L. viridis* a *I. tuberculata* několik zárodků prvních zubů nulté generace zřetelně prominuje z povrchu orálního epitelu (Leche, 1893; Cooper, 1963; Westergaard et Ferguson, 1986; Westergaard, 1986). U *L. agilis* a *A. fragilis* tyto zuby prominují do dutiny ústní jen mírně a po krátkou časovou periodu, později se s růstem zubní lišty zanořují do mezenchymu a na povrchu orálního epitelu již jejich přítomnost není patrná

(Westergaard, 1988). U *P. picta* první zub prominuje z povrchu orálního epitelu do stádia pohárku a později se zanořuje podobně jako u *L. agilis* a *A. fragilis* hlouběji do mezenchymu díky diferenciaci zubní lišty z odontogenního pruhu v prostoru vývoje těchto zubů lišty z odontogenního pruhu. První zubní zárodky u *V. indicus* z povrchu orálního epitelu neprominují. Vznik prvních zárodků před diferenciací zubní lišty ve všech hlavních liniích diapsidních plazů, podoba zubní plakody vyvíjejících se prvních zubů nulté generace, a projekce prvních zubů z povrchu orálního epitelu alespoň po první periody vývoje zubního zárodku, se jeví jako plesiomorfni stav.

Sklovinné orgány prvních zubů aligátora vykazují jednoduchou organizaci buněk. Skládají se z IDE tvořeným kubickými či nízce cylindrickými buňkami, dále z vrstvy buněk přilehlých k IDE a vrstvy hvězdovitého retikula, která je ve srovnání s retikulem funkčních zubů málo rozvinutá. Buňky IDE těchto zubů neprodukují sklovinu (Westergaard et Ferguson, 1986). U agamy *Pogona vitticeps* byla prokázána v IDE superficiálních zubech nulté generace nízká proliferační aktivita. Autoři zmiňovali, že to může být způsobeno prakticky absencí exprese *Ptc1* v IDE (Handrigan et Richman, 2010a). *Ptc1* je receptor morfogenu SHH. Dalším výsledkem této nízké proliferační aktivity by pak mohla být hypoplastická cervikální smyčka, která je pro první zuby nulté generace typická (Handrigan et Richman, 2010a). Nebylo však zohledněno a diskutováno, že exprese *Shh* u funkčních zubů v cervikálních smyčkách chybí. U *P. picta* byly sklovinné orgány prvních zubů organizovány podobně jako u aligátora. Vnitřní sklovinný epitel byl tvořen z kubických či nízce cylindrických buněk. Centrální buňky IDE přímo sousedily s povrchovou vrstvou orálního epitelu a byly menší než sousední buňky IDE sousedící se slabě vytvořenou střední vrstvou sklovinného orgánu. V pozdní fázi jejich vývoje jsme pozorovali v buňkách sousedících s centrálními buňkami IDE apoptózu, podobně jako u funkčních zubů, kde byla pozorována apoptóza v buňkách sklovinného orgánu přilehlých k centrálním ameloblastům.

Odontoblasty zubů nulté generace u aligátora nedosahují typického dlouhého cylindrického tvaru jako u zubů funkčních (Westergaard et Ferguson, 1986). U *P. picta* jsme u prvních zubů pozorovali nepolarizované, oválné odontoblasty. Jeden velký odontoblastický výběžek, který by vybíhal z proximální části odontoblastů jsme nepozorovali. Místo toho jsme pozorovali větší množství krátkých odontoblastických výběžků na jednu buňku, které jsme pozorovali u odontoblastů funkčních zubů na počátku jejich sekreční aktivity. U *V. indicus* byly sklovinné orgány prvních zubů nulté generace rozvinutější a jejich stupeň vývoje byl podobný později vznikajícím zubním

zárodkům nulté generace *P. picta*. V zubních zárodcích zubů nulté generace u *P. picta* a *V. indicus* se nevyvíjely cévy. Hypotetizujeme, že chybění cév v zárodcích zubů nulté generace může souviset s jejich malou velikostí zubů, kde není potřeba intenzivní cévní výživy.

Plně rozvinuté sklovinné orgány později zakládaných zubů nulté generace u aligátora jsou ve srovnání s prvními zárodky rozvinutější a skládají se ze čtyř vrstev: IDE, stratum intermedium, hvězdicovité retikulum, ODE. U některých později vzniklých zárodků IDE produkovalo tenkou vrstvu skloviny (Westergaard et Ferguson, 1986). Později zakládané zuby nulté generace u *P. picta* měli plně vyztřelé sklovinné orgány podobně diferencované jako aligátor. Jejich IDE se skládal z nízkých cylindrických a polarizovaných ameloblastů. Vrstva sklovinného orgánu sousedící s IDE obsahovala několik velkých plochých buněk a odpovídala vrstvě u aligátora popsané jako stratum intermedium. Míra homologie této vrstvy se savcím stratum intermedium není známa a proto se v textu tomuto termínu vyhýbáme. Jsou zde ale jisté indikace napovídající o podobném charakteru této vrstvy u obou skupin amniot. Hvězdicovité retikulum u *P. picta* bylo také u později zakládaných zubů nulté generace u *P. picta* rozvinutější ve srovnání se zuby prvními. Přesto jsou ameloblasty těchto zubů ve srovnání s ameloblasty funkčních zubů o mnoho menší. U funkčních zubů se v oblasti nejmenších ameloblastů po stranách zubního zárodku nachází nejtenčí vrstva skloviny. Velikost ameloblastů u později vznikajících zubů nulté generace tedy pravděpodobně úzce koreluje s jejich kapacitou produkovat tenkou vrstvu skloviny. U savců bylo popsáno, že stratum intermedium je spojené s maturací ameloblastů (Nakamura et al., 1991). Je-li u plazů funkce vrstvy přilehlé k IDE podobná savcímu stratum intermedium, vysvětluje to chybění skloviny u prvních zubů nulté generace, kde tato vrstva není rozvinuta a naopak přítomnost vrstvy skloviny u později zakládaných zubů nulté generace a funkčních zubů. Podobnou vrstvu jsme pozorovali u zubních zárodků nulté generace u *V. indicus*.

Uvádí se, že zuby nulté generace jsou rudimentární s redukovaným vývojem (např. Sire et al. 2002; Handrigan et Richman, 2010a). Neexistuje však důkaz, že by v průběhu evoluce došlo k potlačení stupně vývoje, či jeho předčasného zastavení, jehož výsledek by byl rudiment. Používání tohoto termínu tedy není opodstatněné, proto používáme v práci termín zuby nulté generace. Stupeň vývoje zubů nulté generace koreloval s dobou jejich zakládání (později zakládané zuby byly vyvinutější), prostorem ve kterém vznikaly (zuby jejichž vývoj byl iniciován hlouběji v mezenchymu byly rozvinutější) a velikostí vstupních buněčných populací (zvětšovala se v čase a s hloubkou

v mezenchymu), z kterých se začal zárodek vyvíjet. To jaký zub se tedy vyvine záleží na časoprostorovém kontextu, molekulární signalizaci tkání participujících na vzniku zubu. Ta může být v rámci času a prostoru odlišná. Obecnou charakteristiku plazů je tedy časný nástup odontogeneze bez ohledu na omezený rozsah buněčných a molekulárních možností potřebných k úspěšnému završení odontogenetických procesů. Odvozený stav, který nacházím např. u savců či chameleonů je pak dost možná důsledkem heterochronií oddalujících nástup odontogenické diferenciace. Variabilita v nástupu odontogeneze v průběhu embryonálního vývoje je patrná i mezi horní a dolní čelistí. U *P. picta* a *Ch. calypttratus* docházelo k dřívějšímu nástupu odontogeneze v horní čelisti, zatímco u *V. indicus* v dolní. Stav u varana je patrně odvozený a pravděpodobně je spjat s přítomností výrazného mandibulárního prognatismu v průběhu embryogeneze. Situace u *P. picta* a *Ch. calypttratus* je pravděpodobně stavem plesiomorfním.

6.4. Osud zubů nulté generace

Osud zubů nulté generace byl popsán jak u archosaurní linie diapsidních plazů, tak u lepidosaurních plazů (např. Röse, 1894; Edmund, 1969; Westergaard et Ferguson, 1986, Westergaard, 1986, 1988; Mohammed et al., 2002; Sire et al., 2002). Zuby nulté generace u aligátorů zanikají pod povrchem orálního epitelu. Jejich sklovinné orgány dezintegrují a dentinové zuby jsou resorbovány. Tyto zuby mohou nějakou dobu perzistovat v mezenchymu (Westergaard et Ferguson, 1986). Plně mineralizované dentinové zuby nulté generace u *P. picta* jsou často kompletně uzavřeny do tkáně zubní lišty, nebo mohou být inkorporovány do sklovinných orgánů funkčních zubů, které se začali vyvíjet na pozici zubů nulté generace. Pozorovali jsme, že buňky sklovinných orgánů zubů nulté generace se v pozdní fázi embryogeneze zplošťují podobně jako buňky sklovinných orgánů funkčních zubů před erupcí. Uzavřené zuby v zubní liště mohou rotovat a mohou být aktivitou zubní lišty odvrženy do mezenchymu. Při odvržení zůstávají sklovinné orgány součástí zubní lišty podobně jako u archosaurů (Westergaard et Ferguson, 1986). U *V. indicus* jsme pozorovali proces regresního vývoje sklovinných orgánů u větších zubů nulté generace. Jejich sklovinné orgány se postupně zkracovaly od cervikální kličky. Později kryly jen špičku zubu a měly tvar podobný zubnímu pohárku. Nakonec zbytek sklovinného orgánu získal místo konkávního tvaru tvar konvexní podobný většímu pupenu. V tomto procesu se tedy vlastně nejedná o odvržení, při kterém by byl zub vytlačen, ale o kompletní vymizení sklovinného orgánu skrze regresní vývoj, který má zřejmě jinou charakteristiku než při přípravě zubu na erupci. Při podrobné

histologické analýze jsme při tomto procesu regrese nepozorovali v mizejícím sklovinném orgánu zvýšené množství apoptózy. Jaký mechanismu způsobuje tyto změny v těchto sklovinných orgánech je neznámé. Hypotetizujeme, že částečně se na tomto procesu může podílet postupné odlučování buněk v distální části sklovinného orgánu. Pohyby zubů uvnitř zubní lišty pozorované u *P. picta* jsou pravděpodobně výsledkem její růstové aktivity. Zuby uzavřené v zubní liště u *P. picta* mohou být resorbovány či díky procesu erupce vypadnou do dutiny ústní. Zubní erupci malých zubů nulté generace jsme pozorovali také u *V. indicus*. Resorbce a erupce byla pozorována také u jiných diapsidních plazů (Edmund, 1969; Sire et al., 2002; Westergaard et Ferguson 1986; Westergaard, 1988). U aligátora Westergaard et Ferguson (1986) popsali přítomnost odontoklastů uvnitř zubní papily zubů nulté generace. U *P. picta* a *V. indicus* jsme odontoklasty uvnitř zubní papily nepozorovali. Zubní papila byla kompletně vyplněná odontoblasty, nehledě na to, že pozorované odontoklasty uvnitř zubní papily funkčních zubů v resorbci byly velké a v případě *P. picta* by se nevešly do zubní papily zubů nulté generace. Je tedy diskutabilní, zda-li se v případě aligátora o odontoklasty jednalo. Fotodokumentace uvedená v práci Westergaarda a Ferguson (1986) napovídá, že se spíše jedná o odontoblasty a ne o odontoklasty. U *P. picta* jsme pozorovali mnohojadernou buňku z vnější strany dentinového zubu, jehož polovina byla resorbována. K resorbci došlo v době morfologických změn ve struktuře sklovinného orgánu předcházejících zubní erupci. Později zakládané zuby nulté generace mohou vytvářet s čelistní kostí ankylózu, jak jsme pozorovali u *P. picta*, *V. indicus* a *A. barahoe*. V případě *A. barahoe* se pozděně vznikající zub nulté generace stal součástí funkční dentice. U *P. picta* jsme překvapivě našli zuby v horní čelisti, které byly kompletně zarostlé v čelistní kosti. K ankylóze dochází v případech, kdy se dostane vyvíjející se čelistní kost a zub nulté generace do bezprostřední blízkosti. U *P. picta* jsme pozorovali ankylózu těchto zubů jen v horní čelisti, což mohlo být způsobeno malým vzorkem zkoumaných embryí v konečné fázi embryologického vývoje. U *V. indicus* některé zuby přirůstali k čelistním kostem a to vždy v horizontální poloze špičkou zubu směrem linguálně. Zuby nulté generace jsou nakonec nahrazeny zuby funkční generace jak u *P. picta*, *V. indicie* a *A. barahoe*, tak i u jiných zkoumaných druhů (např. Röse 1894; Woerdeman, 1919; Edmund 1969; Osborn, 1971; Westergaard et Ferguson, 1990).

6.5. Vývoj zubů funkčních generací: diferenciacie sklovinného orgánu

Vznik všech funkčních zubů u *P. picta*, *V. indicus* a *Ch. calyptratus* byl iniciován interakcí labiální strany růstového čela zubní lišty, podobně jako u ostatních v minulosti studovaných plazů. První rozlišitelnou známkou vývoje funkčních zubů bylo u *P. picta* formování epiteliálního pupenu prominujícího do mezenchymu. Okolo pupenu jsme pak pozorovali kondenzovaný mezenchym. U *Ch. calyptratus* jsme pozorovali před vznikem epiteliálního pupenu vznik mezenchymatické kondenzace okolo zubní lišty v místě budoucího vzniku epiteliálního pupenu. Stav pozorovaný u chameleona bude pravděpodobně typický i pro ostatní druhy plazů, u kterých první známky kondenzace mezenchymu mohou být na histologické úrovni těžko pozorovatelné. To, že u chameleona je tento stav patrný může být způsobeno velkým počtem malých buněk mezenchymu, které vytvoří snadněji pozorovatelné počáteční stádium vzniku mezenchymatické kondenzace. Zubní pupen je tvořen shlukem buněk, patrně vzniklých z vnější vrstvy labiální strany zubní lišty. Napovídá tomu skutečnost, že útvar pupenu je spojený s labiální vnější vrstvou zubní lišty. Středná vrstva lišty je pak znatelně odlišená od tohoto shluku buněk, který má kulovitý tvar. Velikost zubních pupenů je mezidruhově odlišná. U chameleona a varana jsme pozorovali vznik relativně velkých pupenů tvořených poměrně velkou buněčnou populací, kdežto u gekona byly pupeny malé, tvořené malým počtem větších buněk. Velikost pupenu pak korelovala s finální velikostí a mírou komplexnosti tvaru zubu. Epiteliální pupen dává později vzniknout sklovinnému orgánu. Delgado et al. (2005) popsal vznik sklovinného orgánu u *Ch. viridanus* z proliferující zóny umístěné na konci zubní lišty. Tato zóna koresponduje s námi popsanými pupeny u *P. picta*, *Ch. calyptratus* a *V. niloticus*. Mechanismus, který řídí u plazů přechod ze stádia pupenu do stádia pohárku je neznámý a bude diskutován níže v kapitole o roli *Shh* v diferenciaci sklovinného orgánu. Při přechodu do stádia pohárku jsme pozorovali u *V. indicus* a zejména u *Ch. calyptratus* centrifugální rozšiřování kulovité buněčné struktury tvořící pupen. Tato struktura si při růstu zachovávala vícevrstevný charakter. U *P. picta* jsme tento fenomén nepozorovali, pravděpodobně z důvodu malého počtu velkých buněk tvořící zubní zárodek. Vzhledem k tomu, že se v současnosti dochází poměrně často k mylnému porovnávání stádií pohárku a předsekrečního stádia zvonku, definovali jsme rozdíl mezi těmito stádii na základě stupně diferenciacie IDE. Ve stádiu zvonku, na rozdíl od stádia pohárku jsou patrné morfologické změny charakteru buněk IDE, které se začínají prodlužovat a diferencovat v ameloblasty. Stádium pohárku je tvořeno ze tří vrstev: IDE, střední vrstvou buněk a ODE. Podobnou

strukturu má také pohárek savců, kde je střední vrstva v této době tvořena hvězdicovitým retikulem (Butler, 1956). Z charakteru struktury sklovinného orgánu chameleona je patrné, že vrstva IDE se diferencuje z vrstvy shluku buněk sousedící s buňkami mezenchymu vznikající zubní papily. Shluk buněk má v této době diskovitý charakter, jehož střed leží poněkud labiálně od centra vznikající IDE. V průběhu stádia zvonku, u všech zkoumaných druhů, diferencovaly buňky v oblasti zubní korunky v ameloblasty. Střední vrstva sklovinného orgánu se u *P. picta* skládala z velkých plochých buněk sousedících s IDE a navazující vrstvy sklovinného orgánu. U *V. indicus* jsme pozorovali dvě až tři vrstvy plochých buněk participujících na této vrstvě přilehlé k IDE. Podobně u *Ch. porcus* jsme popsali tuto vrstvu, která se skládala z jedné vrstvy plochých buněk. V oblasti zubních hrbolků pak měla jiný charakter, který bude rozebrán v diskuzi o vzniku zubních hrbolků. U *Ch. calyprtratus* nebyly ploché buňky patrné, což mohlo být způsobeno jejich malou velikostí, imunohistochemická analýza přítomnosti apoptózy, která je u ostatních zkoumaných druhů pro tuto vrstvu typická, však podporuje, že tato vrstva je přítomná i u chameleona. Popsaná vrstva sousedící s IDE nebyla u lepidosaurních plazů v minulosti popsána (např. Röse, 1893; Ogawa, 1977; Sire et al. 2002; Delgado et al. 2005; Buchtová et al. 2008, Handrigan et Richman, 2010), ačkoliv je patrná z fotodokumentace (např. Delgado et al., 2005). Westergaard et Ferguson (1987) popsali u archosaurů vrstvu plochých buněk na základě morfologické podobnosti jako stratum intermedium (SI). Z pozice buněk se zdá, že plazi „SI“ se u námi zkoumaných druhů vytváří z vácevrstevné struktury buněk pocházející z buněčné populace z primárního shluku tvořícího epiteliální pupen, ale také v pozdějších stádiích z vnější vrstvy cervikální kličky. Pozice této vrstvy a doba její diferenciaci (objevení se plochých buněk na histologickém záznamu) je podobná savčímu SI (Koyama et al., 2001), nicméně existují i odlišnosti: plazi „SI“ jsme u zkoumaných druhů pozorovali i v době funkčnosti ameloblastů, zatímco u savců jsou buňky stratum intermedium přítomné pouze do doby diferenciaci ameloblastů (Koyama et al., 2001). Jak již bylo zmíněno výše, z přítomnosti či chybění skloviny je evidentní, že tato vrstva je u plazů důležitá pro diferenciaci funkčních ameloblastů. Evolučně se tedy tato vrstva jeví jako předchůdce savčího typu SI. Hvězdicovité retikulum *P. picta*, *V. indicus*, *Ch. calyprtratus*, *Ch. porcus* se skládá z kulovitých buněk oddělených velkými extracelulárními prostory. Podobná strukturu této vrstvy byla pozorována např. u *Ch. viridanus* (Scinciformata), zástupce další bazální linie čupinatých plazů (Delgado et al., 2005). Hvězdicovité retikulum je u *P. picta* vrstvou tenkou, která není v oblasti zubní báze plně diferencována. Tato vrstva tedy může

také hrát určitou roli v diferenciaci ameloblastů, ke které v nepřítomnosti hvězdicovitého retikula nedochází. Tenká vrstva hvězdicovitého retikula, která se také nachází u hadů a jiných druhů plazů se subtilními zuby se prezentuje jako redukovaná (Tomes, 1875; Buchtová et al., 2008). Na pozadí současných představ o fylogenetických vztazích v rámci Squamata je patrné, že tento stav může být naopak původnější. Ve liniích vedoucím k recentním Iguania, Viperidae či Varanidae pak mohlo dojít k sekundární hypertrofii hvězdicovitého retikula korespondující se vznikem heterodoncie. Hypertrofie této vrstvy je tedy spjata s evolucí dentálních specializací a evidentně vznikla v průběhu evoluce lepidosaurních plazů mnohokrát. Vzhledem k tomu, že u varaních zubů a jedových zubů zmijovitých je přítomna jen tenká vrstva skloviny a u zástupců rodu *Chamaelo* a *Anolis* naopak mohutná vrstva skloviny, předpokládáme, že mohutnost této vrstvy nekoreluje s mohutností ukládané skloviny.

Vnitřní sklovinný epitel námi zkoumaných druhů má asymetrický vývoj. Linguální strana je tenčí a její růst je progresivnější oproti straně labiální, kde se naopak nachází větší buňky s pokročilejší diferenciací. Podobná dynamika byla pozorována např. u *Ch. viridanus* (Delgado et al., 2005). Tato dynamika asymetrického růstu sklovinného orgánu je nutnou podmínkou pro možnost vzniku pleurodontní ankylózy. Pozorovali jsme ji do stádia zvonku i u chameleona, který má akroodontní typ ankylózy. Později se asymetrie ve velikosti stran sklovinného orgánu u chameleonů vytrácí. Je tedy evidentní, že asymetrický vývoj sklovinného orgánu je plesiomorfním stavem šupinatých plazů, který se projevuje i v průběhu vývoje akroodontní dentice.

6.6. Mineralizace zubní korunky

První zralé odontoblasty a ameloblasty jsme pozorovali u všech zkoumaných druhů v centru IDE a sousedních mezenchymatických buňkách zubní papily. Vlna diferenciacie ameloblastů a odontoblastů se šíří centrifugálně v proximo-distálním směru. Sekrece dentinové matrix a její následná mineralizace za vzniku dentinu začíná před ukládáním skloviny, podobně jako například u *Ch. viridanus* (Delgado et al., 2005). Ameloblasty se zmenšují směrem proximo-distálním u všech námi zkoumaných druhů a jejich tvar se mění z cylindrického na kubický. Šířka vrstvy skloviny, v rámci druhu, pozitivně koreluje s velikostí ameloblastů, kromě oblasti mezi labiálním a linguálním hrbolkem. Proces tvorby tvaru korunky bude prodiskutován níže v kapitole o vývoji zubních hrbolků.

6.7. Vývoj zubní báze

Zubní báze je tvořena pouze dentinem bez sklovinného pláště. U *P. picta* tvoří zubní báze dvě třetiny zubu. U ostatních druhů, které jsme zkoumali, byla zubní báze kratší a dominovala zubní korunka, což souviselo s jejich potravními adaptacemi. V literatuře se u lepidosaurních plazů setkáváme s názvem kořen používaným pro zubní bázi (např. McIntosh et al., 2002; Luan et al., 2006). Tento termín, užívaný v savčí odontologické terminologii, by neměl být u lepidosaurních plazů vzhledem k odlišné charakteristice používán (Peyer, 1968). U savců bylo popsáno, že vznik zubní báze je kontrolován dvojvrstevnou extenzí cervikální kličky nazývané Hertwigova pochva (Selvig, 1963; Ten Cate, 1996). Další role přisuzovaná HERS je její schopnost indukovat vznik cementoblastů z buněk zubního váčku (Paynter et Pudy, 1958) a umožnit migraci cementoblastů k povrchu kořenu (Thomas et Kollar, 1989). McIntosh et al. (2002) popsali vývoj HERS u šupinatých plazů a archosaurů a poukázali na skutečnost, že HERS kryje zubní bázi kromě jejího distálního konce (McIntosh et al., 2002). U *P. picta* s velkou bází jsme pozorovali, že její největší část se vytváří v interakci mezenchymu zubní papily a sklovinného orgánu, který se skládá ze tří vrstev, tedy v oblasti, která nemá charakteristiku HERS. Tu jsme pozorovali pouze v nejdistančnější části sklovinného orgánu na konci vývoje zubu. Buňky IDE v třívrstevné oblasti měli kubický tvar, zatímco buňky oblasti HERS byly dlaždicovité. Střední vrstva se skládala z plochých buněk podobně jako v oblasti zubní korunky. Nepřítomnost skloviny v této oblasti tudíž podporuje hypotézu, že pro diferenciaci funkčních ameloblastů je vedle rozvinuté vrstvy plochých buněk zapotřebí i vrstva hvězdicovitého retikula. U *V. indicus* byly v oblasti HERS pozorovány dvě vrstvy. Na některých řezech byla patrná jen jedna vrstva epitelu, která se rozpadala. V místech záhybů plicidentinu byla vytvořena i střední vrstva sklovinného epitelu. U chameleona měla charakter HERS pouze labiální část zubní báze, linguální část obsahovala v celém úseku zubní báze i střední vrstvu. V labiální části byly na některých řezech patrné mezi dvěma vrstvami HERS osamocené buňky nevytvářející kompaktní vrstvu.

Zplošťování buněk, které jsme pozorovali u *P. picta*, bylo také pozorováno u savců v době před dezintegrací HERS v individuální buňky, které migrují a vytvářejí epiteliální zbytky (Wentz et al., 1950; Owens, 1978; Andujar et al., 1984, 1985). Ne všechny buňky HERS u savců ale migrují, některé zůstávají na povrchu kořene (Kaneko et al. 1999). Podobná dezintegrace a tvorba epiteliálních zbytků byla také pozorována u archosaurů (McIntosh et al., 2002), kteří mají thekodontní připojení

k čelistní kosti typu gomfózy. Dezintegrace HERS u šupinatých plazů, kteří mají ankylotický typ připojení báze ke kostem, pozorována nebyla (Luan et al., 2006) a rovněž na konci vývoje zubní báze šupinatých plazů s pleurodontní ankylózou nebyl její distální okraj kryt HERS (McIntosh, 2002; Luan et al., 2006). Nebylo ale zmíněno, jakým mechanismem okraj báze bez epitelu vzniká. U námi zkoumaných druhů jsme také našli distální část zubní báze, která nebyla kryta epitelem sklovinného orgánu. Před vznikem nejdálší dentinové části báze jsme pozorovali okolo distálního okraje shluk mezenchymatických buněk zubní papily, které v kontaktu s tímto epiteliálním okrajem sklovinného orgánu diferencují ve funkční odontoblasty. Ty nesetrvávají na jednom místě, ale vycestovávají směrem ke kosti a v průběhu této migrace produkují dentinový konec zubní báze. Na základě pozorování pouhé jedné rozpadající se vrstvy epitelu u *V. indicus* a zkrácení distální části sklovinného orgánu u *P. picta* v průběhu vzniku ankylózy hypotetizujeme že dvojvrstevná HERS se u plazů s pleurodontním typem ankylózy rozpadá. Pro tuto hypotézu hovoří i nepřímá evidence: v době vzniku ankylózy je struktura distální části sklovinného orgánu odlišná. Vnitřní sklovinný epitel se skládá z kubických buněk a ne plochých, a mezi IDE a ODE je vytvořena střední vrstva buněk. V případě *P. picta* je labiální část ankylózy tvořena dlouhým úsekem dentinové zubní báze a kostí čelisti. Dezintegrace HERS v této části zubní báze by byla logickým krokem vůbec pro možnost kontaktu tak dlouhého úseku zubní báze s kostí. Další nepřímou indikací, že k dezintegraci může docházet je velké zkrácení distální části labiální strany HERS před počátkem vývoje ankylózy. Sklovinný orgán pak kryje jen část zubní korunky. Jeho okraj je pak jediným místem, kde jsme pozorovali v rámci labiální ankylózy tvorbu cementu. K desintegraci HERS může dojít v krátké časové periodě, je tedy obtížně zachytitelná. U chameleona, kde je vytvořena v celé oblasti zubní báze střední vrstva sklovinného orgánu, či alespoň její náznak v podobě jednotlivých buněk, jsme zkrácení sklovinného orgánu na jeho distálním konci nepozorovali. Je ale možné, že k němu dochází později, nebo vůbec. Dezintegrace HERS u archosaurů, pravděpodobně šupinatých plazů s pleurodontním typem ankylózy a savců poukazuje na její plesiomorfni charakter minimálně v rámci amniot. Přítomnost střední vrstvy sklovinného orgánu u chameleona a u varana v místech dentinových záhybů pak poukazuje na kapacitu této části sklovinného orgánu vytvářet střední vrstvu. Pro stabilitu sklovinného orgánu je tedy pravděpodobně nutná přítomnost střední vrstvy sklovinného orgánu. To podporují i výsledky výzkumu vývoje jedového zubu u zmijovitých, kde se v místě invaginace

invaginace IDE v průběhu tvorby jedového kanálku dostávají do kontaktu protilehlá strany invaginovaného IDE. V tomto místě pak buňky mizí.

Další specializací varanů je tvorba plicidentinu v oblasti zubní báze. Plicidentin je radiálně zprohýbaná vrstva dentinu okolo zubní papily (Owen, 1841). Dentin se prohýbá dovnitř papily, vytváří lamely, které se rozvětvují vzájemně spojují a vytváří plástvovitou strukturu, která pak interaguje s připojovací tkání a vytváří se ankylóza mezi zubní bází a linguálního povrchu čelistních kostí (Kearney et Rieppel, 2006, Maxwell et al., 2011). U recentních plazů se plicidentin vyskytuje pouze u Varanidae, Helodermatidae a Lanthanotidae, patřících mezi Varanoidea (Odermatt, 1940; Bullet, 1942; Kearney et Rieppel, 2006). Jak je plicidentin formován nebylo publikováno. Náš výzkum ukázal, že zvlnění povrchu dentinu se vytváří prostřednictvím invaginace IDE do mezenchymu zubní papily. Tato dvojrstva IDE se po diferenciaci odontoblastů vytrácí a vytváří se dentinová lamela. Proces rozdvojení lamel jsme vzhledem k nedostatku materiálu nepozorovali, ale hypotetizujeme, že invaginovaný IDE se rozvětvuje a v místech anastomóz se sousední větve dostávají do kontaktu. Přilehlé odontoblasty pak vytváří plicidentin s charakteristickou plástvovitou strukturou. Vznik plicidentinu je podobný jako počátek vývoje jedového kanálku, kde prvním krokem v jeho vzniku je invaginace IDE a středních vrstev sklovinného orgánu. Rozdíl v této invaginaci ale existuje. U *V. indicus* jsme v místě dvojrstvy pozorovali polarizované buňky, zatímco u *C. albolabris* při vývoji jedového kanálku v místě kontaktu dvou vrstev IDE k této polarizaci nedochází (bude probráno v kapitole o vývoji jedového kanálku). Je tedy možné, že invaginace IDE u varana probíhá jiným způsobem než u *C. albolabris*.

6.8. Vývoj a charakteristika ankylózy

Ankylóza, neboli mineralizované spojení mezi dentinovou zubní bází a zub nesoucím elementem (čelistní, popřípadě patrové kosti) je v případě šupinatých plazů zprostředkována alveolární kostí a cementem. Obě tyto tkáně jsou spojovány s termínem „bone of attachment“ (připojovací kost) (Peyer, 1968). Alveolární kost v sobě uzavírá množství buněk a je tedy popisována jako celulární cement, oproti tomu cement má acelulární strukturu. Rieppel et Kearney (2005) hypotetizují, že tato tkáň u skupin charakteristických ankylotickým připojením zubů a zuby nesoucích elementů mohla vzniknout v průběhu evoluce vícekrát. Plesiomorfním stavem u šupinatých plazů je pleurodontní ankylóza. Vyskytuje se u většiny linií kromě Agamidae, Chamaeleonidae a Serpentes, kteří mají akroodontní typ ankylózy (Edmund, 1960). U hadů pak ale byl

později tento typ ankylózy zpochybněn (Edmund, 1969). U šupinatých plazů byla popsána depozice cementu, participujícího na vzniku ankylózy, do oblasti okolo dentinové zubní báze, kde není přítomna HERS a tudíž do míst, kde není bariéra v podobě epiteliálních buněk (McIntosh et al., 2002; Luan et al., 2006). Stejně pozorování jsme učinili jak u druhů s pleurodontní ankylózou, tak u druhů s akroodontní ankylózou. Chybění epiteliálních buněk na distálním konci zubní báze je nutností pro možnost přístupu mezenchymatických buněk k této části báze. Z našich pozorování vyplývá, že ankylóza je tvořena směsí dentinu a cementu. U *P. picta* s pleurodontní ankylózou dentin významně participuje na tvorbě labiální části ankylózy. V této části připojení zubu jsem pozorovali přítomnost cementu pouze u okraje čelistní kosti blízko orálního epitelu. V této části cementu se může nacházet skupina uzavřených cementoblastů v mineralizovaném cementu. Nelze tedy říct, že by byla patrná část cementu, která by odpovídala acelulárnímu cementu a část, která by odpovídala alveolární kosti. Mezi cementem a dentinem a cementem a kostí jsme pozorovali rozhraní a to zejména před jejich mineralizací. Rozhraní mezi cementem ve své acelulární formě a cementem celulárním, který odpovídá alveolární kosti nebylo patrné. U *V. indicie*, druhu také s pleurodontním typem ankylózy, je situace odlišná. Jeho zub má poměrně krátkou, ale mohutnou zubní bázi. Mezi celou připojovací plochou dentinové zubní báze a kostí je vytvořena poměrně mohutná vrstva cementu. Poměrně tenká vrstva cementu, která je blíže dentinové bázi v sobě neobsahuje uzavřené cementoblasty. Na ní navazuje silnější vrstva cementu, která se připojuje k elementům nesoucím zuby a která v sobě uzavírá větší množství buněk. Typ ankylózy u *V. indicus* tím, že nedochází na straně labiální k přímému spojení čelistní kosti (zuby nesoucího elementu) a dentinu, připomíná akroodontní ankylózu pozorovanou u chameleona. U *Ch. calypttratus* cement spojuje zuby nejen s kostí, ale i se sousedními zuby. Vytváří se tak ozubená mineralizovaná lišta složená ze zubů a cementu, která je evidentně mnohem stabilnější vůči mechanickému stresu. Tento typ ankylózy je tak reakcí na monofyodoncií, kde by poškození a vypadnutí většího počtu zubů znamenalo neschopnost zpracovávat potravu a vedlo by k úmrtí jedince.

6.9. Vývoj jedového kanálku, role *Shh*, buněčné proliferace a apoptózy

Vývoj kanálku v jedových zubech zmijovitých hadů má několik kroků, založených na invaginaci části sklovinného orgánu, buněčné diferenciaci a vymizení buněk. Jedové zuby mohou být často ztraceny v průběhu útoku na kořist, což může

vysvětlit, proč mají více než osm náhradních vyvíjejících se jedových zubů vedle zubu právě funkčního. Toto číslo je minimálně dvakrát větší ve srovnání s mandibulární a palatální denticí, nebo ve srovnání s nejedovatými hady jako je *Python sebae*, kde byly pozorovány 4 zubní generace v rámci jedné zubní pozice (Buchtova et al., 2007). Jedové zuby se začínají vyvíjet podobně jako jiné zubní základy a procházejí stádiem pupene, pohárku a zvonku. V průběhu mineralizace se na ventrální straně vytváří invaginace IDE a střední vrstvy sklovinného orgánu. Tyto vrstvy vrůstají do zubní papily a po indukci diferenciací odontoblastů se izolují. Následně se vytváří se trubice z IDE vyplněná hvězdíkovitým retikulem. Buňky vnitřního sklovinného epitelu v místě, kde vytváří dvojvrstvu vymizí. Na vymizení těchto buněk neparticipuje apoptóza a je tedy pravděpodobné, že jako v případě HERS dochází k dezintegraci této vrstvy vzhledem k nepřítomnosti střední vrstvy sklovinného orgánu, která má pravděpodobně stabilizační funkci pro IDE. Na základě těchto pozorování hypotetizujeme, že se buňky stávají součástí IDE kanálku, který se v té době výrazně zvětšuje. Odontoblasty okolo zanikající dvojvrstvy IDE produkují dentin, který vytváří dvojvrstevnou lamelu spojující kanálek s vnější stěnou zubu. Toto spojení kanálku s vnější stěnou zubu může chránit kanálek před frakturou v průběhu útoku na kořist. Epiteliální původ všech buněk trubice tvořící základ kanálku je potvrzen přítomností exprese *Shh* v buňkách vznikající trubice, jelikož tento morfogen je přítomný pouze v epiteliálních strukturách vyvíjejících se zubů (Dassule et al., 2000). Přítomnost *Shh* tak potvrzuje histologická data ohledně vzniku invaginace. V časném stádiu invaginace však nevykazuje expresi *Shh*, což indikuje, že tento morfogen nehraje hroli v první fázi vývoje kanálku. Rovněž jsme nepozorovali v této době rozdíl v míře proliferace ve ventrální a dorzální části IDE. To indikuje, buněčná proliferace neřídí vznik invaginace IDE do mezenchymu zubní papily. Později byla exprese *Shh* pozorována v buňkách sklovinného orgánu (IDE a hvězdíkovité retikulum) tvořícího kanálek. V této fázi šířka trubice rapidně expanduje. Bylo ukázáno, že *Shh* může fungovat jako potentní mitogen zvyšující míru proliferace (Cobourne et al., 2001). Tuto funkci má pravděpodobně v hvězdíkovitém retikulu rozšiřujícího se kanálku, což je podpořeno růstem míry buněčné proliferace. Později se exprese *Shh* uvnitř retikula zmenšuje a klesá i míra buněčné proliferace. *Shh* tedy hraje důležitou roli v určování velikosti kanálku. *Shh* působí také na kontrolu diferenciací buněk v IDE a to jak ve vnější části sklovinného orgánu, tak v části tvořící kanálek. Podobná funkce v diferenciaci ameloblastů byla popsána i u myši (Gritl-Linde et al., 2002), kde bylo prokázáno, že *Shh* má roli faktoru, který chrání buňky před smrtí v průběhu vývoje

(Cobourne et al., 2001). Je tedy pravděpodobné, že ztráta exprese *Shh* uvnitř kanálku otevřela možnost k jeho vyčištění apoptózou, kterou jsme ve velkém množství pozorovali. Pročištění kanálku od buněčných zbytků je nutným předpokladem pro jeho funkci a plynulý průtok jedu. Zda-li buňky IDE uvnitř kanálku produkují sklovinu je nejasné. Naše histologické preparáty byly dekalifikovány a sklovina tak byla odstraněna. Sklovinu uvnitř kanálku jsme nizméně nepozorovali ani pod rastrovacím elektronovým mikroskopem, což mohlo být způsobeno její velmi tenkou vrstvou a aprizmatismem. U Viperidae Tomes (1876) detekoval sklovinu na vnější dentinové stěně jedového zubu, avšak uvnitř kanálku sklovinu nepozoroval. Na rozdíl od něj Lake et Trevor-Jones (1987) sklovinu uvnitř kanálku našli u zmije *Bitis arietans*. U Elapidae, jmenovitě u *Hydrophis* sp., sklovina byla uvnitř kanálku pozorována (Tomes, 1914). Je tedy možné, že přítomnost či chybění skloviny uvnitř kanálku může být mezi liniemi jedovatých hadů s kanálkem variabilní.

Expres *Shh* v diferencujících buňkách IDE se šíří od špičky zubu směrem k zubní bázi. Tato vlna je následována vlnou mineralizace. Zub je tak formován od špičky k bázi, tak jak bylo popsáno ve studiích Jacksonové (2002, 2007). Jakmile vznikne trubice z IDE vyplněná retikulem, začne se okolo ní vytvářet vrstva dentinu aktivitou odontoblastů. Na úrovni mineralizované tkáně pak celý proces vypadá jako by byl kanálek stavěn podobně jako komín a ne invaginací buněk. Naše nálezy rovněž ukazují, že vlna exprese *Shh* a diferenciace buněk IDE se šíří nejen v proximo-distálním směru, ale také ve ventro-dorzálním směru. Tento fenomén, patrný také na mCT rekonstrukcích, nebyl v minulosti popsán.

Otvory, kterými kanálek komunikuje s vnějším prostorem se vyvíjejí invaginací IDE a hvězdicovitého retikula podobně jako samotný kanálek. Šířka IDE, které v oblasti otvorů invaginuje, je mnohem větší, než v případě kanálku. Tento rozdíl může být příčinou, proč se proximální části invaginovaného IDE nedostanou do kontaktu. Invaginace tak zůstane otevřená na povrch. Jakým mechanismem je řízen tento vznikající rozdíl v šíři invaginace je neznámé. Ukázali jsme, že *Shh* není zahrnut do iniciace vzniku invaginace. Je zde, ale množství jiných potenciálních morfogenů, které by mohly participovat na primárním impulzu vzniku invaginace IDE do mezenchymu zubní papily. Pozorovali jsme odlišný vzor buněčné proliferace v invaginované vstvě IDE oproti úseku, kde vzniká kanálek. Tento rozdíl může způsobit odlišný tvar invaginace v oblasti otvorů, který je pŕlměsíčitý. Mechanismus, jakým vznikají otvory může být spojován s mechanismem vývoje otevřeného žlábků u jedovatých Colubridae. Příčné řezy jedovými

zuby bojgy *Dispholidus typus* s jedovými zuby se žlábkem vypadají velmi podobně jako histologické řezy napříč otvory u *C. albolabris* (Lake et Trevor-Jones, 1995). Hypotetizujeme, že proces vzniku otvorů u Viperidae reprezentuje ancestrální plesiomorfní stav. Uzavřený kanálek se pak vytváří změnou šířky, tvaru a velikosti invaginovaných vrstev sklovinného orgánu. Tato změna vedla ke vzniku jejich apomorfie, kterým je kanálek. Vývoj kanálku a otvoru u *C. albolabris* je shrnut v publikaci (Zahradnicek et al., 2008 - viz. příloha 6, obr. 8). Na závěr můžeme shrnout, že pozorovanému postupu vývoje jedového kanálku u *C. Albolabris* odpovídá kombinace jak invaginační hypotézy tak hypotézy “chimney brick”.

6.10. Diferenciace sklovinného orgánu u šupinatých plazů: role Shh, buněčné proliferace a apoptózy

V průběhu zubního vývoje u plazů se postupně vytváří základní tvar zubu prohnutím epitelio-mezenchymálního rozhraní zubního zárodku, a růstem jeho epiteliální a mezenchymatické části. Podobně je tomu i u savců (Butler, 1956). Ze stádia pupenu se tak vytváří stádium pohárku a později stádium zvonku (Tucker et Sharpe, 1999; Peterkova et al., 2000). Tvar zubního zárodku a později vznik zubních hrbolků je u savců řízen aktivitou přechodných signalizačních center, které jsou součástí IDE a které se skládají z neproliferujících buněk (Jernvall et al., 1994, Vaahtokari et al., 1996). Poprvé se začíná takovéto signalizační centrum známé pod jménem primární sklovinný uzal (PEK) diferencovat ve stádiu pupenu, kde však není ještě plně morfologicky odlišitelné od okolních buněk a neexprimuje všechny morfogeny ve srovnání s plně rozvinutým PEK ve stádiu pohárku (Vaahtokari et al., 1996). Imunohistochemická analýza ukázala, že PEK, stejně jako později vzniklé sklovinné uzli, nevykazují proliferální aktivitu (Jernvall et al., 1994, Vaahtokari, 1996). Sklovinné uzli jsou signalizačními strukturami, které jsou charakteristické expresí řady morfogenů, jako jsou *Shh*, *Bmp*, *Fgf*, *Wnt* (Jernvall et al., 1994; Vaahtokari et al., 1996a; Keränen et al., 1998, Järvinen et al., 2009, 2008;). Na konci stádia pohárku a na počátku stádia zvonku dochází u savců v PEK k masivní apoptóze a k ukončení jeho signalizační aktivity (Jernvall et al., 1994). U ostatních skupin obratlovců se věří, že podobná signalizační struktura v průběhu vývoje sklovinného orgánu nevzniká (např. Delgado, 2005, Buchtová et al., 2008; Fraser et al., 2004; Huysseune et al., 2008; Smith et al., 2009). Proti tomu hovoří studie Westergaarda a Fergusona (1986, 1987), kteří popsali přítomnost struktury uprostřed IDE v průběhu vývoje zubů nulté i funkčních generací. Tuto strukturu přímo homologizovali

se sklovinným uzlem. V současné době neexistuje molekulární ani imunohistochemický screening u krokodýlů, který by potvrdil, jestli se tento shluk buněk skládá z neproliferujících buněk a jestli má signalizační funkci. Tvarem podobnou strukturu jsme pozorovali u všech do hloubky zkoumaných druhů *P. picta*, *Ch. calyptratus* a *V. indicus*. Jedním z klíčových morfogenů produkovaných PEK u savců v průběhu stádia pupenu a pohárku je difuzibilní morfogen *Sonic hedgehog*. Parakrinní signalizace *Shh* v buňkách PEK řídí růst okolních tkání sklovinného orgánu a přilehlých buněk mezenchymu zubní papily (Gritli-Linde et al., 2002). U *P. picta* a *Ch. calyptratus* jsme expresi *Shh* v epiteliálním pupenu nepozorovali. Tento výsledek může být dán metodikou, kdy jsme pravděpodobně nebyli schopni detekovat malé množství *Shh* v časnějších stádiích vývoje (u savců dochází k masivní expresi tohoto morfogenu až ve stádiu pohárku – Vaahtokari et al., 1996). U *Ch. calyptratus* a *V. indicus*, kteří mají oproti *P. picta* přítomné velké množství buněk je patrné, že se kulovitá buněčná struktura v průběhu formování vícevrstevného sklovinného orgánu rozrůstá do podoby disku, tvořeného několika vrstvami buněk, který následně zprohýbáním epitelio-mezenchymálního rozhraní nabývá tvaru pohárku. To, že mnohvrstevná původně diskovitá struktura roste, podporují imunohistochemická data poukazující na jeho proliferační aktivitu. Z této struktury se postupně diferencuje IDE a později ve stádiu zvonku “stratum intermedium” se svými plochými buňkami. V nejširším místě této struktury jsme u *Ch. calyptratus* od časného stádia pohárku pozorovali expresi *Shh*. Ta se následně šířila v rámci celé původně diskovité struktury. Expresie *Shh* v centru IDE ve stádiu pohárku byla pozorována i u jiných druhů plazů (Buchtová et al., 2008, Zahradnicek et al., 2008, Handrigan et Richman, 2010a). V zubních základech šupinatých plazů ve stádiu pohárku byla pozorována exprese *Ptc1*, receptoru pro *Shh*, v zubní papile a ODE (Handrigan et Richman, 2010a). Tento receptor je znám u savců ve spojení s parakrinní signalizací *Shh* (Hardcastle et al., 1998). Handrigan a Richman (2010a) zdůrazňovali, že *Shh* exprimovaná ve stádiu pohárku má parakrinní funkci a řídí aktivitu buněk v ODE a v mezenchymu zubní papily. Tento výzkum nicméně ale neříká nic o případné autokrinní funkci *Shh*, která jak známo je u savců spojená s expresí receptoru *Ptch2* (Motoyama et al., 1998). Vrstva přilehlá k IDE, v které byla pozorována také exprese *Shh* byla interpretována jako hvězdicovité retikulum (Handrigan et Richman, 2010a). Z obrazové dokumentace v této publikaci je však zřejmé, že se jednalo o „SI“. Tato vrstva, jak již bylo zmíněno, je u savců intimně spjata s vývojem ameloblastů (Nakamura et al., 1991, Koyama et al., 2001). V SI savců byla pozorována exprese *Shh* (Koyama et al., 2001),

což odpovídá situaci u plazů, kde jsme také v této vrstvě pozorovali také expresi *Shh*. V diferencující se vrstvě IDE a teprve v diferencující se vrstvě „SI“ jsme ve stádiu pohárku u *Ch. calyptratus* pozorovali buněčnou proliferaci až na místo centra sklovinného orgánu, kde byl patrný její pokles, který souvisel s pokročilejším vývojem centra sklovinného orgánu. U gekona *P. picta* byla na konci stádia pohárku buněčná proliferace patrná pouze v IDE. „Stratum intermedium“ bylo v této době již ve většině zubního zárodku diferencováno ve vrstvu plochých buněk a bylo PCNA negativní. To plně odpovídá dynamice exprese *Shh* a buněčné proliferace ve vrstvě stratum intermedium u savců. Je to tedy další indicie podporující vysokou míru homologie savčího SI a plazího „SI“. Vzhledem k tomu, že u savců byla nalezena exprese *Ptch2* v IDE a stratum intermedium, hypotetizujeme, že exprese *Shh* v IDE a přilehlé vrstvě v časnějším stádiu pohárku u plazů může být spojena s autokrinní signalizací a proliferačním účinkem SHH v těchto vrstvách a tudíž s růstem sklovinného orgánu a vzniku tvaru pohárku či později zvonku. Potenciální proliferační efekt *Shh* byl popsán i u savců (Cobourne et al., 2001; Wu et al., 2003). Vznik „SI“ u plazů tak může být spjat s expresí *Shh* ve vrstvě ještě nediferencovaných buněk přilehlých k IDE podobně jak bylo hypotetizováno u savců (Koyama et al., 2001). Na konci stádia pohárku a ve stádiu zvonku jsem ve vrstvě „SI“, která tvoří v místě centra sklovinného orgánu čepičku kryjící centrální ameloblasty, jsme u *P. picta* a *Ch. calyptratus* pozorovali přítomnost apoptózy. Podobně na stejném místě a ve stejný čas byla pozorována apoptóza i u jiných druhů plazů (Buchtova et al., 2008, Handrigan et Richman, 2010a). Přítomnost apoptózy v tomto prostoru mohla souviset s postupným vymizením exprese *Shh* z centrální části sklovinného orgánu ve stádiu zvonku. *Shh* by tak v přilehlé vrstvě k centrální části IDE mohl hrát protektivní roli vůči apoptóze. Úvahu o projektivní roli *Shh* pak může podpořit provedený funkční experimentem s cyklopaminem, inhibitorem *Shh* dráhy, při kterém došlo k nárůstu apoptózy v hvězdicovitém retikulu (Handrigan et Richman, 2010a). Je ale otázkou, jestli k tomuto nárůstu apoptózy nedošlo spíše v „SI“, které jak již bylo výše zmíněno je často interpretováno jako součást hvězdicovitého retikula.

Z uvedených skutečností je patrné, že u šupinatých plazů se plně homologická struktura s PEK savců nevyvíjí. Shluk buněk tvořící pupen a později diskovitou strukturu nabývající konkávního tvaru, z které později vzniká IDE a „SI“ pozorovaný u šupinatých plazů je preadaptací pro vznik savčího PEK. U plazů tato struktura vykazuje podobnou dynamiku exprese *Shh* jako savčí PEK, v její centrální části dochází ve stejnou dobu jako u savčího PEK k apoptóze. Velkým rozdílem však je, že u savců PEK nepřispívá svými

buňkami v průběhu diferenciaci sklovinného orgánu do vzniku IDE ani SI. U plazů v oblasti korunky naopak tato struktura tvoří významnou část těchto dvou vrstev. Většina IDE a SI u savců je pak vyvozena z odlišné buněčné populace epitelálního pupenu. Tato savčí inovace, na které se pravděpodobně podílel heterochronický posun exprese některých genů z pozdějších stádií do stádia pupenu, může být důvodem větších možností v růstové dynamice zubního zárodku a diferenciaci zubního tvaru, tak jak je známe u savců.

6.11. Vývoj pokročilejších stádií zubního zárodku a vznik zubních hrbolků u šupinatých plazů: role Shh, buněčné proliferace, apoptózy a odlišné depozice skloviny

Konečný tvar zubní korunky je determinován sekrecí skloviny ameloblasty a dentinu odontoblasty. Sekrečnímu a mineralizačnímu stádiu však předchází stádium zvonku, v kterém dochází k diferenciaci buněk IDE v ameloblasty a buněk mezenchymu zubní papily v odontoblasty. Tato diferenciaci, která je nejlépe zřetelná u druhů s velkými buňkami jako je *P. picta*, *Ch. porcus* nebo *V. indicus*, probíhala od centra IDE a od části vrstvy mezenchymatických buněk přilehlých k tomuto centru. Ve stádiu zvonku se u savčích vícehrbolkových zubů vytváří sekundární sklovinné uzle (SEK) a to v místech vzniku budoucích zubních hrbolků (Jernvall et al., 1994). Předpokládá se že vznik SEK řídí PEK (Luuko et al., 2003). Sekundární sklovinné uzle se vytváří na hranici mezi IDE a SI. Jejich buňky mají podobný charakter jako buňky PEK a jsou součástí IDE a zároveň zabíhají do hlubších vrstev sklovinného orgánu (Lesot et al., 1996). U plazů nebyla struktura podobná savčímu SEK popsána, vyvstala tedy otázka, jakým mechanismem je řízen vznik zubních hrbolků.

V průběhu vzniku dvojhrbolkové zubní korunky *P. picta*, *Ch. calypttratus* a *Ch. porcus* hrála významnou roli ve vzniku zubního tvaru diferenciaci buněk IDE, struktura středních vrstev sklovinného orgánu a depozice dentinu a skloviny. Buňky centrálního pruhu IDE se při zrání prodlužovali a to směrem do zubní papily, kde tak došlo k vytvoření záhybu a vzniku náznaku dvojhrbolkového tvaru zubní papily. Pruh těchto centrálních ameloblastů se nachází v místě žlábků mezi budoucím labiálním a linguálním hrbolkem. Hypotetizujeme že růst centrálních ameloblastů směrem do papily je umožněn polotekutým charakterem mezenchymu zubní papily, který obsahuje velké množství extracelulární matrix, a relativně pevným charakterem přilehlých středních vrstev sklovinného orgánu, které jsou v tomto prostoru tvořeny čepičce podobným

shlukem buněk „SI“ a strukturou „dental cord“, která je umístěna v prostoru mezi „SI“ a zubní lištou. V těchto středních vrstvách jsme nedetekovali na rozdíl od postranního hvězdčovitého retikula fibronektin, který je součástí jeho extracelulární matrix podobně jako u savců (Thesleff et al., 1981). Mezi pruhem velkých centrálních ameloblastů a navazujícími buňkami IDE bylo patrné, po obou stranách centrálního pruhu ameloblastů, rozhraní. V prostoru tohoto rozhraní byl až do pozdnější fáze mineralizace přítomen pruh vmezeřených buněk klínovitého tvaru. Tyto buňky, tvarem podobné klínu, byly součástí IDE, ale nebyly v přímém kontaktu s odontoblasty podobně jako buňky SEK u savců (Luuko et al., 2003). Tyto klínovité buňky se nacházely v místě budoucích sklovinných hřebenů formujících labiální a linguální hrbolek. Jejich přítomnost jsme detekovali vždy v místě sklovinného hřebenu, či ostré hrany u všech námi zkoumaných druhů plazů. Z našeho výzkumu není čitelné, jestli tyto buňky proliferují, ale zdá se, že ne. Ve stádiu, kdy byly diferencovány v ameloblasty jen centrální buňky IDE, jsme u *P. picta* pozorovali v prostoru rozhraní nejvyšší míru exprese *Shh* a to jak v buňkách IDE, tak i v přilehlých buňkách sklovinného orgánu. Velikost buněk IDE v prostoru rozhraní byla zřetelně menší ve srovnání s pruhem centrálních ameloblastů, kde exprese *Shh* mizela. Tato oblast je tak dost možná fylogeneticky a funkčně blízká savčím SEK, nehledě na to že pochází z buněk původně diskovité struktury, která svým charakterem odpovídá struktuře preadaptované pro vznik PEK.

Vymizení exprese *Shh* v diferencovaných ameloblastech v centru IDE, jak jsem pozorovali u *P. picta* a *Ch. calypttratus* bylo pozorováno také u jiných druhů plazů (Handrigan et Richman, 2010a). V prostoru centrálního pruhu ameloblastů nebyla patrná známka buněčné proliferace. Ta ale byla přítomna ve zbytku IDE, v cervikální kličce a ODE. Podobně u savčích molárů v oblasti mezi SEK, která prostorově odpovídá centrálnímu pruhu ameloblastů, nebyla ve stádiu zvonku pozorována buněčná proliferace (Coin et al., 1999). Po vymizení exprese *Shh* z centrální oblasti byla exprese dále detekována u *P. picta* a *Ch. calypttratus* v diferencujících buňkách IDE a „SI“. Na konci diferenciace ameloblastů tato exprese vždy ze zralých buněk vymizela. V hvězdčovitém retikulu jsme expresi *Shh* u *P. picta* a *Ch. calypttratus* nepozorovali v žádném stádiu vývoje zubů. Odlišnou situaci jsme ale pozorovali u jedových zubů a to zejména uvnitř jedového kanálku, kde jsme pozorovali masivní expresi *Shh* v retikulu (Zahradnicek et al., 2008).

Po ivaginaci sekrečních ameloblastů do mezenchymu zubní papily dochází k tvorbě dentinu, který zpevňuje základní dvojhrbolkový tvar zubní papily. Iniciace vzniku

dentinu předchází sekreci skloviny. Sekreci skloviny považujeme za konečný proces, který vytvoří vlastní sklovinné hřebeny tvořící labiální a linguální zubní hrbolk. Na rozhraní mezi centrálním pruhem ameloblastů a sousedícími ameloblasty se vytvoří nejsilnější vrstva skloviny, jejíž mohutnost v obou směrech od rozhraní klesá. Vytvoří se tak sklovinný hřeben. To je pravděpodobně způsobeno jednak skutečností, že sekreční čela ameloblastů na obou stranách rozhraní spolu svírají úhel, který se s pokročilou depozicí skloviny zmenšuje z tupého na ostrý. Mezi vznikajícími hrbolky pak část buněk centrálního pruhu ameloblastů vytváří jen tenkou vrstvu skloviny, zatímco velká většina ameloblastů tvořící okraje centrálního pruhu ameloblastů participuje právě na vzniku sklovinných hřebenů. V pokročilejší fázi amelogeneze, pak vzhledem k tomu, že v IDE v oblasti zalých ameloblastů není přítomna buněčná proliferace, musí docházet k nárůstu tlaku na rozhraní mezi centrálními a přilehlými ameloblasty v místě kde se nachází pruh vmezeřených buněk. V té době jsme u *P. picta*, *Ch. porcus* (na histologické rovině) a v oblasti ostých hran jedového zubu *C. albolabris* pozorovali apoptózu právě v prostoru, kde se nachází vmezeřené buňky a přilehlé buňky „SI“. Apoptózou v těchto místech se tak tlak v IDE vrstvě uvolní. Přítomnost apoptózy v mezeřených buňkách v oblasti rozhraní v IDE by znovu mohla poukazovat na vztah k později vznikajícím sklovinným uzlům u savců. U myšního moláru se v místě hrbolků, v prostoru, kde se vytváří SEK a posléze terciální sklovinný uzel nachází zóna, kde ameloblasty produkují matrix, která nemineralizuje ve sklovinu (Yamamoto et al., 1998). Podobná zóna bez skloviny se nachází i v místě dentinového záhybu mezi paralelními hrbolky (Gaunt, 1956). U dvojhrbolkových zubů plazů je v prostoru mezi hrbolky tenká vrstva skloviny. Zda je mechanismus redukce sklovinné vrstvy mezi labiálním a linguálním hrbolkem podobný procesu u myši je třeba podrobit dalšímu zkoumání. Hypotetizujeme, že určitou roli zde může hrát apoptóza v čepičce z „SI“ přilehlé k centrálnímu pruhu ameloblastů a nepřítomnost hvězdčovitého retikula v této centrální části.

Na konci amelogeneze v oblasti zubních hrbolků jsme u *P. picta* a *Ch. porcus* pozorovali apoptózu i v centrálním pruhu ameloblastů, což poukazovalo na ukončení amelogeneze v této oblasti. U *Ch. calypttratus* jsme na konci formování zubní korunky u vícehrbolkových zubů pozorovali apoptózu v „SI“ po stranách centrálního hrotu vícehrbolkových zubů a v místě hrotů bočních hrbolků. „Stratum intermedium“ tak zřejmě postupně degraduje zkrze apoptózu. Z uvedeného je zřejmé, že preadaptací pro vznik labiálního a linguálního zubního hrbolku bylo vytvoření sklovinných hřebenů, které se i v oblasti mimo zubní hrbolky vyvíjejí stejným způsobem. Potenciál vzniku

takovýchto hřebenů je téměř v celé oblasti zubní korunky. Hřeben, popřípadě hrbolka vznikají v prostoru, kde se před diferenciací buněk v IDE a „SI“ nacházela původně diskovitá struktura. Z jejích buněk se pak v evoluci může kdekoliv diferenciovat vmezeřený pruh klínovitých buněk, který pravděpodobně tak jako SEK významně participuje na vzniku sklovinných hřebenů či jednoduchých hrbolků.

Poněkud odlišnou situaci jsme pozorovali u *Ch. porcus* při formování mesiálního a distálního bočního hrbolku u trikonodontních zubů první funkční generace. Na rozhraní mezi centrálním hrotem, který mineralizuje a bočním hrbolkem, jehož buňky IDE jsou ve fázi diferenciaci, je patrné rozhraní v IDE. To je tvořené menšími nediferencovanými buňkami, u kterých dochází k inverzní situaci oproti klínovitým buňkám v prostoru sklovinných hřebenů či špiček hrbolků, kde nejsou v kontaktu s „SI“, ale s diferencujícími odontoblasty ano. Buňky IDE centrálního hrotu se těsně před tímto rozhraním prudce zmenšují a naopak za rozhraním na straně bočního hrbolku přilehlé k centrálnímu hrotu prudce zvětšují. Na této straně bočního hrbolku se tak vytváří pruh velkých ameloblastů podobných centrálnímu pruhu ameloblastů přítomnému v prostoru mezi labiálním a linguálním hrbolkem centrálního hrotu. V místě hrotu bočního hrbolku je pak patrné rozhraní stejného charakteru jako v místě labiálního a linguálního hrbolku, nebo sklovinných hřebenů a ostrých hran zubů. V úzlabině mezi centrálním hrotem a bočním hrbolkem se nachází hypertrofované „SI“ složené z oválných a ne plochých buněk, což poukazuje na jeho možnou proliferační aktivitu. Na základě našich výsledků hypotetizujeme, že místo přechodu mezi centrálním hrotem a bočním hrbolkem, složené z nediferencovaných buněk, hraje důležitou roli v řízení velikosti bočního hrbolku a vrstva přilehlá k IDE, která je hypertrofovaná pak může ovlivňovat úhel, který svírá boční hrbolka s centrálním hrotem. Mechanismus vzniku těchto bočních hrbolků je tedy poněkud odlišný od popsaného mechanismu vzniku labiálního a linguálního hrbolku a elegantně může vysvětlit změny ve velikostech zubních hrbolků a úhlu, který svírají s centrálním hrotem zubu. Tímto mechanismem se pak také vysvětlí mezidruhová variabilita. Výška připojení těchto hrbolků se pak bude řídit vznikem rozhraní v IDE, které se dle stávajících potřeb druhu může objevit defakto kdekoliv v rámci téměř celé zubní korunky. Podrobný molekulární výzkum vývoje zubů s bočními hrbolky je tedy na místě.

6.12. Dentice chamaeleolisů, změny v charakteristice dentice v průběhu života jako výraz jejich potravních nároků a fylogenetických vztahů uvnitř skupiny

Přítomnost molariformních zubů v dentici je tradičně považováno za adaptaci k durofágii. Durofágní adaptace v podobě přítomnosti molariformních zubů v dentici se vyvinula v průběhu evoluce šupinatých plazů několikrát nezávisle na sobě. Molariformní zuby se vyskytuje v rámci recentních Toxicofera v linii Iguania, kde byly popsána u námi zkoumaných kubánských chamaeleolisů (např. Boulenger, 1885, Estes et Williams, 1984) a v linii Varanidae u druhů jako *V. niloticus* (Rieppel et Labhardt, 1979) či *V. exanthematicus* (Schmidt, 1919). V linii Scinciformata, jedné z bazálních linií šupinatých plazů, byly molariformní zuby nalezeny u *Eumeces algeriensis* (Scincidae) (Estes et Williams, 1984) a v linii Laterata v rámci čeledi Teiidae u *Tupinambis sp.* (Ranzoni, 1836) a *Dracena guaianensis* (Peyer, 1968) a v čeledi Amphisbaenidae u *Amphisbaena ridleyi* (Pregill, 1984).

U chamaeleolisů, stejně jako u některých jiných zástupců šupinatých plazů malakofágně adaptovaných byla pozorována změna tvaru zubů v průběhu života. Molariformní zuby byly nalezeny u dospělých zvířat, zatímco mláďata měla místo molariformních zubů generalizované trikonodontní zuby s mesiálním a distálním bočním hrbolkem (Estes et Williams, 1984). O míře malakofagie jednotlivých druhů a jejich věkových kohort se toho mnoho neví. Herrell a Holanova (2008) pozorovali malakofagii při behaviorálních testech jak u mláďat, tak u dospělých jedinců chamaeleolisů. Mláďata i dospělí jedinci přitom oddělovali a vyvrhovali rozdrčené kousky ulit. Schopnost přijímat měkkýše s ulitami pozorovali i u *A. barahoe*, sesterského druhu k linii chamaeleolisů (Haas et al., 1993), který má podobnou velikost jako chamaeleolisové (Herrel et Holanova, 2008). Tento druh však ulity neodděloval a hlemýžďě polykal v celku (Herrel et Holanova, 2008). Výzkum dentice a jejích změn v průběhu ontogeneze u jednotlivých druhů, které byly již dříve, ne však do detailů, pozorovány u *Ch. porcus* a *Ch. chamaeleonides* (Estes et Williams, 1984), může napovědět více o jejich přirozených potravních preferencích a vzájemných fylogenetických vztazích mezi druhy. Jako výchozí stav pro vznik malakofágních adaptací považujeme charakteristiku dentice u příbuzného *A. barahoe*, v jehož potravní složce se nachází také obratlovci (Holáňová, osobní sdělení). U chamaeleolisů jsme pak původní stav znaků, nebo stav jim blízký, pozorovali v rámci první funkční generace zubů většiny zkoumaných druhů. U *Ch. barbatus* a *Ch. chamaeleonides* však již v rámci první funkční generace byla patrná malakofágní adaptace. Za primární stav znaků, nalezených u *A. baracoae*

považujeme: 1) velký nárůst zubních pozic (u *A. baracoae* z 18 u první funkční generace na 33 zubních pozic napočítaných u dospělého jedince), počet zubů první funkční generace je 18, 2) zvětšování zubů v mesio-distálním směru v první funkční generaci a postupné snižování tohoto rozdílu v průběhu života, 3) u dospělých zvířat je nejdistančnější zub v řadě menší než jeho mesiální sousední zub, 4) zubní korunky poměrně výrazně přecházejí přes okraj čelistní kosti i v distální části dentice, 5) v mesiální i distální části dentice jsou přítomny mezery mezi korunkami zubů, které se s věkem zmenšují, 6) přítomnost jednoduchých konických zubů v mesiální polovině dentice, které mají tendence se v distální části této skupiny zubů na své mesiální a distální straně rozšiřovat (jejich počet v průběhu ontogeneze výrazně roste), 7) vzrůstající komplexita tvaru zubů v rámci zubní řady ve směru mesio-distálním, 8) mezi monokodontními zuby a distálními trikonodontními zuby se nachází několik dikodontních zubů, 9) nízké připojení bočních hrbolků k centrálnímu konu, 10) úhel mezi bočním hrbolkem a vertikálou se postupně v zubní řadě ve směru distálním zmenšuje (ostrý úhel mezi bočním hrbolkem a vertikálou je tedy patrný až u nejdistančnějších zubů), 11) v distální části dentice jsou trikonodontní zuby. U dospělého jedince *A. baracoae* jsme pozorovali v distální polovině zubní řady na dvou pozicích dikodontní zuby, které vypadaly jakoby byly vytvořeny srůstem dvou zubů. Podobný zub jsme našli ve stejné části čelisti i na druhé straně mandibuly. Jestli pozorované dvojjazyky vznikly srůstem dvou zubů a jestli je jejich přítomnost u druhu *A. baracoae* pravidlem nám není známo.

Na základě pozorování dentice se zdá, že nejpříbuznějším chamaeleolisem anolisům je *Ch. guamuhaya*, jehož charakteristika dentice se nejvíce blíží stavu *A. baracoae* jak u mláďat, tak u dospělých jedinců. U dospělých jsou ale patrné znaky adaptace k malakofagii v zadní části dentice, jako je vymizení zubních hrbolků u distálních zubů a zvětšení mohutnosti zubních korunek. U tohoto druhu počet zubních pozic v průběhu života roste ze 17 na 25. Oproti *A. baracoae* je tu tedy patrná tendence ke snižování počtu zubů, která je kompenzována zvětšováním mohutnosti zubů v distální části dentice. Tento snížený počet zubů v dospělém stádiu je ale mezi ostatními chamaeleolisy nejmenší. Trend snížení počtu zubních pozic se plně projevil u *Ch. porcus* a *Ch. barbatus*, kde se počet zubních pozic v průběhu ontogeneze v zásadě nemění. U *Ch. chamaeleonides* jsme pozorovali nárůst počtu zubních pozic z 20 na 23. Estes a Williams (1984) našli 19. zubů v dolní čelisti mláďete tohoto druhu. Počet zubů první funkční generace se u všech zkoumaných druhů chamaeleolisů a příbuzného *A. baracoae* liší jen málo a můžeme ho tedy považovat za stabilní neměnný znak této linie.

Velikost a mohutnost zubů se zvětšují ve směru mesiodistálním v rámci první funkční generace u všech druhů. Pozvolnější nárůst velikosti zubů u dospělých jedinců jsme pozorovali jen u *Ch. gamuhaya* a *Ch. chamaeleonides*. To může být jeden ze znaků, který by mohl poukazovat na jejich blízkou příbuznost. Tuto teorii podporuje také výše zmiňovaný nárůst počtu zubních pozic u obou druhů. Menší velikost nejdálšího zubu byla pozorována u *Ch. barbatus*, kde je zjevné že zmenšování probíhá od předposledního zubu v řadě, *Ch. chamaeleonides*, kde se zuby zmenšují od třetího zubu od konce zubní řady a poslední dva zuby jsou výrazně menší a *Ch. guamuhaya*, kde se zuby zmenšují od 4. zubu od distálního konce zubní řady. V tomto případě jsou výrazně menší poslední tři zuby. Naopak u *Ch. porcus* toto zmenšování patrně nebylo.

U *Ch. gamuhaya* a *Ch. porcus* zubní korunky přecházejí poměrně výrazněji i u dospělých jedinců v distální části dentice, nepočítaje miniaturní nejdálší zuby u *Ch. gamuhaya*, které asi ani nejsou funkční. Jen mírně přesahují zubní korunky distálních zubů okraj čelistní kosti u dospělců druhů *Ch. chamaeleonides* a *Ch. barbatus*. Tato skutečnost poukazuje na značné přizpůsobení k malakofágii u dospělých jedinců obou sledovaných druhů.

U dospělého jedince *Ch. barbatus* mezery mezi zuby v distální části zubní řady téměř vymizely. Mezi ostatními zuby však zůstaly zachovány. Tento jev opět poukazuje na značné přizpůsobení k malakofágii u *Ch. barbatus*. Malakofágní přizpůsobení je zde zvýrazněno přítomností dvou funkčních řad zubů. Zuby první řady jsou téměř zcela resorbovány. Vytváří se kompaktní zubní pole vhodné k drcení ulit. Podobně dvě řady funkčních zubů v distální části čelisti byly popsány u rodu *Dracaena* (Dalrymple, 1979) U ostatních druhů chamaeleolisů jsou mezery mezi zuby v distální části dentice zřetelné a jejich velikost v průběhu ontogeneze klesá.

U *Ch. gamuhaya* počet konických a cylindrokonických zubů v průběhu ontogeneze klesá z 8 či 9 (na preparátu není patrné, jestli na 9. zubu je či není distální boční hrbolk) na 4. Na tyto zuby u dospělého jedince pak navazují zuby dikonodontní s jedním bočním hrbolkem. U *Ch. guamuhaya* je tedy patrná tvarová transformace zubů na distálnějších pozicích v meziální části dentice z monokonodontních na dikonodontní. *Chamaeleolis chamaeleonides* má v první funkční generaci 11 konických až cylindrokonických zubů. U dospělého jedince nejsou patrné boční hrbolky u žádného ze sledovaných zubů. Jejich hroty se v rámci zubní řady ve směru distálním postupně zakulacují. Nelze tedy přesně určit jestli skupina cylindrokonických zubů početně narůstá. Vzhledem k tomu, že velikost prvních 14 zubů je v porovnání s navazujícími

zuby znatelně menší, je tento nárůst pravděpodobný. U *Ch. porcus* se počet konických a cylindrokonických zubů s věkem patrně nemění (u embrya byly první zuby ztraceny, odhadujeme tedy počet těchto zubů 6 – 8, u dospělého jedince jsme pak napočítali 7 takovýchto zubů). U *Ch. barbatus* počet konických a cylindrokonických zubů dokonce klesá ze 7 na 5, což opět podporuje hypotézu, že tento druh je nejvíce přizpůsoben k malakofágii.

Vzrůstající komplexita tvaru zubů v mesio-distálním směru v rámci zubní řady byla pozorována u všech sledovaných druhů. U dospělých jedinců pak vzhledem k tendenci redukovat boční hrbolky nebyla tak výrazná a téměř chyběla u *Ch. barbatus*, *Ch. chamaeleonides*, *Ch. porcus*. Chybění zubních hrbolků u dospělého jedince *Ch. chamaeleonides* bylo popsáno již dříve (Estes et Williams, 1984). U *Ch. guamuhaya* byla nejvíce zřetelná. To vypovídá o pravděpodobně nejmenší adaptaci *Ch. guamuhaya* na malakofagii.

V rámci zubní řady první funkční generace u *Ch. guamuhaya* jsme našli dva zuby s jedním bočním hrbolkem. Tyto zuby alternovaly s trikonodontním zubem. Boční hrbolky byly připojeny nízko a jejich úhel nasazení byl pravý a u distálnějšího zubu ostrý. U dospělého jedince počet těchto zubů vzrostl na 8, přičemž hrbolky byly připojeny k centrálnímu hrbolku nízko a jejich úhel nasazení byl tupý až pravý. Alternace s trikonodontními zuby se zde nevyskytovala. Tento úsek dentice tak svým charakterem může poukazovat na insektivorii. U *Ch. barbatus* jsme našli čtyři dikonodontní zuby v řadě zubů první funkční generace s bočním hrbolkem nízko připojeným a svírajícím s vertikálou ostrý úhel. U dospělého jedince počet těchto zubů klesl na dva a úhel nasazení bočního hrbolku byl tupý. U tohoto druhu jsme nepozorovali alternaci dikonodontních a trikonodontních zubů. *Chamaeleolis porcus* měl pouze u jednoho zubu v rámci první funkční generace náznak tvorby jednoho bočního hrbolky nízko připojeného k centrálnímu konu a svírajícího s vertikálou tupý úhel. U dospělého jedince jsme takovýto zub nenašli. U *Ch. chamaeleonides* jsme dikonodontní zuby nenašli vůbec.

U embrya *Ch. guamuhaya* jsme napočítali v distální části dentice čtyři trikonodontní zuby s velkými bočními hrbolky připojenými poměrně nízko k centrálnímu konu a svírajícími s vertikálou ostrý úhel. U dospělého jedince pak čtyři trikonodontní zuby s malými bočními hrbolky svírajícími pravý až tupý úhel s vertikálou. Distální zuby byly labiolingválně zploštělé a rozšířené do stran. Mláďata tak budou přizpůsobená spíše k insektivorii a dospělí jedinci jeví tendence k malakofágii.

V rámci první funkční generace jsme u *Ch. chamaeleonides* napočítali 7 trikonodontních zubů, přičemž u předních byly boční hrbolky malé, nízko připojené k centrálnímu hrotu a většinou s tupým úhlem nasazení. Výrazná trikonodontie se projevovala od 12. pozice dále, podobně jak bylo posánu u mláděte tohoto druhu (Este set Williams, 1984). Nejdistančnější zuby v řadě byly mohutné, boční hrbolky byly vysoko připojené k centrálnímu konu a svíraly ostrý úhel s vertikálou. Jejich umístění zvetšovalo drtící plochu. Hypotetizujeme tedy, že tento znak napovídá o přizpůsobení mlád'at k malakofágii. U dospělého jedince trikonodontní zuby vytvořeny nebyly, zadní zuby byly molariformní, zejména poslední čtři přizpůsobené k drcení schránek měkkýšů. V distální části zubní řady první funkční generace u *Ch. barbatus* jsme našli 6 trikonodontních zubů, z toho poslední dva byly masivní, jejich boční hrbolky vysoko připojené k centrálnímu konu a svírající ostrý úhel s vertikálou vybíhaly z profilu zubu jen málo a rozšiřovaly tak jeho plochu. Tvarem se tak tyto zuby jevily téměř zaoblené. Z toho je patrná pravděpodobná adaptace k malakofágii již u mlád'at *Ch. barbatus*. U dospělého jedince se v distální části vytváří z části dvojřadé uspořádání molariformních zubů, jak bylo výše zmíněno. To poukazuje na největší přizpůsobení k malakofágii u tohoto druhu. Střední část dentice je pak tvořena zuby s miniaturním mesiálním a distálním bočním hrbolkem.

7. ZÁVĚR

V průběhu dizertační práce byly vybrány vhodné, z fylogenetického hlediska relevantní, taxony s kontrastními typy dentálních adaptací. *Paroedura picta* (Gekkota), kterou jsme vybrali jako základní taxon pro systematický výzkum dynamiky vývoje zubů se osvědčila díky poměrně krátké inkubační době vajec, relativně malé variabilitě ve stupni vývoje při standardizovaných podmínkách, poměrně malé velikosti populace buněk participující na vývoji zubů a velkým buňkám, které umožňují identifikovat přesně buňky, v kterých probíhá exprese vybraných genů. Naopak jako kontrast k *P. picta* působil *Ch. calyptratus* (Acrodonta, Chamaeleonidae). Tento druh je sice taky poměrně dobře množitelný a dostupný v chovech, ale vyniká poměrně velkou variabilitou ve stupni vývoje v průběhu inkubace vajec, a to i za standardizovaných podmínek. Je tedy velmi obtížné přesně odhadnout stádium, které se bude ve vajíčku nacházet. Tento druh má oproti *P. picta* malé buňky a je tedy naopak spíše vhodný pro sledování dynamiky celých vrstev tkání zubního zárodku. Neplatí to však pro většinu částí „stratum intermedium“, které je v oblasti mimo hrotu zubu špatně rozlišitelné. Jako vhodný a zajímavý druh se však jeví pro výzkum pozdějšího nístupu odontogeneze, vzniku monofydoncie, a v pozdní fázi embryogeneze atypickému vývoji zubního uspořádání. Pro budoucí systematický výzkum vývoje trikonodoncie se jeví jako vhodný rod *Anolis*. Chamaeleolisové jsou méně vhodnou skupinou z důvodu téměř jejich absence v chovech a tudíž jejich těžké dostupnosti, která je způsobena do velké míry politickou situací na Kubě. Do budoucna se však tato malá skupina druhů jeví jako vhodný EVO-DEVO model s různým stupněm malakofágního přizpůsobení odrážející se na charakteru dentice. Další skupina, která nás zajímala byly varani (Varanidae) z velké skupiny Anguimorpha. Varani, vrcholní predátoři, se jeví jako naprosto klíčoví pro další systematický výzkum vývoje dentálních adaptací jako je vznik komplikované struktury plicidentinu. Tato skupina není v chovech příliš zastoupena a dostupnost embryologického materiálu je tedy více méně náhodná. Další nevýhodou varanů je jejich dlouhá *in ovo* inkubace a mohutné kosti. Oba tyto aspekty pak poukazují na časovou náročnost výzkumu. Posledním zkoumaným druhem byl chřestýšovec *C. albolabris* (Viperidae) z bazální skupiny moderních hadů. Tento druh se osvědčil z důvodu nejlepší dostupnosti a to i cenové. Nevýhodou tohoto druhu je jeho živorodost, která je pro zmijovité hady typická. To nám neumožnilo zkoumat dynamiku vývoje zubní lišty, jedové žlázy a způsob zakládání prvních jedových zubů v průběhu embryogeneze. Pro

výzkum vývoje jedového kanálku se tento druh ale osvědčil. Do budoucna zvažují doplnění tohoto výzkumu o analýzu vývoje jedového aparátu v průběhu embryogeneze u zmije *Cerastes cerastes*, která je mezi Viperidae jednou z mála vejcorodých výjimek. Tato zmije je oproti *C. albolabris* hůře množitelná, ale je poměrně bohatě zastoupená v chovech. První odontologická data, zde nezmiňovaná, byla na tomto druhu již vyzískána. V současnosti také začínáme s výzkumem vývoje jedového aparátu u Elapidae, kteří vyvinuly systém jedového aparátu nezávisle na zmijovitých hadech. Získání embryologického materiálu této skupiny je vzhledem k jedovatosti a poměrně řídkému zastoupení v chovech a ceně náročné.

Při popisu *in ovo* embryonálního vývoje *V. indicus* naše výsledky ukázaly, že tělní struktury tohoto druhu vykazují podobnou dynamiku vývoje jako u ostatních plazů (například stejná sekvence zakládání předních a zadních končetin) kromě akcelerovaného vývoje nosní oblasti, vomeronasálního orgánu, očí drápů, velkého srdce a robustní muskulatury. Tyto části těla vykazují vysokou míru adaptace varanů na jejich životní styl vrcholných predátorů.

V průběhu výzkumu jsme detailně popsali vývoj zubů u *P. picta*, *Ch. calypttratus* a *V. indicus* s akcentem na enigmatické zuby nulté generace u *P. picta* a *V. indicus*. Vyzdvihly jsme, že plesiomorfním stavem v rámci plazů je iniciace vývoje prvních zubů z orálního epitelu před vznikem zubní lišty. Chybění skloviny u prvních zubů nulté generace jsme vztáhli k nevyvinuté vrstvě „stratum intermedium“ a postupné objevení se tenké vrstvy skloviny u později zakládaných zubů nulté generace k založení „SI“ v průběhu stádia pohárku. Mezi další důležité výdobytky této dizertace patří zjištění, že u šupinatých plazů se vyskytuje výše zmiňovaná vrstva „SI“ s podobnou charakteristikou, jako má savčí SI, včetně dynamiky exprese *Shh* a buněčné proliferace. Zmínili jsme, že tato vrstva je v literatuře mylně zaměňována za hvězdicovité retikulum, což při porovnávání se situací u savců vytváří ve výsledku chybné interpretace dat.

Mezi další objevy patřilo nalezení indicií rozpadu HERS u *V. indicus* a *P. picta*, který před tím nebyl u šupinatých plazů popsán. Tento proces se zdá být nutností pro vytvoření pleurodontního typu ankylózy. U *P. picta* docházelo k vymizení HERS zejména na labiální straně sklovinného orgánu. Distální konec sklovinného orgánu, po vymizení HERS, pak měl vyvinutou střední vrstvu. U *V. indicus* jsme našli jednu rozpadající se vrstvu HERS. U *Ch. calypttratus* s akroodontním typem dentice nebyla dvojvrstevná HERS na linguální straně vyvinuta. Sklovinný orgán zde měl vytvořenou poměrně silnou střední vrstvu sklovinného orgánu. Na labiální straně tato střední vrstva

mohla chybět, nebo byla slabě vyvinuta. Takovýto distální konec sklovinného orgánu se v průběhu embryogeneze nedezintegroval. Přítomnost střední vrstvy jsme tedy interpretovali jako důležitý stabilizační prvek. Tuto teorii pak nepřímo podpořil nálezný u *C. albolabris*, kde docházelo k dezintegraci dvojvrstvy IDE spojující vnější část jedového zubu s vyvíjejícím se kanálkem pro vedení jedu.

Významná část dizertace se zabývala mechanismem diferenciací sklovinného orgánu, vývojem zubních hrbolků a hledáním homologických struktur k savčím sklovinným uzlům, které by mohli být signalizačními centry u plazů, řídícími přechod ze stádia pupenu do stádia pohárku, a později vývoj zubních hrbolků. Poukázali jsme, že plně homologická struktura k PEK savců se u šupinatých plazů nevyvíjí a že shluk buněk epiteliálního pupenu, později dávající vzniku vrstvám IDE a „SI“, díky své časoprostorové dynamice exprese *Shh* a objevením se apoptózy je preadaptací pro vznik savčího PEK. Velkým rozdílem pak je, že na rozdíl od savců, plazí struktura přispívá dává přímo vzniknout větší části vrstev IDE a „SI“. Hypotetizujeme, že na evoluci savčího PEK se pravděpodobně podílel heterochronický posun exprese některých genů z pozdějších stádií do stádia pupenu. To může být důvodem větších možností v růstové dynamice zubního zárodku a diferenciaci zubního tvaru, tak jak je známe u savců. Při vývoji labiálního a linguálního zubního hrbolku u *P. picta*, *Ch. calypttratus* a *Ch. porcus* byla iniciálním krokem invaginace pruhu centrálních ameloblastů do mezenchymu zubní papily. Vytvořil se tak základ pro dvojhrbolkový tvar, který byl později fixován sekrecí dentinu a umocněn sekrecí skloviny. V místě zubních hrbolků, které jsou tvořeny sklovinnými hřebeny, se nachází v IDE, na rozhraní mezi pruhem ameloblastů v centru IDE a sousedními buňkami IDE, vmezeřené buňky, které nekomunikují s mezenchymem zubní papily. Tyto buňky neproliferují a jsou v době pozdní mineralizace odstraněny apoptózou. Je tedy možné, že tyto buňky korespondují k SEK savců. Vlastní zubní hrbolky jsou pak tvořeny nerovnoměrnou sekrecí skloviny, která je největší v oblasti hřebenů a hrbolků. U *Ch. porcus* s trikonodontními zuby vznikají boční hrbolky pravděpodobně jiným mechanismem. Situace v IDE mezi centrálním hrotem a bočním hrbolkem je oproti situaci v oblasti labiálního a linguálního hrbolku inverzní. Vmezeřené buňky na rozhraní mezi centrálním hrotem a mediálním či distálním bočním hrbolkem jsou v kontaktu s přilehlou vrstvou mezenchymu zubní papily, ale nejsou v kontaktu s mocnou vrstvou „SI“, která se v úžlabině mezi hrbolky nachází. Hypotetizujeme, že velikost těchto hrbolků řídí vmezeřené buňky a úhel připojení k centrálnímu hrotu „SI“.

Při zkoumání vývoje jedových zubů *C. albolabris* jsme částečně vyřešili mechanismus vývoje jedového kanálku, o který se dlouhou dobu vedly spory. Prvním stádiem vývoje jedového kanálku je invaginace IDE a středních vrstev sklovinného orgánu do mezenchymu zubní papily. Zvětšování průměru kanálku je řízeno nárůstem moci hvězdčovitěho retikula, které vyplňuje vznikající kanálek. Významnou roli v tomto procesu hraje exprese Shh, která zde patrně působí jako mitotický a antiapoptický aktér (v době exprese Shh dochází k nárůstu buněčné proliferace uvnitř kanálku). V další fázi vývoje dochází k mineralizaci kanálku a následně, po vymizení exprese Shh z hvězdčovitěho retikula uvnitř kanálku, k jeho vyčištění a zprůchodnění pro vedení jedu apoptózou.

Při zkoumání změn v dentici chamaeleolisů a jim příbuzného druhu *A. barahoe* (porovnávali jsme první funkční generaci zubů u embryí před vylíhnutím s funkčními generacemi plně vzrostlých dospělých jedinců) jsme zjistili, že obecným trendem v evoluci chamaeleolisů je postupné snižování nárůstu počtu zubních pozic mezi první funkční generací zubů a funkčními generacemi zubů přítomných u dospělých jedinců. Finálním stavem je, že u výrazně malakofágních druhů počet zubů v zubní řadě nenarůstá vůbec. Zmohutněním zubů a změnou jejich tvaru je pak zároveň kompenzován i růst čelistí. Míra snižování změn v počtu zubů v průběhu postnatálního života pak může odrážet fylogenetické vztahy mezi chamaeleolisy a jim příbuzným *A. barahoe*. Dalším tendencí ve vývoji malakofágní dentice je u *Ch. chamaeleonides* a *Ch. barbatus* objevení se malakofágních adaptací (mediální a distální boční hrbolky je připojen k centrálnímu hrotu vysoko a vytváří jakousi korunku s poměrně velkou skusnou plochou) již v rámci distálních zubů první funkční generace. U ostatních druhů se v rámci první funkční generace projevuje generalizovaný stav přítomný u *A. barahoe*. Trendem u všech druhů chamaeleolisů je postupné vymizení, nebo zmenšení mediálních a distálních bočních hrbolků v průběhu postnatálního vývoje.

8. LITERATURA

- Albert EM, San Mauro D, Ruber L, García-París M, Zardoya R** (2009) Effect of taxon sampling on recovering the phylogeny of squamate reptiles based on complete mitochondrial genome and nuclear gene sequence data. *Gene* **441**, 12-21.
- Andrews RM** (2008) Effects of incubation temperature on growth and performance of the veiled chameleon (*Chamaeleo calyptratus*). *J Exp Zool* **309A**, 435-446,
- Andujar MB, Magloire H, Grimaud JA** (1984) Fibronectin in basement membrane of Hertwig's root sheath. Light and electron immunohistochemical localization. *Histochemistry* **81**, 279-282.
- Andujar MB, Magloire H, Hartmann DJ, Ville G, Grimaud JA** (1985) Early mouse molar root development: cellular changes and distribution of fibronectin, laminin and type-IV collagen. *Differentiation* **30**, 111-122.
- Auffenberg W** (1981) *The behavioral Ecology of the Komodo Monitor*. University of Florida, Gainesville, 406 pp.
- Baverstock PB, King D, King M, Birrel J, Krieg M** (1993) The evolution of species of the Varanidae: microcomplement fixation analysis of serum albumins. *Austr J Zool* **41**, 621-638.
- Beuttell K, Losos JB** (1999) Ecological morphology of Caribbean anoles. *Herpetol Monogr* **13**, 1-28.
- Blanc F** (1974) Table de développement de *Chamaeleo lateralis* Gray, 1831. *Ann Embryol Morphol* **7**, 99-115.
- Bogert CM** (1943) Dentitional phenomena in cobras and other elapids with notes on adaptive modifications of the fangs. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* **131**, 285-360.
- Bolk L** (1922a) Odontological essays. Fourth essay. On the relation between reptilian and mammalian dentition. *J Anat* **56**, 107-136.
- Bolk L** (1922a) Odontological essays. Fifth essay. On the relation between reptilian and mammalian dentition. *J Anat* **57**, 55-75.
- Bolker JA** (1995) Model systems in developmental biology. *Bio Essays* **17**, 451-455.
- Bolker JA, Raff RA** (1997) Beyond worms, flies, and mice: it's time to widen the scope of developmental biology. *J Nih Res* **9**, 35-39.
- Boughner JC, Buchtová M, Fu K, Diewert V, Hallgrímsson B, Richman JM** (2007) Embryonic development of *Python sebae* - I: Staging criteria and macroscopic skeletal morphogenesis of the head and limbs. *Zoology* **110(3)**, 212-30.

- Boulenger GA** (1885) Catalogue of Lizards in the British Museum (Nat. His.) **2**, pp. 382
- Brillet C** (1991) Analyse comparative de la structure du comportement sexuel chez deux especes de geckos nocturnes: *Eublepharis macularius* et *Paroedura pictus* (Sauria, Gekkonidae). Behaviour **117**, 117–143.
- Brillet C** (1993) Behavioural cues in sex recognition by two species of nocturnal lizards: *Eublepharis macularius* and *Paroedura pictus*. Amphibia-Reptilia **14**, 71–82.
- Buchtová M, Boughner JC, Fu K, Diewert VM, Richman JM** (2007) Embryonic development of *Phython sebae* – II: craniofacial microscopic anatomy, cell proliferation and apoptosis. Zoology (Jena) **110**, 231-251.
- Buchtová M, Handrigan GR, Tucker AS et al. (2008)** Initiation and patterning of the snake dentition are dependent on Sonic Hedgehog signaling. Dev Biol **319**, 132-145.
- Bullet P** (1942) Beiträge zur Kenntnis des Gebisses von *Varanus salvator* Laur. Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft in Zürich **87**, 139–192.
- Butler PM** (1956) The ontogeny of molar pattern. Biol Rev **31**, 30-71.
- Chuong CM, Patel N, Lin J, Jung HS, Widelitz RB** (2000) Sonic hedgehog signaling pathway in vertebrate epithelial appendage morphogenesis: Perspectives in development and evolution. Cell. Mol. Life Sci. **57**, 1672–1681.
- Cobourne MT, Hardcastle Z, Sharpe PT** (2001) Sonic hedgehog regulates epithelial proliferation and cell survival in the developing tooth germ. J Dent Res **80**, 1974–1979.
- Coin R, Lesot H, Vonesch JL, Haikel Y, Ruch JV** (1999) Aspects of cell proliferation kinetics of the inner dental epithelium during mouse molar and incisor morphogenesis: a reappraisal of the role of the enamel knot area. Int J Dev Biol **43**, 261–267.
- Conrad JL** (2008) Phylogeny and systematics of Squamata (Reptilia) based on morphology. Bulletin of the American Museum of Natural History **310**, 1–182.
- Cooper JS** (1963) The dental anatomy of the genus *Lacerta*. Ph. D. Thesis, Dental School, University of Bristol
- Cundall D** (2002) Evenomation strategies, head form, and feeding ecology in vipers. In: Schuett GW, Hoggren M, Douglas M, Greene H, editors. Biology of the vipers. Eagle Mountain, Utah: Eagle Mountain Publishing. p 149–161.
- Dufaure J, Hubert J** (1961) Table de developpement du lizard vivipare: *Lacerta (Zootoca) vivipara* Jacquin. Arch Anat Microsc Morphol Exp **50**, 309–328.
- Dalrymple G** (1979) On the jaw mechanism of the snail crushing lizards, *Dracaena* Daudin 1802. J Herpetol **13**, 303-311.

- Dassule HR, Lewis P, Bei M, Maas R, McMahon AP** (2000) Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development* **127**, 4775–4785.
- Davit-Béal T, Allizard F, Sire JY** (2006) Morphological variations in a tooth family through ontogeny in *Pleurodeles waltl* (Lissamphibia, Caudata). *J Morphol* **267**, 1048–1065.
- Davit-Béal T, Chisaka H, Delgado S, Sire JY** (2007) Amphibian teeth: current knowledge, unanswered questions, and some direction for future research. *Biol Rev* **82**:49–81.
- Delgado S, Davit-Béal T, Sire JY** (2003) Dentition and tooth replacement pattern in *Chalcides* (Squamata; Scincidae). *J Morphol* **256**, 146–159.
- Delgado S, Davit-Béal T, Allizard F, Sire JY** (2005) Tooth development in a scincid lizard, *Chalcides viridanus* (Squamata), with particular attention to enamel formation. *Cell Tissue Res* **319**, 71–89.
- Dixon JR, Kroll JC** (1974) Resurrection of the generic name *Paroedura* for the phyllodactyline geckos of Madagascar, and description of a new species. *Copeia* **1974**, 24–30.
- Dufaure J, Hubert J** (1961) Table de developpement du lizzard vivipare: *Lacerta (Zootoca) vivipara* Jacquin. *Arch Anat Microsc Morphol Exp* **50**, 309–328.
- Edmund AG** (1960) Tooth replacement phenomena in the lower vertebrates. *Contrib R Ont Mus Life Sci Div* **52**, 1–190.
- Edmund AG** (1962) Sequence and rate of tooth replacement in the Crocrodilia. *Contrib R Ont Mus Life Sci Div* **56**, 1–42.
- Edmund AG** (1969) Dentition. In: Gans C, Bellairs Ad'A, Parsons TS (eds) *Biology of reptilia*, vol I. Academic Press, London, pp 117–200.
- Estes R, Williams EE** (1984) Ontogenetic variation in the molariform teeth in lizards. *J Vertebr Paleontol* **4**, 96–107.
- Fraser GJ, Bloomquist RF, Streelman JT** (2008) A periodic pattern generator for dental diversity. *BMC Biol* **6**, 32.
- Fraser GJ, Graham A, Smith MM** (2004) Conserved deployment of genes during odontogenesis across osteichthyans. *Proc Biol Sci* **271**, 2311–2317.
- Fry BG, Vidal N, Norman JA, Vonk FJ, Scheib H, Ramjan SFR, Kuruppu S, Fung K, Hedges SB, Richardson MK, Hodgson WC, Ignjatovic V, Summerhayes R, Kochva E** (2006) Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature* **439**, 584–588.

- Gritl-Linde A, Bei M, Maas R, Zhang XM, Linde A, McMahon AP** (2002) Shh signalling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation growth and polarization. *Development* **129**, 5323–5337.
- Haas CA, Hedges SB, Maxson LR** (1993). Molecular insights into the relationships and biogeography of West Indian Anolis lizards. *Biochem Syst Ecol* **21**, 97-114.
- Hamburger V, Hamilton HL** (1951) A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* **88**
- Handrigan G, Richman JM** (2010a) Autocrine and Paracrine Shh signaling are necessary for tooth morphogenesis but not tooth replacement in snakes and lizards (Squamata). *Dev Biol* **337(1)**, 171-186.
- Handrigan GR, Richman JM** (2010b) A network of Wnt, hedgehog and BMP signaling pathways regulates tooth replacement in snakes. *Dev Biol* **348(1)**, 130-141.
- Handrigan GR, Leung KJ, Richman JM** (2010) Identification of putative dental epithelial stem cells in a lizard with life-long tooth replacement. *Development* **137(21)**, 3545-3549.
- Hardcastle Z, Mo R, Hui CC, Sharpe PT** (1998). The *Shh* signalling pathway in tooth development: defects in *Gli2* and *Gli3* mutants. *Development* **125**, 2803–2811.
- Harrison HS** (1901) The development and succession of teeth in *Hatteria punctata*. *Q J Microsc Sci* **44**, 161-219.
- Herrel A, Holanova V** (2008). Cranial morphology and bite force in Chamaeleolis lizards – Adaptations to molluscovory? *Zoology* **111**, 467-475.
- Hubert J** (1970) Ultrastructural study on the primordial germ cells during embryonic development of *Lacerta vivipara* Jacquin. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **107(2)**, 264-83.
- Huysseune A, Sire JY** (1998) Evolution of patterns And processes in teeth And tooth-related tissues in non-mammalian vertebrates. *Eur J Oral Sci* **106(1)**, 437-481.
- Jackson K** (2002a) How tubular venom conducting fangs are formed. *J. Morphol.* **252**, 291–297.
- Jackson K** (2002b) Post-ovipositional development of the monocled cobra *Naja kaouthia* (Serpentes: Elapidae). *Zoology* **105**, 203-214.
- Jackson K** (2007) The evolution of venom-conducting fangs: insights from developmental biology. *Toxicon* **49**, 975–981.
- Järvinen E, Tummers M, Thesleff I** (2009) The role of the dental lamina in mammalian tooth replacement. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* **312B**, 1–11.

- Järvinen E, Valimaki K, Pummila M, Thesleff I, Jernvall J** (2008) The taming of the shrew milk teeth. *Evol Dev* **10**, 477–486.
- Jernvall J, Kettunen P, Karavanova I, Martin LB, Thesleff I** (1994) Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating *Fgf-4* gene. *Int J Dev Biol* **38**, 463-469.
- Jernvall J, Thesleff I** (2000) Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev* **92**, 19–29.
- Kaneko H, Hashimoto S, Enokiya Y, Ogiuchi H, Shimono M** (1999) Cell proliferation and death of Hertwig's epithelial root sheath in the rat. *Cell Tissue Res* **298**, 95-103.
- Kearney M, Rieppel O** (2006). An investigation into the occurrence of plicidentine in the teeth of squamate reptiles. *Copeia* **2006**, 337–350.
- Keranen SV, Aberg T, Kettunen P, Thesleff I, Jernvall J** (1998) Association of developmental regulatory genes with the development of different molar tooth shapes in two species of rodents. *Dev Genes Evol* **208**, 477–486.
- Kettunen P, Thesleff I** (1998) Expression and function of FGFs-4, -8, and -9 suggest functional redundancy and repetitive use as epithelial signals during tooth morphogenesis. *Dev Dyn* **211**, 256– 268.
- Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF** (1995) Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev Dyn* **203(3)**, 253-310.
- Klauber LM** (1939) A statistical study of the rattlesnakes. VI. Fangs. San Diego: Society of Natural History Occasional Papers **5**, 3–61.
- Klauber LM** (1956) Rattlesnakes: Their Habits, Life Histories, and Influence on Mankind, vol. 2. University of California Press, Berkeley.
- Kluge AG, Nussbaum RA** (1995) A review of African-Madagascan gekkonid lizard phylogeny and biogeography (Squamata). *Misc Publ Mus Zool Univ Michigan* **183**, 1–20.
- Koch A, Auliya M, Ziegler T** (2010) Update checklist of the living monitor lizards of the world (Squamata: Varanidae). *Bonn Zool Bullet* **57(2)**, 127-136.
- Kochva E** (1963) Development of the venom gland and trigeminal muscles in *Vipera palaestinae*. *Acta Anat.* **52**, 49–89.
- Kochva E** (1978) Oral glands of the Reptilia In: Gans, S.K., Gans, C. (Eds.), *Biology of the Reptilia*, Vol. 8. Academic Press, London, pp. 43–162.

- Koyama E, Wu C, Shimo T et al.** (2001) Development of stratum intermedium and its role as a Sonic hedgehog-signaling structure during odontogenesis. *Dev Dyn* **222(2)**, 78-91.
- Kratochvíl L, Kubička L, Landová E** (2006). Yolk hormone levels in the synchronously developing eggs of *Paroedura picta*, a gecko with genetic sex determination. *Can J Zool* **84**, 1683-1687.
- Kvam T** (1957) The teeth of *Alligator mississippiensis* Daud. I. Initiation and shaping of the tooth germ. *Nytt Mag for Zool* **5**, 11-15.
- Kvam T** (1958a) The teeth of *Alligator mississippiensis* Daud. II. Development of dentin. *J Dent Res* **37**, 532-539
- Kvam T** (1958b) The teeth of *Alligator mississippiensis* Daud. III. Development of enamel. *J Dent Res* **37**, 540-546
- Kvam T** (1958c) The teeth of *Alligator mississippiensis*. IV. Tooth succession. *Nytt Mag Zool* **5**, 43-78.
- Lake AR, Trevor-Jones TR** (1987) Formation of the poison fang canal of the puff adder *Bitis arietans*. *S Afr J Sci* **83**, 668–669.
- Lake AR, Trevor-Jones TR** (1995) The formation of the poison fang of the boomslang *Dispholidus typus*. *S Afr J Sci* **91**, 329–330.
- Leche W** (1893) Über die Zahnentwicklung bei *Iguana tuberculata*. *Anat Anz* **1893**, 793-800.
- Lemus DY, Paz de la Vega Y, Fuenzalida M, Illanes J** (1980) In vitro differentiation of tooth bud from embryos and adult lizards (*L. gravenhorsti*): An Ultrastructural Comparison. *J Morphol* **165**, 225-236.
- Lemus D, Illanes J, Fuenzalida M, Paz De La Vega Y, Garcia M** (1981) Comparative analysis of the development of the lizard, *Liolaemus tenuis tenuis*. II. A series of normal postlaying stages in embryonic development. *J Morphol* **169(3)**, 337–349.
- Lesot H, Vonesch JL, Peterka M, Tureckova J, Peterkova R, Ruch JV** (1996) Mouse molar morphogenesis revisited by three-dimensional reconstruction. II. Spatial distribution of mitoses and apoptosis in cap to bell staged first and second upper molar teeth. *Int J Dev Biol* **40**, 1017–1031.
- Leydig F** (1872) Die Zähne einheimischer Schlangen nach bau und entwicklung. *Arch Mikrosk Anat EntwMech* **9**, 1-35.

- Losos JB, Greene HW** (1988) Ecological and evolutionary implications of diet in monitor lizards. *Biol. J Linn Soc* **35**, 377-407.
- Luan X, Ito Y, Diekwisch TGH** (2006) Evolution and development of Hertwig's rooth sheat. *Dev Dyn* **235**, 1167-1180.
- Luukko K, Loes S, Furmanek T, Fjeld K, Kvinnsland IH, Kettunen P** (2003) Identification of a novel putative signaling center, the tertiary enamel knot in the postnatal mouse molar tooth. *Mech Dev* **120**, 270–276.
- Mackessy SP** (1991) Morphology and ultrastructure of venom glands of the northern pacific rattlesnake *Crotalus viridis oreganus*. *J Morphol* **208**, 109-128.
- Magnusson WE, Taylor JA** (1980) A description of developmental stages in *Crocodylus porosus* for use in aging eggs in the field', *Australian Wildlife Research* **7(3)**, 479-485.
- Mahler DL, Kearney M** (2006) The Palatal Dentition in Squamate Reptiles: Morphology, Development, Attachment, and Replacement. *Fieldiana Zool* **108**, 1–61
- Martin H** (1901) Évolution de la dent intermaxillaire chez l'embryon de la *Vipera aspis*. *J Anat Physiol Paris* **37**, 80-89.
- Matalova E, Tucker AS, Sharpe PT** (2004) Death in the life of a tooth. *J Dent Res* **83**, 11–16.
- Maxwell EE, Caldwell MW, Lamoureux DO, Budney LA** (2011) Histology of Tooth Attachment Tissues and Plicidentine in *Varanus* (Reptilia: Squamata), and a Discussion of the Amniote Tooth Attachment. *J Morphol* 000,000–000
- McCoid MJ** (1993). Reproductive output in captive and wild mangrove monitors (*Varanus indicus*). *Varanews* **3**, 4-5.
- McDiarmid JA, Campbell J, Touré TA** (1999) *Snake Species of the World: A Taxonomic and Geographical Reference 1*, The Herpetologists' League, Washington DC
- McIntosh JE, Anderton X, Flores-de-Jacoby L, Carlson DS, Shuler CHF, Miller WA** (1968) Tooth attachment apparatus in young *Caiman sclerops*. *Arch Oral Biol* **13**, 735-743.
- Miller WA** (1968) Periodontal attachment apparatus in the young *Caiman sclerops*. *Arch Oral Biol* **13(7)**, 735-43.
- Mohammed BH, Darwish ST, Abd El-Hady SI** (2002). Embryonic tooth development in scincid lizard *Mabuya aurata*. *J Egypt Ger Soc Zool* (**39B**): Veretebrate Anatomy & Embryology, 41 – 54.

- Mori A, Ji D, Moriguchi H, Hasegawa M** (1989) Food habits of snakes in East Asia: A biogeographical approach to resource partitioning. In “Current Herpetology in East Asia” Ed by M Matsui, T Hikida, RC Goris, Herpetological Society of Japan, 433–436.
- Motoyama J, Takabatake T, Takeshima K, Hui CC** (1998) Ptch2, a second mouse Patched gene, is co-expressed with Sonic hedgehog. *Nat Genet* **18**, 104–106.
- Mouden EE, Bons J, Pieau C, Renous S, Znari M, Boumezzough A** (2000) Table de developpement embryonnaire d’un lizzard agamide, *Agama impalearis* Boettger, 1874. *Ann Sci Nat* **21**, 93–115.
- Murray JD, Deeming DC, Ferguson MWJ** (1990) Size dependent pigmentation pattern formation in embryos of *Alligator mississippiensis*: time of initiation of pattern generation mechanism. *Proc Roy Soc* **D239**, 279-239.
- Muthukkaruppan V, Kanakambika P, Manickavel V, Veeraraghavan K** (1970) Analysis of the development of the lizard, *Calotes versicolor*. *J Morphol* **130**, 479–490.
- Nakamura M, Bringas P, Slavkin HC** (1991) Inner enamel epithelia synthesize and secrete enamel proteins during mouse molar occlusal „enamel-free area“ development. *J Craniofac Genet Dev Biol* **11(2)**, 96-104.
- Necas P** (1999) Chameleons: nature’s hidden jewels. Frankfurt am Main: Edition Chimaira.. 348pp
- Nicolas A** (1904) Reserches sur l’embryologie des reptiles. IV. La segmentation chez l’ovet. *Arch Biol Paris* **20**, 611–658.
- Nieuwkoop P, Faber J** (Eds.) (1967) Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudln). 2nd ed. North Holland Publ. Co.. Amsterdam.
- Norell MA, Gao K-Q, Conrad JL** (2008) A new platynotan lizard (Diapsida: Squamata) from the Late Cretaceous Gobi Desert (Ömnögov), Mongolia. *American Mus Novit* **3605**, 1–22
- Noro M, Uejima A, Abe G, Manabe M, Tamura K** (2009) Normal Developmental stages of the Madagascarian ground gecko *Paroedura pictus* with special reference to limb morphogenesis. *Dev Dyn* **238(1)**, 100-109.
- Nussbaum RA, Raxworthy CJ** (2000) Systematic revision of the genus *Paroedura* Günther (Reptilia: Squamata: Gekkonidae), with the description of five new species. *Misc Publ Mus Zool Univ Michigan* **189**, 1–26.
- Odermatt C** (1940) Beiträge zur Kenntnis des Gebisses von Heloderma. *Vierteljahrsschrift der Naturforschenden Gesellschaft n Zürich* **85**, 98–141.

- Ogawa T** (1977) A histological study of the gekko tooth. *Shigaku Odontol* **64**, 1377–1388.
- Osborn JW** (1971) The ontogeny of tooth succession in *Lacerta vivipara* Jacquin (1787). *Proc R Soc Lond (Biol)* **179**, 261–289.
- Osborn JW** (1973) The evolution of dentitions. *Am Sci* **61**, 548-559.
- Owen R** (1841) On the teeth of species of the genus *Labyrinthodon* (*Mastodontosaurus* of Jaeger), common to the German Keuper formation and the Lower Sandstone of Warwick and Leamington. *Trans Geol Soc* **2**, 505–513.
- Owen R** (1840-1845) *Odontography*. Hippolyte Baillière, London, 655 pp.
- Payer B** (1968). *Comparative odontology*. Ed and tr. By Zangerl R. Univ Chicago Press, Chicago and London, pp 347
- Paynter KJ, Pudy G** (1958) A study of the structure, chemical nature, and development of cementum in the rat. *Anat Rec* **131**, 233-251.
- Peterka M, Sire JY, Hovorakova M, Prochazka J, Fougeirol L, Peterkova R, Viriot L** (2010) Prenatal development of *Crocodylus niloticus niloticus* Laurenti, 1768. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* **314(5)**, 353-68.
- Peterkova R, Peterka M, Lesot H** (2003) The developing mouse dentition: a new tool for apoptosis study. *Ann N Y Acad Sci* **1010**, 453–466.
- Pianka ER** (1994) Comparative ecology of *Varanus* in the Great Victoria Desert *Austr J Ecol* **19**, 395-408.
- Pianka ER, King, King**, eds (2004) *Varanoid lizards of the world*. 2004. Indiana University Press, Bloomington.
- Pianka ER, Vitt LJ** (2003) *Lizards: Windows to the Evolution of Diversity*. University of California Press, Los Angeles, CA.
- Poe S** (2004) Phylogeny of anoles. *Herp Monogr* **18**, 37–89.
- Poole DFG** (1961). Notes on tooth replacement in the Nile crocodile *Crocodylus niloticus*. *Proc Zool Soc Lond* **136**, 131-140.
- Pough FH, Andrews RM, Cadle JE, Crump ML, Savitsky AH, Wells KD** (2004) *Herpetology*, 3rd Edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Pough FH, Groves JD** (1983). Specializations of the body form and food habits of snakes. *Am Zool* **23**, 443–454.
- Pregill G** (1984) Durophagous feeding adaptations in an amphisbaenid. *J Herpetol* **18**, 186-191.

- Ranzoni C** (1836) De Tupinambidibus Daudini. Novi Commentarii Academiae Scientiarum Institutii bononiensis, Accademia delle Scienze dell' Instituto de Bologna, Bononiae 1834-1849, **2**, 393-414.
- Rathke C** (1968) Untersuchungen über die Entwicklung und den Körperbau der Crocodile. Braunschweig.
- Rieppel O** (1994) Studies on skeleton formation in reptiles. Patterns of ossification in the skeleton of *Lacerta agilis exigua* Eichwald (reptilia, squamata). *J Herpetol* **28**, 145–153.
- Rieppel O, Lobhardt L** (1979). Mandibular mechanics in *Varanus niloticus*. *Herpetologica* **35**, 158-163.
- Rieppel O, Kearney M** (2005). Tooth replacement in the late Cretaceous mosasaur *Clidastes*. *J Herpetol* **39**, 688–692.
- Rodriguez-Schettino L** (1999) The iguanid Lizards of Cuba. University Press of Florida, Gainesville.
- Romer AS** (1956) The osteology of the reptiles. University Chicago Press, Chicago
- Röse C** (1893) Über die Zahnentwicklung vom Chamaeleon. *Anat Anz* **8**, 566 – 577.
- Röse C** (1894a) Über die Zahnentwicklung der Crocodile. *Morphol Arbeit* **3**, 195-228.
- Röse C** (1894b) Über die Zahnentwicklung der Kreuzotter. *Anat Anz* **9**, 439-451
- Röse C** (1895) Beiträge zur Zahnentwicklung der Schwanzmolche. *Morph Arbeit* **4**, 178-192.
- Salazar-Ciudad I, Jernvall J** (2002) A gene network model accounting for development and evolution of mammalian teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 8116–8120.
- Sanger JT, Losos JB, Gibson-Brown JJ** (2008) A developmental staging series for the Lizard genus *Anolis*: A new system for the integration of evolution, development, and ecology. *J Morphol* **269**, 129-137.
- Selvig KA** (1963) Electron microscopy of Hertwig's epithelial root sheath and of early dentin formation in the mouse incisor. *Acta odontol Scand* **21**, 175-186.
- Shapiro MD, Hanken J, Rosenthal N** (2003) Developmental Basis of Evolutionary Digit Loss in the Australian Lizard *Hemiergis* *J Exp Zool Mol Dev Evol* **297B**, 48–56.
- Schmidt K** (1919) Contributions to the herpetology of Belgian Congo based on the collection of the American Museum Congo expedition, 1909-1915. *Am Mus Nat Hist Bullet* **39**, 385-624.
- Schluter D** (2000) The Ecology of Adaptive Radiation. Oxford University Press, Oxford.

- Schwartz A, Henderson RW** (1991) *Amphibians and Reptiles of the West Indies*. University of Florida Press, Gainesville, FL
- Sire JY, Davit-Beal T, Delgado S, Van der Heyden C, Huysseune A** (2002). First generation teeth in nonmammalian lineages: evidence for a conserved ancestral character? *Microsc Res Tech* **59**, 408-434.
- Smith KK** (1986) Morphology and function of the tongue and hyoid apparatus in *Varanus* (Varanidae, Lacertilia). *J Morphol* **187**, 261-287.
- Smith MA, Bellairs Ad'A, Miles AEW** (1953) Observations on the premaxillary dentition of snakes with special reference to the egg-tooth. *J Linnean Soc London (Zool)* **42**, 260-268.
- Smith MA, Bellairs Ad'A, Miles AEW** (1953) Observations on the premaxillary dentition of snakes with special reference to the egg-tooth. *J Linnean Soc London (Zool)* **42**, 260-268.
- Sumida SS, Murphy RW** (1987) Form and function of the tooth crown structure in gekkonid lizards (Reptilia, Squamata, Gekkonidae). *Can J Zool* **65**, 2886-2892.
- Streelman JT, Albertson RC** (2006) Evolution of novelty in the cichlid dentition. *J Exp Zool Mol Dev Evol* **306B**, 216-226.
- Ten Cate AR** (1996) The role of epithelium in the development, structure and function of the tissue of tooth support. *Oral Dis* **2**, 55-62.
- Theiler K** (1972) *The house mouse: Development and normal stages from fertilization to 4 weeks of age*. Springer-Verlag (Berlin and New York).
- Thesleff I, Barrach HJ, Foidart JM, Vaheri A, Pratt RM, Martin GR** (1981) Changes in the distribution of type IV collagen, laminin, proteoglycan, and fibronectin during mouse tooth development. *Dev Biol* **81(1)**, 182-192.
- Thomas HF, Kollar EJ** (1989) Differentiation of odontoblasts in grafted recombinants of murine epithelial root sheath and dental mesenchyme. *Arch Oral Biol* **34**, 27-35.
- Tomes CS** (1875) On the structure and development of the teeth of Ophidia. *Philos Trans R Soc* **165**, 297-302.
- Tomes CS** (1876) On the development and succession of the poison fangs of snakes. *Proc R Soc Lond* **24**, 259-261.
- Tomes CS** (1914) A manual of dental anatomy human and comparative. In: *Marett Tims, H.W., Hopewell-Smith, A. (Eds.), The Teeth of Amphibia Reptiles and Birds*, seventh ed. J & A Churchill, London (Chapter 11).

- Townsend T, Larson A** (2001) Molecular phylogenetics and mitochondrial genome evolution in the Chamaeleonidae (Reptilia, Squamata). *Mol Phylogen Evol* **23**, 22–36.
- Townsend TM, Larson A, Louis E, Macey JR** (2004) Molecular phylogenetics of Squamata: the position of snakes, amphisbaenians, and dibamids, and the root of the squamate tree. *Syst Biol* **53**, 735–757.
- Tucker AS, Sharpe P** (2004) The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet* **5**, 499–508.
- Vaahokari A, Aberg T, Thesleff I** (1996) Apoptosis in the developing tooth: association with an embryonic signaling center and suppression by EGF and FGF-4. *Development* **122**, 121–129.
- Vaahokari A, Aberg T, Jernvall J, Thesleff I** (1996) The enamel knot as a signalling centre in the developing mouse tooth. *Mech Dev* **54**, 39–43.
- Whiting AS, Bauer AM, Sites JW Jr** (2003) Phylogenetic relationships and limb loss in sub-Saharan African scincine lizards (Squamata: Scincidae). *Mol Phylogen Evol* **29**, 582–598.
- Vidal N, Delmas AS, David P, Cruaud C, Couloux A, Hedges SB** (2007) The phylogeny and classification of caenophidian snakes inferred from seven nuclear protein-coding genes. *C R Biol* **330**, 182–187.
- Vidal N, Hedges SB** (2004) Molecular evidence for terrestrial origin of snakes. *Proc R Soc Lond B* **271** (Suppl.), 226-229.
- Vidal N, Hedges SB** (2005). The phylogeny of squamate reptiles (lizards, snakes, and amphisbaenians) inferred from nine nuclear protein-coding genes. *C. R. Biologies* **328**, 1000–1008.
- Vidal N, Hedges SB** (2009) The molecular evolutionary tree of lizards, snakes, and amphisbaenians. *C R Biol* **332**, 129-139.
- Vonk FJ, Admiraal JF, Jackson K et al.** (2008) Evolutionary origin and development of snake fangs. *Nature* **454(7204)**, 630-633.
- Webb PP, Moxham BJ, Ralphs JR, Benjamin M** (1998) Immunolocalisation of collagens in the developing rat molar tooth. *Eur J Oral Sci* **106(1)**, 147-155
- Wentz FM, Weinmann JP, Schour I** (1950) The prevalence, distribution and morphological changes of the epithelial remnants in the molar regions of the rat. *J Dent Res* **29**, 637-646.

- Werneburg I** (2009) A Standard System to Study Vertebrate Embryos. *Plos One* 4(6), e5887
- Westergaard B** (1986) The pattern of embryonic tooth initiation in reptiles. *Mém Mus Natn Hist Nat Paris (Série C)* **53**, 55–63.
- Westergaard B** (1988) Early dentition development in the lower jaws of *Anguis fragilis* and *Lacerta agilis*. *Memoranda Soc Fauna Flora Fennica* **64**, 148-151.
- Westergaard B, Ferguson MWJ** (1986) Development of the dentition in *Alligator mississippiensis*. Early embryonic development in the lower jaw. *J Zool Lond* **210**, 575–597.
- Westergaard B, Ferguson MWJ** (1987) Development of the dentition in *Alligator mississippiensis*. Later development in the lower jaws of embryos, hatchlings and young juveniles. *J Zool Lond* **212**, 191-222.
- Westergaard B, Ferguson MWJ** (1990) Development of the dentition in *Alligator mississippiensis*: Upper jaw dental and craniofacial development in embryos, hatchlings, and young juveniles, with a comparison to lower jaw development. *Am J Anat* **187**, 393-421.
- Wilson EO** (1957) Behavior of the zuban lizard *Chamaeleolis chamaeleonides* (Dumeril And Bibron) in captivity. *Copeia* **1957**, 145.
- Wise PA, Vickaryous MK, Russell AP** (2009) An embryonic staging table for in ovo development of *Eublepharis macularius*, the leopard gecko. *Anat Rec* **292(8)**,1198-212.
- Woerdeman MW** (1919) Beiträge zur Entwicklungsgeschichte von Zähnen und Gebiss der Reptilien. Beitrag I. Die Anlage und Entwicklung des embryonalen Gebisses als Ganzes und seine Beziehung zur Zahnleiste. *Arch Mik Anat* **92**, 104–192.
- Woerdeman MW** (1919) Beiträge zur Entwicklungsgeschichte von Zähnen und Gebiss der Reptilien - Beitrag II: Über die Anlage des Ersatzgebisses und den Zahnwechsel (Distichie- und Matrix-Theorie). *Arch mikr Anat* **92**, 183-230
- Woerdeman MW** (1919) Beiträge zur Entwicklungsgeschichte von Zähnen und Gebiss der Reptilien - Beitrag III: Über den Eizahn. *Arch Mikr Anat* **92**, 231-244.
- Woerdeman MW** (1921) Beiträge zur Entwicklungsgeschichte von Zähnen und Gebiss der Reptilien - Beitrag IV: Über die Anlage und Entwicklung der Zähne. *Arch Mikr Anat* **95**, 265-395.
- Woerdeman MW** (1921) Beiträge zur Entwicklungsgeschichte von Zähnen und Gebiss der Reptilien - Beitrag V: Über die Beziehungen der Mundhöhlendrüsen zum Zahnsystem. *Arch Mikr Anat* **95**, 396-413.

Wüster W, Peppina L, Pooka CE, Walkera DE (2008) A nesting of vipers: Phylogeny and historical biogeography of the Viperidae (Squamata: Serpentes). *Mol Phyl Evol* **49(2)**, 445-459.

Yamamoto H, Ishizeki K, Sasaki J, Nawa T (1998) Ultrastructural and histochemical changes and apoptosis of inner enamel epithelium in rat enamel-free area. *J Craniofac Genet Dev Biol* **8**, 44–50.

Yntema CL (1968) A series of stages in the embryonic development of *Chelydra serpentina*. *J Morphol* **125(2)**, 219-51.

Zahradnicek O, Horacek I, Tucker AS (2008) Viperous fangs: development and evolution of the venom canal. *Mech Dev* **125(9-10)**, 786-796.

Zehr DR (1962) Stages in the normal development of the common garter snake, *Thamnophis sirtalis sirtalis*. *Copeia* **2**, 322–329.

Zug GR, Vitt LJ, Caldwell JP (2001) *Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*, Academic Press, San Diego, CA, USA.

9. PŘÍLOHY

9.1. Seznam příloh

- 1) Vývoj zubů u modelového druhu plaza: zuby funkčních a nulté generace u gekona *P. picta*
- 2) Tabule normálního vývoje pro varany: varan mangrovový (*Varanus indicus*)
- 3) *Varanus indicus*: vývoj zubů nulté a funkčních generací
- 4) Vývoj dentice u *Chamaeleo calyptratus*, monofyodontie, akrodoncie a heterodontie
- 5) Dentice chamaeleolisů: malakofágní adaptace, změny v dentici v postnatálním vývoji
- 6) Vývoj jedových zubů a kanálku pro vedení jedu u chřestýšovce *Cryptelytrops albolabris*: role *Shh*, apoptózy a buněčné proliferace
- 7) Diferenciace sklovinného orgánu a vývoj zubních hrbolků u šupinatých plazů: role *Shh*, apoptózy a buněčné proliferace

**Vývoj zubů u modelového druhu plaza: zuby funkčních
a nulté generace u gekona *P. picta***

Tooth development in a model reptile: functional and null-
generation teeth in the gecko *P. picta*

Oldrich Zahradnicek*², Ivan Horacek², Abigail S Tucker¹

¹Department of Craniofacial Development and Orthodontics, Floor 27
Guy's Tower, Guy's Hospital, King's College London, London Bridge,
London, UK SE1 9RT

² Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University, Prague,
Czech Republic.

*Author for correspondence: o.zahradnicek@gmail.com

Running title: Tooth development in a model reptile

Key words: Gecko, Tooth, development

Summary:

This paper details tooth development in a basal squamate, *Paroedura Picta*. Due to its reproductive strategy, mode of development and position within the reptiles, this gecko represents an excellent model organism for the study of reptile development. The dental pattern of teeth is documented along with the development of non-functional (null-generation), and functional generations of teeth during embryonic development. Tooth development is followed from initiation to cytodifferentiation and ankylosis, as they form bud, cap and bell stages. The fate of the non-functional (null-generation) teeth is shown to be variable, with some teeth being expelled from the oral cavity, while others are incorporated into the functional bone and teeth, or absorbed. Fate appears to depend on initiation site within the oral cavity, with the first null-generation teeth forming before formation of the dental lamina. We show evidence for a stratum intermedium layer in the enamel epithelium of functional teeth and discuss the links between its formation and deposition of enamel.

Key words: reptile, dentition, tooth development, null-generation

Introduction

The structural qualities of teeth and design of the dentition are often viewed as pertinent characteristics of particular clades of vertebrates and key factors responsible for their evolutionary prosperity. Given this, comparative information on dental characters, and the developmental mechanisms that produce them, can essentially refine our comprehension of the dynamics of vertebrate evolution. To address this task it is important to examine (a) dental development in a wide spectrum of different clades represented – if possible - by a model taxa close to the stem lines of extant crown groups, illustrating the phylotypic setting of dental specificities in the respective clades, and (b) distribution of particular dental characters over a phylogenetic tree to establish a vivid view of the actual pathways of dental phylogeny. However, the current taxonomical sampling available for such studies is largely biased. The main model taxa of dental development (zebra fish, mouse, human) are greatly derived and sufficiently rich comparative information is available perhaps only in mammals (eg. Thesleff et al. 1995; Thesleff et Sharpe, 1997; Jernvall, 2000; Thesleff & Mikkola, 2002; Kangas et al. 2004; Mitsiadis et Graf, 2009; Cobourn et Sharpe, 2010; Salazar-Ciudad et Jernvall, 2010). In comparison to mammals, only very little is known about dental development and the developmental background of dental variation in other tetrapods, both Amniota and Anamnia. Nevertheless, the traditional odontologic comparisons (e.g. Underwood, 1903; Peyer, 1968; Edmund, 1960, 1969) provide convincing evidence that the major divergences in amniote radiations are accompanied by clade-specific dental rearrangements. While dental evolution in Synapsida and Archosauria show, despite clear differences, certain similarities (thecodonty, reduction of teeth number, enlarging teeth, convergent appearance of prismatic enamel in several crown groups – (compared in Buffetaut et al. 1986)), the situation in Lepidosauria is clearly different. Although Lepidosauria are the largest clade of non-volant amniotes with more than 8000 species, the extent of dental rearrangements in this clades is much smaller than in other amniote tetrapods. Despite variation in tooth attachment (pleurodont to acrodon), extant Lepidosauria are almost all characterized by a homodont dentition composed of a large number of relatively small uniform conical teeth, structurally often resembling the dentition of extant amphibians. Except for the most derived clade, the Toxicofera (Vidal et Hedges, 2005), this is entirely valid for one the two major clades of Lepidosauria, the Squamata, however the other major

clade, the Rhynchocephalia, is characterized by a greatly derived heterodont dentition, including the formation of palatal bones (Evans et al. 2001). When identifying a model taxon illustrating plesiomorphic condition in Lepidosauria ideally one would turn to the most basal clade of squamate radiation – the Gekkota (Vidal et Hedges, 2005; Wiens et al. 2010). The dentition of gekkonids fits well with the expected plesiomorphic condition in lepidosaurs (small numerous and morphologically uniform teeth with pleurodont attachment), however the Gekkota show some features by which they differ from more derived clades. They have (a) a small tooth crown compared to the height of their cylindrical sockets and (b) bicuspid arrangement of the crown tips. The lingually tilted cusps characteristic of gekkonids are also reported in caecilians and extinct dissorophoid amphibian (Sumida et Murphy, 1987). Tentatively, this may suggest that the dental specificities of gekkonids are true autplesiomorphies and, hence, this group closely approaches the basal condition of amniote dental evolution.

This is the first reason why the Madagascan ground gecko, *Paroedura picta*, has been chosen for a detailed analysis of its developing dentition. The second reason is its reproductive strategy, which makes the embryos accessible and amenable for study. Recently tooth development has been studied in a variety of squamate species (corn snake, Python, pitviper, Bearded dragon, Leopard gecko). Although useful models of specific aspects of tooth development, these species provide problems as standard model taxa for developmental research as their reproductive characteristics do not allow for a controlled harvesting of embryonic material. In contrast, the Madagascan ground gecko, *Paroedura picta*, is emerging as a suitable choice (Noro et al. 2009). The adults are small and easy to keep in captivity, with breeding colonies currently set up in the Czech Republic, Japan and London. Eggs are laid relatively early in development, when compared to other reptiles, such as anole and python (Sanger, 2007; Buctova et al., 2007), allowing for stages of neurulation and neural crest migration to be studied. Importantly, the eggs have calcified hard shells (Kratochvíl et al. 2006), unlike the more leathery shells of most reptiles, allowing for the possibility of windowing eggs during development, in a similar manner to the chick (Noro et al. 2009). Such windowing is possible in leathery eggs but the mortality rate is extremely high due to the problems of re-sealing making most experiments non-viable (Nagashima et al., 2007). The hard nature of the shells also allows the eggs to be moved successfully, which can be a problem with softer eggs which are often glued together in clutches and cannot be separated for experimentation. 2 eggs are laid at a time every 7-10 days

throughout the year, providing a constant supply of eggs. *Anolis* lizards have been suggested as a potential model organism (Sanger et al. 2007) but have the disadvantage of being seasonal (Lee et al. 1989), and lay one egg every one to four weeks (Andrews, 1985). *P. picta* thus incorporates many of the characteristics of a successful model organism and a staging series has recently been produced (Noro et al. 2009).

Although reptilian teeth have been studied for the last two centuries, surprisingly few papers have investigated their development. Most of these have used histology to follow tooth development in archosaurs (eg. Owen, 1840-1845; Rathke, 1866; Röse, 1894a; Woederman, 1919a,b,c, 1921ab, Bolk, 1922a,b; Kvam, 1957, 1958a,b,c; Edmund, 1960, 1962, 1969; Poole, 1961; Miller, 1968; Westergaard et Ferguson, 1986, 1987, 1990), and lepidosaurian reptiles (eg. Owen, 1840-1845; Tomes, 1875, 1876; Leche, 1893; Röse, 1893, 1884b; Martin, 1901; Bolk, 1922a,b; Woederman, 1919a,b,c, 1921ab; Bogert, 1943; Smith et al., 1953; Edmund, 1960, 1969; Cooper, 1963; Kochva, 1963; Hubert, 1970; Osborn, 1971; Ogawa, 1977; Westergaard, 1986,1988; Lake et Trevor-Jones, 1987, 1995; Mohammed et al. 2002; Delgado et al. 2005; Buchtova et al., 2007).

Recently molecular techniques have been introduced and a number of genes cloned to allow an understanding of the genetics involved in reptile tooth development but such studies are still more or less exceptional (Vonk et al. 2008; Zahradnicek et al. 2008; Buchtová et al. 2008; Handrigan et Richman, 2010; Handrigan et al. 2010a,b). *P. picta* possesses teeth on the mandibular, maxilla and pre-maxilla bones. The palatal bones are free of teeth as in most reptilian species. The *P. picta* dentition is polyphyodont with homodont teeth pleurodontly ankylosed to the jaw bones. This type of ankylosis is the general condition for extant reptiles except agamids, chamaeleons with acrodont ankylosis and archosaurs with a thecodont type of tooth attachment (Edmund, 1960). The functional teeth are bicuspid and are covered by a non-prismatic enamel layer. In contrast to the functional teeth, a number of null generation non-functional teeth, form during embryonic development, which are similar to those observed in other reptiles (eg. Leche, 1893; Rose, 1894; Cooper, 1963; Lemus et al. 1980; Westergaard et Ferguson, 1986, Westergaard, 1988a,b; Mohammed et al. 2002; Delgado et al. 2005; Handrigan et Richman, 2010). These null generation teeth are unicuspid with a reduced layer of enamel or lacking enamel completely. Information about the fate of null generation teeth is rather sporadic, and therefore while

investigating the development of the functional dentition we also investigated the development and fate of these teeth.

Material and methods

Preparation of biological materials

Seventy embryos of gecko *P. picta* at different stages, two juveniles and one adult specimen were used during this investigation. *P. picta* staging table of normal development was used for the staging (Noro et al., 2009) and anoted as dpo (days post-ovulation). Eggs were incubated in dry climaboxes at 28C. Embryos were killed by MS222 and fixed in 4% PFA over night. The juveniles and adult died naturally and came from the collection of the department of Zoology. They were fixed in 70% Ethanol for an extended period.

SEM procedure

The jaws of juvenile and adult specimen were carefully mechanically prepared and cleaned from the soft tissue, dehydrated in a graded ethanol series and 100% acetone, air dried, glued on to a copper support, coated with a thin layer of gold and observed by JEOL SEM 6380 LV operating at 25 kV.

Histology

Two histological methods were used. Specimen for the alizarin red S staining were washed in distilled water and stained in alizarin red S stainig solution in 1.5% KOH for two days. After the staining the specimens were cleared in 50% glycerol for one day and than in 100% glycerol, where the tissue was stored. The older bone containing specimen which were used for histology staining were decalcified in 5% EDTA in 10% formaldehyde at RT. The time of decalcification ranged from one week to several weeks depending on the grade of ossification. Bone free specimens or decalcified specimens were washed in PBS and subsequently dehydrated through an ethanol series, embedded in paraffin wax and frontally sectioned at 6–10 um. Sections were stained with a trichrome stain (alcian blue, haematoxyline, eosine) and mounted in DPX.

Results

The functional dentition

The fully developed functional teeth of *P.Picta* are similar in shape throughout the jaw (homodont) and bicuspid at the tips (Fig. 1A). The rather shallow cusps are situated labially and lingually on the tip of the crown (Fig. 1B). The tooth crown forms one third of the total tooth length and is covered by a layer of non-prismatic enamel. The sides of the crown are augmented by a sequence of low vertical enamel ridges (Fig. 1B). There are two egg teeth in the premaxilla, which, in contrast to the rest of the dentition, are not bicuspid but possess two rounded enamel crests (Fig. 1D). The tooth base is formed from dentine and is pleurodontly ankylosed to the lingual side of the bone of attachment. The enamel coat is not formed at the base of the tooth. A serrated crest is visible at the point where the tooth meets the bone (Fig. 1E).

Dental pattern during development

To understand how the pattern of the teeth is laid down during development we followed tooth initiation patterns in the developing lower jaw. The first teeth to develop are the null generation non-functional teeth. These are smaller in size than the functional teeth and form near to the oral surface. The first tooth forms in the mesial area of the jaw before 14dpo, with the second tooth forming posterior/proximal to the first one. The subsequent teeth develop both anteriorly/distal and posteriorly/proximal to the first teeth. The later initiated teeth within the null generation are bigger than the first teeth initiated, while no obvious size difference was noted between subsequent generations of functional tooth germs. The newly formed teeth develop close to their most mature neighbours (Fig. 2A - D).

Null generation teeth form around 13 tooth positions within each lower jaw. By 35dpo a successive tooth generation of functional teeth were visible in some tooth rows along the dental lamina (Fig. 2C). These teeth replace the null generation teeth. The functional teeth had grown in size while the most superficial null generation teeth remained small. By 40dpo the successional teeth had started to mineralise in each tooth row along most of the lamina (Fig. 2D). These successional teeth replace both the null and functional tooth generations. By the end of embryonic development there were approximately 30 dental positions in each half of the lower jaw, the number correlating to the size of the animal at hatching (Fig. 2E). During postembryonic stages the number

of tooth positions increased with up to 50 teeth on one side of the lower jaw (Fig.1A). By 60dpo the first signs of tooth resorption of the functional dentition were visible as the successional teeth of the second functional generation started to move orally in some areas of the jaw (Fig. 2E, Fig. 10E).

Embryonic development of teeth of the null generation

The null generation dentition forms simple unicuspid teeth, compared to the bicuspid functional dentition (Fig. 3A-F). In some cases the teeth were conical (Fig. 3A), others rounded (Fig. 3B,D), cylindrical (Fig. 3C) or hooked (Fig. 3E). The different shapes appeared to correlate with different regions of the jaw. For example, the cylindrical tooth germs were associated with mesial region of the lower jaw. In later forming null-generation teeth a small enamel ridge was visible by SEM (Fig. 3F).

The first and second null generation teeth initiated directly from the oral epithelium before 14dpo (Fig. 4A). The first tooth in the lower jaw formed before Meckel's cartilage appeared, while the second tooth formed during the first signs of cartilage chondrification. The first teeth in the maxillar region were initiated slightly earlier than the mandible teeth. The first sign of tooth development was the appearance of a thickened dental placode in the oral epithelium, around which the mesenchyme started to condense (Fig. 4A). These first teeth projected out from the oral epithelium into the oral cavity at the cap/bell stage, as has been described for archosaurian teeth (Fig. 4B) (Westergaard & Ferguson, 1986). As these first null generation teeth reached the bell stage, the odontogenic band of the oral epithelium started to invaginate into the mesenchyme at the position of the first teeth, forming the dental lamina (Fig. 5). The enamel organ of the first and second tooth germs sunk into the mesenchyme as the dental lamina grew inwards and these first teeth no longer markedly projected out from the oral epithelium (Fig. 4C). At this stage, the centre of the inner dental epithelium (IDE) of the first tooth was in direct contact with the superficial layer of the oral ectoderm. The cells of the IDE were short columnar to cuboidal and did not form typical polarized ameloblasts, as observed in functional teeth in the crown area at later stages. The oral epithelial cells in direct contact with the central cells of the IDE underwent apoptosis (programmed cell death) (data not shown). The cells of the dental papilla, which neighboured the IDE, appeared more rounded and larger than the rest of the mesenchymal cells of the papilla, and started differentiating into odontoblasts (Fig. 4C). The following sets of null-generation tooth germs were connected intricately with

the dental lamina and were initiated from the labial side of at the base of the lamina (Fig.5A-D). These tooth germs did not markedly project from the oral epithelium surface. The dental mesenchyme weakly condensed around the placodes, which becoming more pronounced by the cap stage (Fig. 5A,B). The tooth germ of these early developing teeth underwent the classic transition from the cap (Fig. 5B) to bell (Fig. 5C), with the formation of a limited number of odontoblasts and the deposition of dentine (Fig. 5D). In some cases only a single odontoblasts was observed in the dental papilla during the mineralization phase (Fig. 5E). In some cases the functional tooth was observed developing directly above the tooth of the null generation. The large size difference between the two tooth types is clearly evident (Fig. 5E). In these later null generation tooth germs, the outer dental epithelium (ODE) was hypoplastic in the cervical loop area and was missing in the rest of the enamel organ where the boarder between the enamel organ and mesenchyme was formed by the dental lamina (Fig. 5A-D). Cells of the inner dental epithelium (IDE) elongated but remained unpolarised and no evidence of enamel deposition was observed (Fig. 5D).

Another set of around eight null generation teeth subsequently initiated from the growing front of the dental lamina deeper in the mesenchyme. The enamel organ of these teeth did not fully sink into the dental lamina, as was observed with earlier tooth germs (Fig. 5F), and as a result the outer dental epithelium and cervical loops were clearly developed (Fig. 5F). The middle layer of the enamel organ was composed of two layers: a layer of flattened cells neighbouring the IDE, not observe in the most superficially developed null generation teeth, and the stellate reticulum, which was more organized in comparison to the more superficial teeth (Fig. 5F). Elongated ameloblasts were apparent, and in a few cases a thin layer of enamel was evident capping the dentine (Fig. 5F). In a few cases these teeth appeared to attempt to ankylose to the upper jaw bones, although this was not observed in the lower jaw (Fig. 6F). The ankylosis was observed at the edge of the bone, or the tooth germs of the null generation became completely encapsulated by the developing jaw bone (Fig. 6F).

Fate of null-generation teeth

The fate of such null-generation teeth is unclear. It has been hypothesised that they might be pushed out of the oral cavity and expelled, or absorbed by the surrounding tissue (Westergaard & Ferguson, 1986). To identify the fate of the large number of null-generation teeth in *P.Picta* these teeth were followed during late

embryonic development. Interestingly, depending on their position, the null-generation teeth underwent a number of different fates. Those tooth germs that developed directly above a functional tooth were incorporated into the enamel organ of the functional tooth and then were pushed out into the oral cavity as the functional tooth erupted (Fig. 6A,B). In other cases the null-generation teeth became completely enclosed by the dental lamina, and were moved around through the movement of the growing lamina (Fig. 6C), or were moved out of the dental lamina (Fig. 6D). These teeth appeared to be removed by osteoclasts, which surrounded the tooth rudiments and resorbed them (Fig. 6E). Finally those null-generation teeth that ankylosed to the forming jaw bones, and were surrounded by the bone, were incorporated into the bone itself and appeared to become part of the functional jaw (Fig. 6F).

Embryonic development of the functional dentition

Unlike the superficial null-generation teeth, the functional teeth developed from the dental lamina deep within the forming jaw. The first buds of the functional dentition were observed before 20dpo, less than a week after the first null-generation tooth germs were observed. The cells at the top of the dental lamina on the labial side formed a bud, surrounded by condensing mesenchyme (Fig. 7A,B). During the bud-cap transition three layers became distinct within the enamel organ, the inner dental epithelium (IDE), outer dental epithelium (ODE) and a central medular dental epithelium (MDE) (Fig. 7C,D). Cap stage functional teeth were observed from 20dpo. The shape of the tooth germ did not change as it moved from cap to bell, this transition being marked by the differentiation of the IDE into ameloblasts and adjacent mesenchyme into odontoblasts (Fig. 8A). At this stage the MDE was composed of two cell layers: rounded and flattened cells (Fig. 8C). The rounded cells, which formed between the flattened cells and the ODE, formed the stellate reticulum (SR). The identity of the darkly staining flattened layer of cells, located between the SR and the IDE, is unclear but these cells may represent a type of stratum intermedium (SI), a cell type only associated with mammalian teeth and not previously observed in lizards (Delgado et al., 2005). The cervical loops developed asymmetrically, with the lingual loop being larger than the labial, with larger cells (Fig. 8A,B). As the tooth reached the late bell stage the IDE cells became further elongated and polarised, with the nuclei situated at the proximal pole (Fig. 8A-C). The layer of mature ameloblasts spread out from the apex of the tooth, through the IDE towards the cervical loops. This wave was matched by a similar

wave of odontoblast differentiation and pre-dentine production from the centre of the dental papilla out towards the cervical loops (Fig. 8B,D,E). Odontoblastic processes were evident reaching toward the enamel-dentine junction (EDJ) (Fig. 8D). Mature odontoblasts were large, elongated and polarised (Fig. 8B). In older specimens an enamel cap was obvious on top of the dentin (Fig. 8F). The functional teeth were vascularised during the late mineralisation stages with the formation of blood vessels in the dental pulp (Fig. 9). Such vascularisation was never observed in the null-generation teeth.

Tooth base development and ankylosis of the functional dentition

As the tooth crown started to take shape, the tooth base started to develop with the formation of Hertwig's root sheath (HERS) at the bottom of the cervical loops. This area was composed of cells from the IDE and ODE making a double layer structure. The labial side of HERS was much shorter than the lingual one (Fig. 9A). The adjacent papilla cells differentiated as odontoblasts and produced the dentine of the tooth base. The functional teeth were observed fusing to the jaw-bones from around 50dpo. Ankylosis was first observed on the labial side (Fig. 9B). The double layer of HERS cells was no longer observed at the site of ankylosis, the tooth base ending in three epithelial layers. No evidence of HERS disintegration, such as isolated rests of epithelial cells, however, was observed at the base of the tooth. Odontoblasts, osteoblasts and cementoblasts produced a mixture of dentine, bone and cementum matrix at the junction between the tooth and bone (Fig. 10A-C). These tissues mineralised and firmly fixed the tooth in position. A distinct border between the dentine and bone was visible on both sides of the tooth. Interestingly, in some cases cells were observed trapped between the fusing mineralised tissue, forming islands of tissue (Fig. 11A). During ankylosis of the tooth to the bone, the enamel organ overlying the mineralised tissue flattened and degraded to leave an open path for the tooth to emerge (Fig. 10A). Eruption of the functional dentition was observed from 60dpo (Fig. 11A).

Even as the functional dentition was starting to erupt, the replacement tooth behind could be seen pushing up against the first tooth, leading to resorption of the dentin and remodelling of the bone (Fig. 11B). The replacement tooth moved up on the lingual side of the first tooth, while the labial tooth-bone connection remained solid (Fig. 11B). Osteoclast-like cells could be observed on the inner surface of the first tooth lining the dentin next to the site of resorption (Fig. 11C). These osteoclast-like cells

were only observed on the lingual side of the tooth, correlating with the pattern of resorption on the lingual side only.

Discussion

Functional dentition

Similar to most lizards, *P. picta* has a homodont type of dentition (Edmund, 1960). The teeth are cyclindrical with a bicuspid crown covered by enamel. The tooth crown under the cusps is ornamented by enamel ridges. A similar system of ridges on the side of tooth crown was observed also in some species of archosaurs and lepidosaurian reptiles (eg. Leydig, 1872; Poole, 1961; Sumida et Murphy, 1987; Delgado et al. 2005). The rest of tooth is formed by the dentine base which is pleurodontly ankylosed to the bone of attachment. The first functional teeth were slightly conical in shape compared to the more cyclindrical later generations (compare Fig. 1A and 2E), a similar shape change having been observed between the teeth of posthatchlings and adults of *Chalcides viridanus* (Delgado et al. 2005). Unlike in *C. Viridanus*, however, the number of tooth positions was not fixed at hatching but increased postnatally as the jaw increased in size.

Dental pattern development

Development of the dental pattern in extant polyphyodont reptiles, both archosaurs and lepidosaurian reptiles, is in many aspects similar. All functional teeth are formed from the dental lamina and undergo the same stages of bud, cap and bell. Development of teeth therefore appears highly conserved throughout vertebrates. The dental pattern is initiated in *P. Picta*, as in other lepidosaurians and archosaurs, with the development of the first tooth, termed the dental determinant (Osborn, 1973). The initiation of the dental determinant is then proposed to switch on the periodic dental program, with waves of induction of the following teeth, spreading from the first tooth forwards and backwards. Interstitial teeth are formed in the growing spaces between earlier initiated teeth both in archosaurs (Westergaard et Ferguson, 1986) and lepidosaurians (e.g. *P. picta*). Generally in reptiles, the later initiated teeth develop closer to their most mature neighbours and are bigger than earlier ones (Westergaard, 1988a). This rule regarding the size difference between early and late initiated teeth was not apparent in the functional teeth, but was clearly observed in the null-

generation tooth generations in *P. picta*. We observed several waves of initiation starting at 14dpo, with the later initiating teeth developing further and incorporating more cells in the inner dental epithelium (IDE) and dental papilla. A progression of tooth development was therefore in evidence as the embryo moved from null-generation to functional teeth. This progression was mirrored by a move from initiation at the oral surface, to deep within the oral cavity from the dental lamina.

Null-generation teeth

The phenomena of null generation teeth in nonmammalians was previously described in both archosaurs and lepidosaurian reptiles (eg. Leche, 1893; Rose, 1894; Cooper, 1963; Westergaard et Ferguson, 1986, 1987; Westergaard, 1986, 1988; Sire et al. 2002) and urodel amphibians (eg. Rose, 1895; Davit-Béal et al. 2006; Davit-Béal et al. 2007). The first teeth in some examined species such as *Crocodylus porosus* (Rose, 1894), *Alligator mississippiensis* (Westergaard et Ferguson, 1986), *Lacerta viridis* (Cooper, 1963), *Mabuya aurata* (Mohammed et al. 2002), *Iguana tuberculata* (Leche, 1893), *Lacerta agilis*, *Anguis fragilis* (Westergaard, 1988) and *Sphenodon punctatus* (Westergaard, 1986), are initiated before the dental lamina appears. In contrast to these species the first teeth in some others, like the gecko *Cnemaspis kandiana* (Westergaard, 1988a), *Liolaemus grawenhorsti* (Lemus et al. 1980) and *Pogona vitticeps* (Handrigan et Richman, 2010), were found to be initiated from the dental lamina. In *P. picta* the first and second teeth are initiated from the oral epithelium before the dental lamina appears, the first stages of tooth formation looking morphologically similar to the dental placode in the alligator (Westergaard et Ferguson, 1986).

In *A. mississippiensis*, *S. punctatus*, *C. kandiana*, *L. viridis* and *I. tuberculata* several first null generation teeth project markedly from the surface of the oral epithelium (Leche, 1893; Cooper, 1963; Westergaard et Ferguson, 1986; Westergaard, 1986). In contrast to these species in *L. agilis* and *A. fragilis* these teeth project from the surface of oral epithelium only slightly and only for a short time period and their later development is connected with the dental lamina (Westergaard, 1988). In *P. picta* the first tooth project from the oral surface until the late cap stage and then sink into the mesenchyme as the dental lamina forms and invaginates inwards. As many of the early null-generation teeth developed before the dental lamina had formed, the dental lamina is not necessary for tooth development, but is important for the development of the

polyphyodont dental pattern. In *P. Picta* the first two sets of null-generation teeth develop directly over the place where the dental lamina will later form, indicating the odontogenic potential of the early dental band.

The multiple null-generation teeth observed in *P.Pictus*, along with other reptiles, may represent the remnants of a past functional dentition that has become redundant. Alternatively, these teeth may still play a role in the positioning of the dental lamina and organisation of the later functional dentition, and therefore may remain a key part of the patterning process.

Fate of null-generation teeth

The fate of superficially teeth has been described in both archosaurs and lepidosaurian reptiles (eg. Röse, 1894; Edmund, 1969; Westergaard et Ferguson, 1986, Westergaard, 1988a,b; Mohammed et al. 2002; Sire et al. 2002). The first teeth of the alligator null generation disappear below the jaw surface, their enamel organs desintegrate and the dentine is resorbed. These teeth can persist for some time in the mesenchyme before resorption (Westergaard et Ferguson, 1986). Resorption and eruption was also mentioned in other reptiles (Edmund, 1969; Sire et al. 2002; Westergaard et Ferguson 1986; Westergaard, 1988).

Interestingly we observed no single fate for the null-generation teeth, which were expelled from the oral cavity, incorporated into the tooth and bone, or resorbed. The eventual fate of these teeth appears to depend on the site where the tooth germ initiated. In some instances the null-generation teeth became completely enclosed by bone and appeared to attempt ankylosis. In contrast to observations in alligators (Westergaard et Ferguson, 1986), we did not find evidence for osteoclasts acting inside the dental papillas of the first teeth, which might be due to the small size of the dental papillas and by the large size of multinucleated osteoclasts-like cells. Osteoclast-like cells, however, were observed surrounding tooth germs, resorbing from the outside in.

Loss of the early null-generation teeth may be driven by the failure of these teeth to establish a blood supply. It is possible that the small size of many of the null-generation teeth contributed to the lack of vasculature by failing to signal to endothelial cells to recruit them into the dental papilla. The small size would then be compounded by a lack of nutrients. The first generation teeth in actinopterygians and urodele amphibian larvae are also small compared to the later generations and the dental pulp is not vascularised. These teeth also form dentin without odontoblastic processes and thin

enameloid (Sire et al., 2002). Poor development of odontoblasts and the IDE, resulting in a lack of enamel, is also observed in the first generation teeth in archosaurs (Westergaard et Ferguson, 1986). There may therefore be a general trade off between tooth size and tooth maturation. Interestingly in the squamate *P.vitticeps*, the superficial teeth show low levels of proliferation linked to a reduction in *Shh* signalling (Handrigan et Richman, 2010). It may therefore be that reduced levels of *Shh* control the level of development of the rudimentary teeth in *P.pictus*.

Tooth layers

In mammals an intermediate layer is observed between the ameloblasts layer of the inner dental epithelium and the stellate reticulum, known as the stratum intermedium (SI). The cells in this layer are spindle shaped lying perpendicular to the ameloblasts, and have been proposed to function with the ameloblasts in the mineralisation of the enamel (Nakamura et al., 1991). This layer has been described in alligators (Westergaard et Ferguson, 1987), but was not previously described in lepidosaurians (eg. Röse, 1893; Ogawa, 1977; Sire et al. 2002; Delgado et al. 2005; Buchtová et al. 2008, Handrigan et Richman, 2010). In *P. picta*, we see a layer of flattened cells that lie in the position of the SI in both late developing null-generation and functional tooth germs, suggesting that some reptiles do possess this dental layer. The timing and position of the SI-like layer appeared similar to the SI in mammals (Koyama et al. 2001). Difference between these layers, however, also exist, as the SI-like structure in *P.Picta* is still present during the late mineralization phasis in *P. picta*, while in mammals the SI cells are only present until ameloblast differentiation (Koyama et al. 2001). In *P. picta* the presence of a SI-like layer and the formation of enamel was highly correlated, suggesting the importance of this layer for enamel deposition in this reptile. These results further strengthen the theory that the SI is not a unique feature of mammalian teeth.

The stellate reticulum (SR) in *P. picta* is composed of rounded cells separated by big extracellular spaces, similar to that described in *C. viridanus* (Delgado et al. 2005). This layer is thin in *P. picta* and persists until late mineralization stages. This layer is not fully differentiated at the tooth base, indicating its importance for ameloblasts differentiation. A thin, often reduced, layer of SR is also present in snakes (Tomes, 1875; Buchtová et al. 2008). Such a thin SR is associated with species that have narrow conical or cylindrical teeth, while species with larger, wider teeth have a

more substantial, mammalian-like SR (data not shown). Species with more SR are very often food specialist thus we suppose a thin layer of SR may be primary and not reduced state in Squamates.

The inner dental epithelium of *P. picta* has asymmetric development. The lingual side is thinner and grows preferentially on the labial side. Similar asymmetrical growth was observed in *C. viridanus* (Delgado et al. 2005), and may be necessary for development of a pleurodont ankylosis.

Tooth base formation

The tooth base, which is not covered by enamel, forms the main part of tooth in *P. picta*, connecting the functional part of tooth, the crown, with the bone of attachment. The term “root” for lepidosaurian reptiles is also sometime use (eg. McIntosh et al. 2002; Luan et al. 2006), however this term is generally regarded as being specific for mammals and it should not be used for the reptilian tooth base (Peyer, 1986). The induction of root formation in mammals, odontoblasts differentiation and root shaping is controlled by a bi-layered extension of the cervical loop, known as Hertwig’s root sheath (HERS) (Selvig, 1963; Ten Cate, 1996). Another role attribute to HERS is induction of the dental sac cells to mature into cementoblasts (Paynter et Pudy, 1958) and the pre-cementoblasts migration to the surface of the root (Thomas et Kollar, 1989). McIntosh et al. (2002) showed HERS formation in lepidosaurian reptiles and described that this layer covers the tooth base except at the apex (McIntosh et al. 2002). In *P. picta* we observed that the most of the developing tooth base was formed of three layers of epithelial cells and not by bilayered HERS. A bilayer was only seen right at the tooth base. The cells of the IDE in the area with three layers had a cuboidal shape, while in the HERS area these cells were flattened. Such flattening of HERS cells were also observed in mammals before HERS disintegration (Wentz et al. 1950; Owens, 1978; Andujar et al. 1984, 1985). Such a disintegration and formation of epithelial rests have also been described in archosaurs (McIntosh et al. 2002) which have a gomphosis type tooth attachment. Disintegration of HERS, however, was not reported in other lepidosaurian reptiles with an ankylotic type of attachment (Luan et al. 2006), and at the time of ankylosis, the apical end of the tooth base was found to be free of HERS (McIntosh, 2002; Luan et al. 2006). At ankylosis in *P. Picta* the tooth base is also free of HERS, leading to the question, what happened to the bilayered structure observed at earlier stages? It is possible that the HERS-like cells

observed early on do disintegrate but over a relatively short period of time that was missed in our staging series. Whether lepidosaurians have a disintegration of HERS like mammals and archosaurs is therefore still an open question.

Acknowledgements

We appreciate to Lukáš Kratochvíl, Zuzana Starostová and Hana Jirků for to providing us samples of *P. Picta*. This work was supported by the Grant Agency of the Academy of Sciences, grant KJB601110910.

References

- Andrews RM** (1985) Oviposition frequency of *Anolis carolinensis*. *Copeia* 1985, 259-262.
- Andujar MB, Magloire H, Grimaud JA** (1984) Fibronectin in basement membrane of Hertwig's root sheath. Light and electron immunohistochemical localization. *Histochemistry* **81**, 279-282.
- Andujar MB, Magloire H, Hartmann DJ, Ville G, Grimaud JA** (1985) Early mouse molar root development: cellular changes and distribution of fibronectin, laminin and type-IV collagen. *Differentiation* **30**, 111-122.
- Bogert CM** (1943) Dentitional phenomena in cobras and other elapids with notes on adaptive modifications of the fangs. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* **131**, 285–360.
- Bolk L** (1922a) Odontological essays. Fourth essay. On the relation between reptilian and mammalian dentition. *J Anat* **56**, 107-136
- Bolk L** (1922a) Odontological essays. Fifth essay. On the relation between reptilian and mammalian dentition. *J Anat* **57**, 55-75
- Buffetaut E, Dauphin Y, Jaeger JJ, Martin M, Mazin JM, Tong H** (1986) Prismatic dental enamel in theropod dinosaurs. *Naturwissenschaften* **73**, 326-327.
- Buchtová M, Boughner JC, Fu K, Diewert VM, Richman JM** (2007) Embryonic development of *Python sebae* – II: craniofacial microscopic anatomy, cell proliferation and apoptosis. *Zoology (Jena)* **110**, 231-251.
- Buchtová M, Handrigan GR, Tucker AS et al.** (2008) Initiation and patterning of the snake dentition are dependent on Sonic Hedgehog signaling. *Dev Biol* **319**: 132-145.
- Cobourne MT, Sharpe PT** (2010) Making up the numbers: The molecular control of mammalian dental formula. *Semin Cell Dev Biol* **21(3)**, 314-324.
- Cooper JS** (1963) The dental anatomy of the genus *Lacerta*. Ph. D. Thesis, Dental School, University of Bristol
- Davit-Béal T, Allizard F, Sire JY** (2006) Morphological variations in a tooth family through ontogeny in *Pleurodeles waltl* (Lissamphibia, Caudata). *J Morphol* **267**, 1048-1065.
- Davit-Béal T, Chisaka H, Delgado S, Sire JY** (2007) Amphibian teeth: current knowledge, unanswered questions, and some direction for future research. *Biol Rev* **82**:49-81.

- Delgado S, Davit-Béal T, Sire JY** (2003) Dentition and tooth replacement pattern in *Chalcides* (Squamata; Scincidae). *J Morphol* **256**, 146-159.
- Delgado S, Davit-Béal T, Allizard F, Sire JY** (2005) Tooth development in a scincid lizard, *Chalcides viridanus* (Squamata), with particular attention to enamel formation. *Cell Tissue Res* **319**, 71–89.
- Diekwisch TG** (2001) The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol* **45**, 695-706.
- Diekwisch TG** (2002) Pathways and fate of migratory cells during late tooth organogenesis. *Connect Tissue Res* **43**, 245-256.
- Edmund AG** (1960) Tooth replacement phenomena in the lower vertebrates. *Contrib R Ont Mus Life Sci Div* **52**, 1–190.
- Edmund AG** (1962) Sequence and rate of tooth replacement in the Crocodylia. *Contrib R Ont Mus Life Sci Div* **56**, 1-42.
- Edmund AG** (1969) Dentition. In: Gans C, Bellairs Ad'A, Parsons TS (eds) *Biology of reptilia*, vol I. Academic Press, London, pp 117–200
- Evans SE, Prasad GVR, Manhas BK** (2001) Rhynchocephalians (Diapsida: Lepidosauria) from the Jurassic Kota Formation of India. *Zool J Linn Soc* **133**, 309-334.
- Fraser GJ, Bloomquist RF, Strelman JT** (2008) A periodic pattern generator for dental diversity. *BMC Biol* **6**, 32
- Handrigan G, Richman JM** (2010) Autocrine and Paracrine *Shh* signaling are necessary for tooth morphogenesis but not tooth replacement in snakes and lizards (Squamata). *Dev Biol* **337(1)**, 171-186.
- Handrigan GR, Richman JM** (2010a) A network of *Wnt*, hedgehog and BMP signaling pathways regulates tooth replacement in snakes. *Dev Biol* **348(1)**, 130-141.
- Handrigan GR, Leung KJ, Richman JM** (2010b) Identification of putative dental epithelial stem cells in a lizard with life-long tooth replacement. *Development* **137(21)**, 3545-3549.
- Harrison HS** (1901) The development and succession of teeth in *Hatteria punctata*. *Q Jl Microsc Sci* **44**, 161-219.
- Hubert J** (1970) Ultrastructural study on the primordial germ cells during embryonic development of *Lacerta vivipara* Jacquin. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **107(2)**, 264-83.

- Jernvall J, Kettunen P, Karavanova I, Martin LB, Thesleff I** (1994) Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating Fgf-4 gene. *Int J Dev Biol* **38**, 463-469.
- Jernvall J** (2000) Linking development with generation of novelty in mammalian teeth. *Proc Natl Acad Sci USA* **97(6)**, 2641-2645.
- Kaneko H, Hashimoto S, Enokiya Y, Ogiuchi H, Shimono M** (1999) Cell proliferation and death of Hertwig's epithelial root sheath in the rat. *Cell Tissue Res* **298**, 95-103.
- Kangas AT, Evans AR, Thesleff I, Jernvall J** (2004) Nonindependence of mammalian dental characters. *Nature* **432(7014)**, 211-214.
- Kochva E** (1963) Development of the venom gland and trigeminal muscles in *Vipera palaestinae*. *Acta Anat* **52**, 49-89.
- Koyama E, Wu C, Shimo T et al.** (2001) Development of stratum intermedium and its role as a Sonic hedgehog-signaling structure during odontogenesis. *Dev Dyn* **222(2)**, 78-91.
- Kratochvíl L, Kubička L, Landová E** (2006). Yolk hormone levels in the synchronously developing eggs of *Paroedura picta*, a gecko with genetic sex determination. *Can J Zool* **84**, 1683-1687.
- Kvam T** (1957) The teeth of *Alligator mississippiensis* Daud. I. Initiation and shaping of the tooth germ. *Nytt Mag for Zool* **5**, 11-15.
- Kvam T** (1958a) The teeth of *Alligator mississippiensis* Daud. II. Development of dentin. *J Dent Res* **37**, 532-539
- Kvam T** (1958b) The teeth of *Alligator mississippiensis* Daud. III. Development of enamel. *J Dent Res* **37**, 540-546
- Kvam T** (1958c) The teeth of *Alligator mississippiensis*. IV. Tooth succession. *Nytt Mag Zool* **5**, 43-78.
- Lake AR, Trevor-Jones TR** (1987) Formation of the poison fang canal of the puff adder *Bitis arietans*. *S Afr J Sci* **83**, 668-669.
- Lake AR, Trevor-Jones TR** (1995) The formation of the poison fang of the boomslang *Dispholidus typus*. *S Afr J Sci* **91**, 329-330.
- Lee JC, Clayton D, Einstein S, Perez I** (1989) The reproductive cycle of *Anolis sagrei* in Southern Florida. *Copeia* **4**, 930-937.
- Leche W** (1893) Über die Zahnentwicklung bei *Iguana tuberculata*. *Anat Anz* **1893**, 793-800.

- Lemus DY, Paz de la Vega Y, Fuenzalida M, Illanes J** (1980) In vitro differentiation of tooth bud from embryos and adult lizards (*L. gravenhorsti*): An Ultrastructural Comparison. *J Morphol* **165**, 225-236.
- Leydig F** (1872) Die Zahne einheimischer Schlangen nach bau und entwicklung. *Arch Mikrosk Anat EntwMech* **9**, 1-35.
- Luan X, Ito Y, Diekwisch TGH** (2006) Evolution and development of Hertwig's rooth sheat. *Dev Dyn* **235**, 1167-1180.
- Martin H** (1901) Évolution de la dent intermaxillaire chez l'embryon de la *Vipera aspis*. *J Anat Physiol Paris* **37**, 80-89.
- McIntosh JE, Anderton X, Flores-de-Jacoby L, Carlson DS, Shuler CHF, Diekwisch T** (2002) Caiman periodontium as an intermediate between basal vertebrate ankylosis-type attachment and mammalian „True“ periodontium. *Microsc Res Tech* **59**, 449-459.
- Miller WA** (1968) Tooth attachment apparatus in young *Caiman sclerops*. *Arch Oral Biol* **13**, 735-743.
- Mitsiadis TA, Graf D** (2009) Cell fate determination during tooth development and regeneration. *Birth Defects Res C Embryo Today* **87(3)**, 199-211.
- Mohammed BH, Darwish ST, Abd El-Hady SI** (2002). Embyonic tooth development in scincid lizard *Mabuya aurata*. *J Egypt Ger Soc Zool (39B): Veretebrate Anatomy & Embryology*, 41 – 54.
- Nagashima, H., Kuraku, S., Uchida, K, Ohya, YK, Narita Y., Kuratani, S.** (2007) The carapace ridge in turtle embryos: its developmental origin, function and the chelonian body plan. *Develoment* **134(2)**, 2219-2226.
- Nakamura M, Bringas P, Slavkin HC** (1991) Inner enamel epithelia synthesize and secrete enamel proteins during mouse molar occlusal „enamel-free area“ development. *J Craniofac Genet Dev Biol* **11(2)**, 96-104.
- Noro M, Uejima A, Abe G, Manabe M, Tamura K** (2009) Normal Developmental stages of the Madagascarian ground gecko *Paroedura pictus* with special reference to limb morphogenesis. *Dev Dyn* **238(1)**, 100-109.
- Ogawa T** (1977) A histological study of the gekko tooth. *Shigaku Odontol* **64**, 1377–1388.
- Osborn JW** (1971) The ontogeny of tooth succession in *Lacerta vivipara* Jacquin (1787). *Proc R Soc Lond (Biol)* **179**, 261–289.
- Osborn JW** (1973) The evolution of dentitions. *Am Sci* **61**, 548-559.

- Owen R** (1840-1845) *Odontography*. Hippolyte Baillière, London, 655 pp.
- Owens PD** (1978) Ultrastructure of Hertwig's epithelial root sheath during early root development in premolar teeth in dogs. *Arch Oral Biol* **23**, 91-104.
- Peyer B** (1986). *Comparative odontology*. Ed and tr. By Zangerl R. Univ Chicago Press, Chicago and London, pp 347
- Paynter KJ, Pudy G** (1958) A study of the structure, chemical nature, and development of cementum in the rat. *Anat Rec* **131**, 233-251.
- Poole DFG** (1961). Notes on tooth replacement in the Nile crocodile *Crocodilus niloticus*. *Proc Zool Soc Lond* **136**, 131-140.
- Rathke C** (1968) *Untersuchen über die Entwicklung und den Körperbau der Crocodile*. Braunschweig.
- Röse C** (1893) Über die Zahnentwicklung vom Chamaeleon. *Anat Anz* **8**, 566 – 577.
- Röse C** (1894a) Über die Zahnentwicklung der Crocodile. *Morphol Arbeit* **3**, 195-228.
- Röse C** (1894b) Über die Zahnentwicklung der Kreuzotter. *Anat Anz* **9**, 439-451
- Röse C** (1895) Beiträge zur Zahnentwicklung der Sch Schwanzmolche. *Morph Arbeit* **4**, 178-192.
- Salazar-Ciudad I, Jernvall J** (2010) A computational model of teeth and the developmental origins of morphological variation. *Nature* **464(7288)**, 583-586.
- Sanger JT, Losos JB, Gibson-Brown JJ** (2008) A developmental staging series for the Lizard genus *Anolis*: A new system for the integration of evolution, development, and ecology. *J Morphol* **269**, 129-137.
- Selvig KA** (1963) Electron microscopy of Hertwig's epithelial root sheath and of early dentin formation in the mouse incisor. *Acta odontol Scand* **21**, 175-186.
- Sire JY, Davit-Beal T, Delgado S, Van der Heyden C, Huysseune A** (2002). First generation teeth in nonmammalian lineages: evidence for a conserved ancestral character? *Microsc Res Tech* **59**, 408-434.
- Smith MA, Bellairs Ad'A, Miles AEW** (1953) Observations on the premaxillary dentition of snakes with special reference to the egg-tooth. *J Linnean Soc London (Zool)* **42**, 260-268.
- Sumida SS, Murphy RW** (1987) Form and function of the tooth crown structure in gekkonid lizards (Reptilia, Squamata, Gekkonidae). *Can J Zool* **65**, 2886-2892.
- Ten Cate AR** (1996) The role of epithelium in the development, structure and function of the tissue of tooth support. *Oral Dis* **2**, 55-62.

- Thesleff I, Mikkola M** (2002) The role of growth factors in tooth development. *Int Rev Cytol* **217**, 93-135.
- Thesleff I, Sharpe P** (1997). Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev* **67(2)**, 111-123.
- Thesleff I, Vaahtokari A, Kettunen P, Aberg T** (1995) Epithelial-mesenchymal signaling during tooth development. *Connect Tissue Res* **32(1-4)**, 9-15.
- Thomas HF, Kollar EJ** (1989) Differentiation of odontoblasts in grafted recombinants of murine epithelial root sheath and dental mesenchyme. *Arch Oral Biol* **34**, 27-35.
- Tomes CS** (1875) On the structure and development of the teeth of Ophidia. *Philos Trans R Soc* **165**, 297-302.
- Tomes CS** (1876) On the development and succession of the poison fangs of snakes. *Proc R Soc Lond* **24**, 259–261.
- Underwood AS** (1903) *Studies in comparative odontology*. Baillière, Tindall and Cox, London. pp 152
- Vidal N, Hedges SB** (2005). The phylogeny of squamate reptiles (lizards, snakes, and amphisbaenians) inferred from nine nuclear protein-coding genes. *C. R. Biologies* **328**, 1000–1008.
- Vonk FJ, Admiraal JF, Jackson K et al.** (2008) Evolutionary origin and development of snake fangs. *Nature* **454(7204)**, 630-633.
- Wentz FM, Weinmann JP, Schour I** (1950) The prevalence, distribution and morphological changes of the epithelial remnants in the molar regions of the rat. *J Dent Res* **29**, 637-646.
- Westergaard B** (1986) The pattern of embryonic tooth initiation in reptiles. *Mém Mus Natn Hist Nat Paris (Série C)* **53**, 55–63.
- Westergaard B** (1988) Early dentition development in the lower jaws of *Anguis fragilis* and *Lacerta agilis*. *Memoranda Soc Fauna Flora Fennica* **64**, 148-151.
- Westergaard B, Ferguson MWJ** (1986) Development of the dentition in *Alligator mississippiensis*. Early embryonic development in the lower jaw. *J Zool Lond* **210**, 575–597.
- Westergaard B, Ferguson MWJ** (1987) Development of the dentition in *Alligator mississippiensis*. Later development in the lower jaws of embryos, hatchlings and young juveniles. *J Zool Lond* **212**, 191-222.
- Westergaard B, Ferguson MWJ** (1990) Development of the dentition in *Alligator mississippiensis*: Upper jaw dental and craniofacial development in embryos,

hatchlings, and young juveniles, with a comparison to lower jaw development. *Am J Anat* **187**, 393-421.

Wiens JJ, Kuczynski CA, Townsend T, Reeder TW (2010) Combining Phylogenomics and Fossils in Higher-Level Squamate Reptile Phylogeny: Molecular Data Change the Placement of Fossil Taxa. *Syst Biol* **59(6)**, 674–688.

Woerdeman MW (1919) Beiträge zur Entwicklungsgeschichte von Zähnen und Gebiss der Reptilien. Beitrag I. Die Anlage und Entwicklung des embryonalen Gebisses als Ganzes und seine Beziehung zur Zahnleiste. *Arch Mikr Anat* **92**, 104–192.

Woerdeman MW (1919) Beiträge zur Entwicklungsgeschichte von Zähnen und Gebiss der Reptilien - Beitrag II: Über die Anlage des Ersatzgebisses und den Zahnwechsel (Distichie- und Matrix-Theorie). *Arch mikr Anat* **92**, 183-230

Woerdeman MW (1919) Beiträge zur Entwicklungsgeschichte von Zähnen und Gebiss der Reptilien - Beitrag III: Über den Eizahn. *Arch Mikr Anat* **92**, 231-244.

Woerdeman MW (1921) Beiträge zur Entwicklungsgeschichte von Zähnen und Gebiss der Reptilien - Beitrag IV: Über die Anlage und Entwicklung der Zähne. *Arch Mikr Anat* **95**, 265-395.

Woerdeman MW (1921) Beiträge zur Entwicklungsgeschichte von Zähnen und Gebiss der Reptilien - Beitrag V: Über die Beziehungen der Mundhöhlendrüsen zum Zahnsystem. *Arch Mikr Anat* **95**, 396-413

Zahradnicek O, Horacek I, Tucker AS (2008) Viperous fangs: development and evolution of the venom canal. *Mech Dev* **125(9-10)**, 786-796.

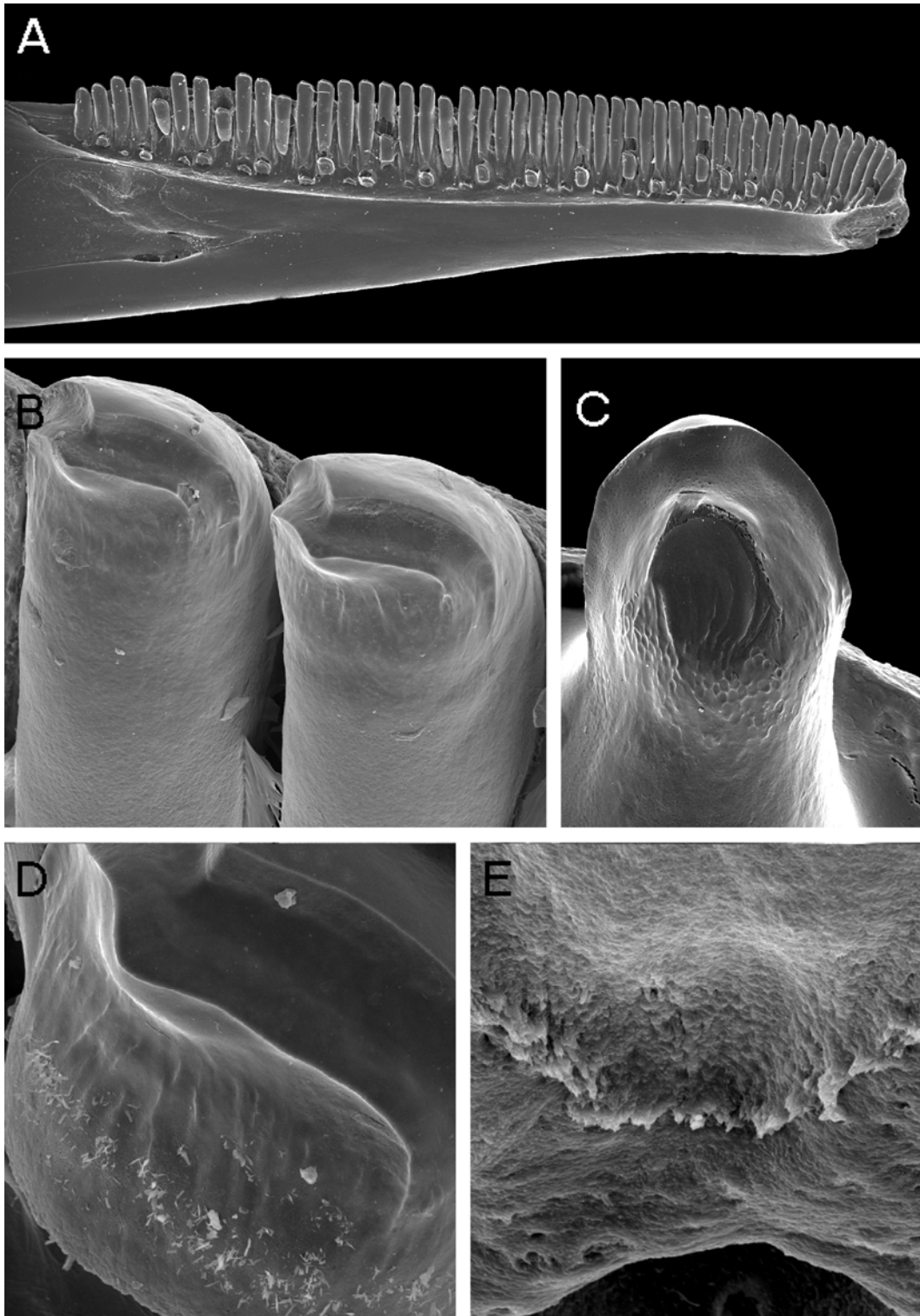


Fig. 1: Scanning electron micrographs of the dentition in *P. Picta*. A) Adult lower jaw showing pleurodontly ankylosed homodont teeth. B) Crown morphology of an adult tooth shows a bicuspid shape, with two crest divided by a groove. C) A serrated crest forms between the bone and tooth base on the lingual side of the ankylosis. D) Crown morphology of an egg teeth (early hatchling) show two rounded crests.



Fig. 2: Dental laminae of lower jaws at different stages of development with mineralized tooth germs showing dental pattern development. Mineralized tooth germs were visualized by Alizarine red S. (A-D) are showing prepared dental laminae and E) is showing ankylosed teeth in the jaw before hatching in 60dpo. A) Dental lamina 30dpo, Blue arrows mark null generation teeth, while green arrows mark functional teeth during their mineralization. B) 32dpo, C) 35dpo, Green arrows mark teeth of a successive generation replacing teeth of a null generation. D) 40dpo. Green arrows show successive teeth replacing teeth of the first functional generation.

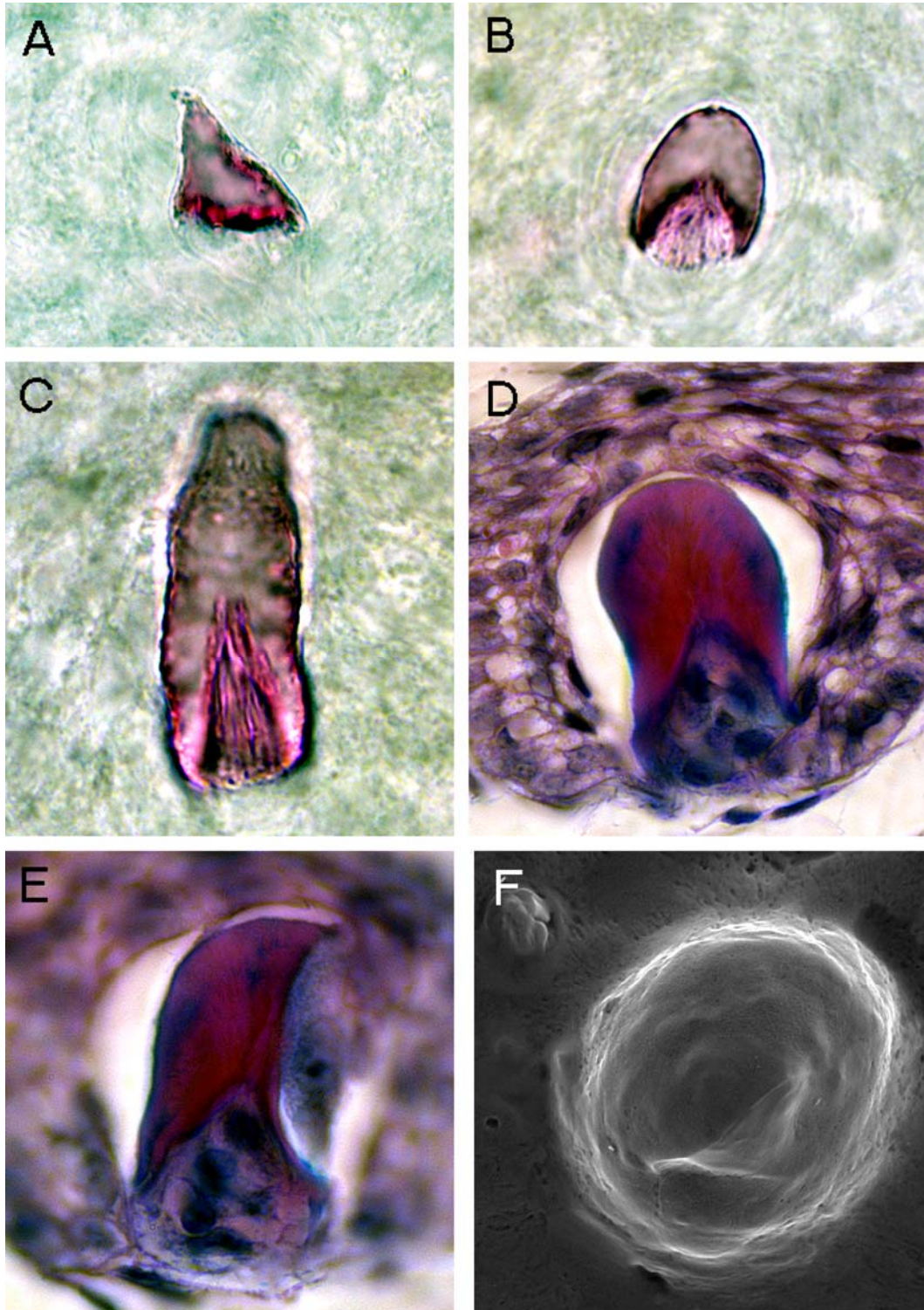


Fig. 3: The shapes of null generation teeth from lower jaws of older embryos (A-E) and upper jaw of freshly hatched juvenile (F) visualized by Alizarin Red S (A-C), trichrome staining on frontal sections (D-E) and by SEM (F). The shapes of teeth include A) conical, B) rounded, C) cylindrical, D) barb-like and E) hooked. F) The later null generation teeth often have small enamel ridges on their surface.

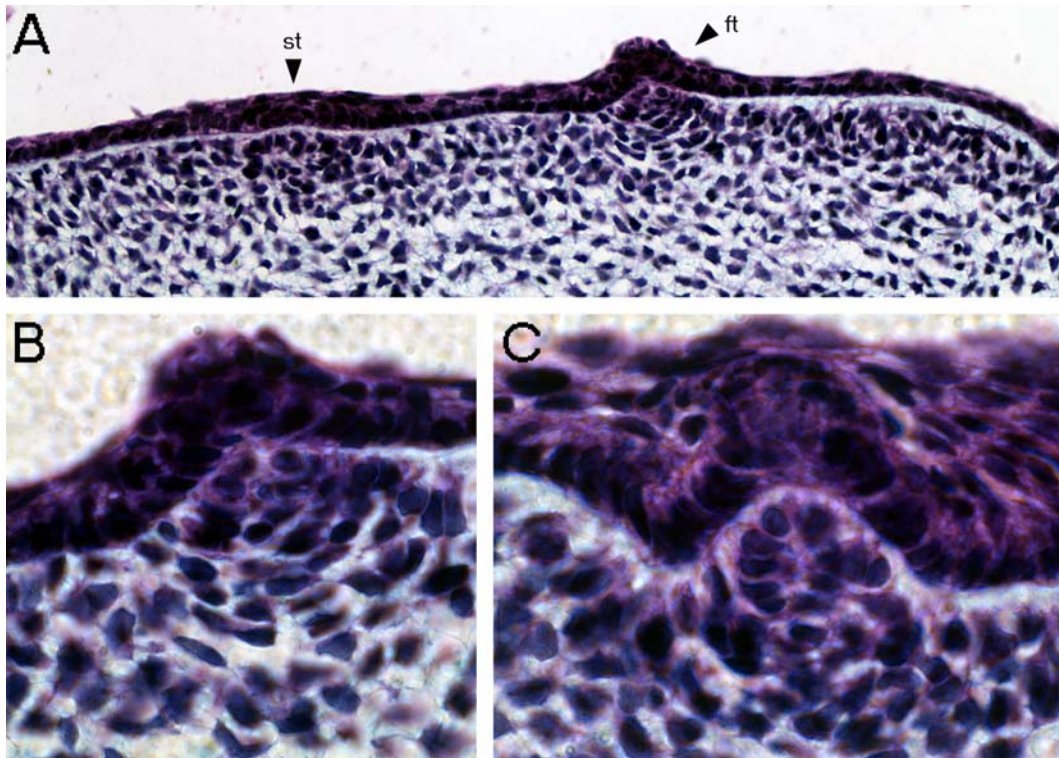


Fig. 4: Development of the first null-generation teeth from the oral surface. A) The first tooth (ft) and second tooth (st) start to form at the oral surface, and the underlying mesenchyme starts to condense. B) High power view of the first tooth. The cells of the dental papilla are organized into layers adjacent to the IDE. C) During later development these teeth shift deeper into mesenchyme and no longer stick out into the oral cavity. The dental papilla cells adjacent to the differentiation cells of IDE mature in to odontoblasts.

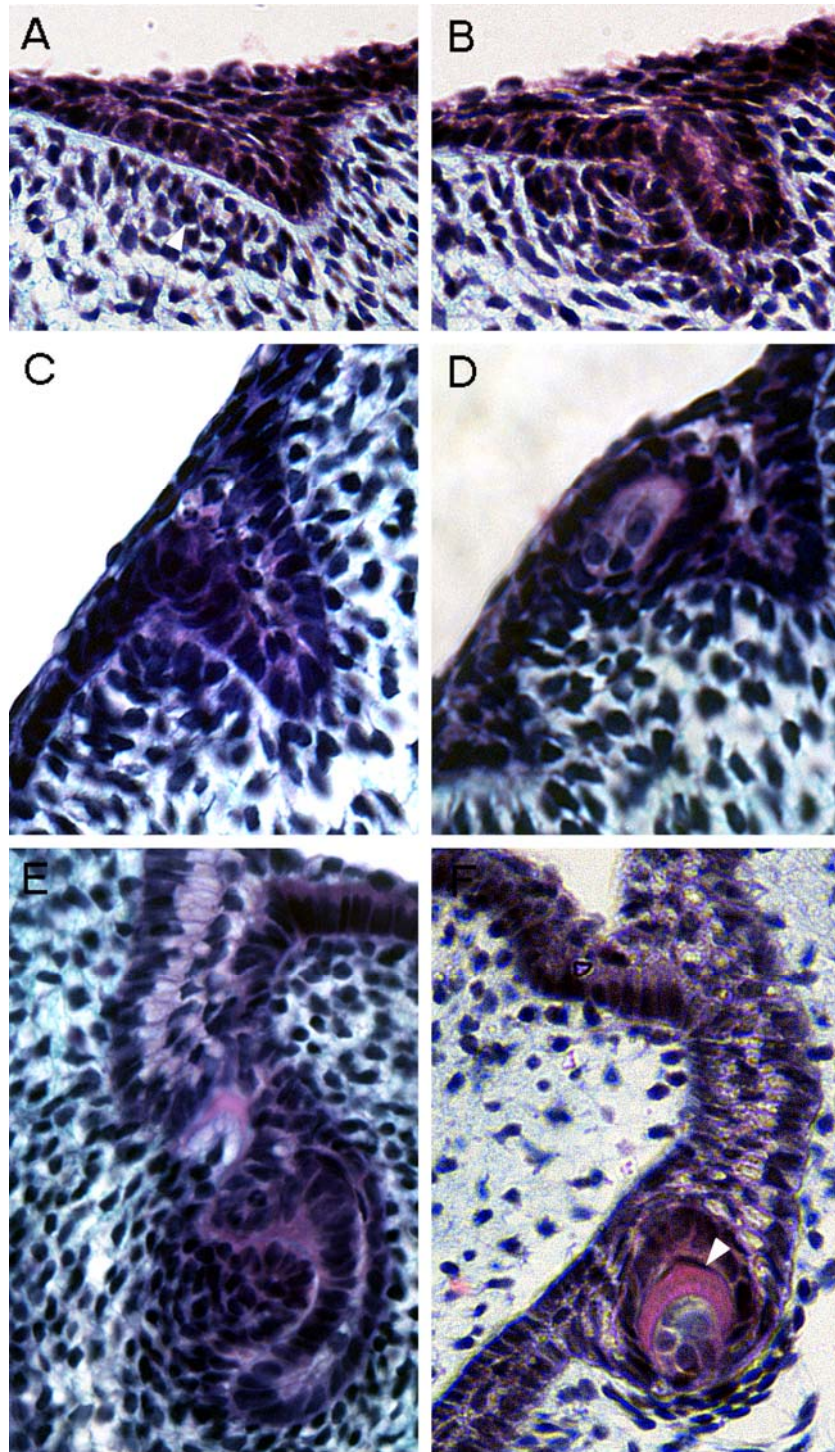


Fig. 5: Development of later null generation teeth. A) A placode stage tooth germ, with characteristic superficial position. The placode is formed on the labial base of the formed dental lamina. B) cap stage, C) bell stage, where cells of the IDE show some signs of differentiation, D) mineralized stage where dentine is formed. E) A later initiating null-generation tooth germ (white arrow) sitting on the main dental lamina above a functional tooth. Note the large size difference between the tooth germs. F) A later null generation tooth germ with a thin enamel coat (arrow pointing to dark ring), over the red stained dentine. Such teeth which are covered by enamel are formed deep in the mesenchyme.

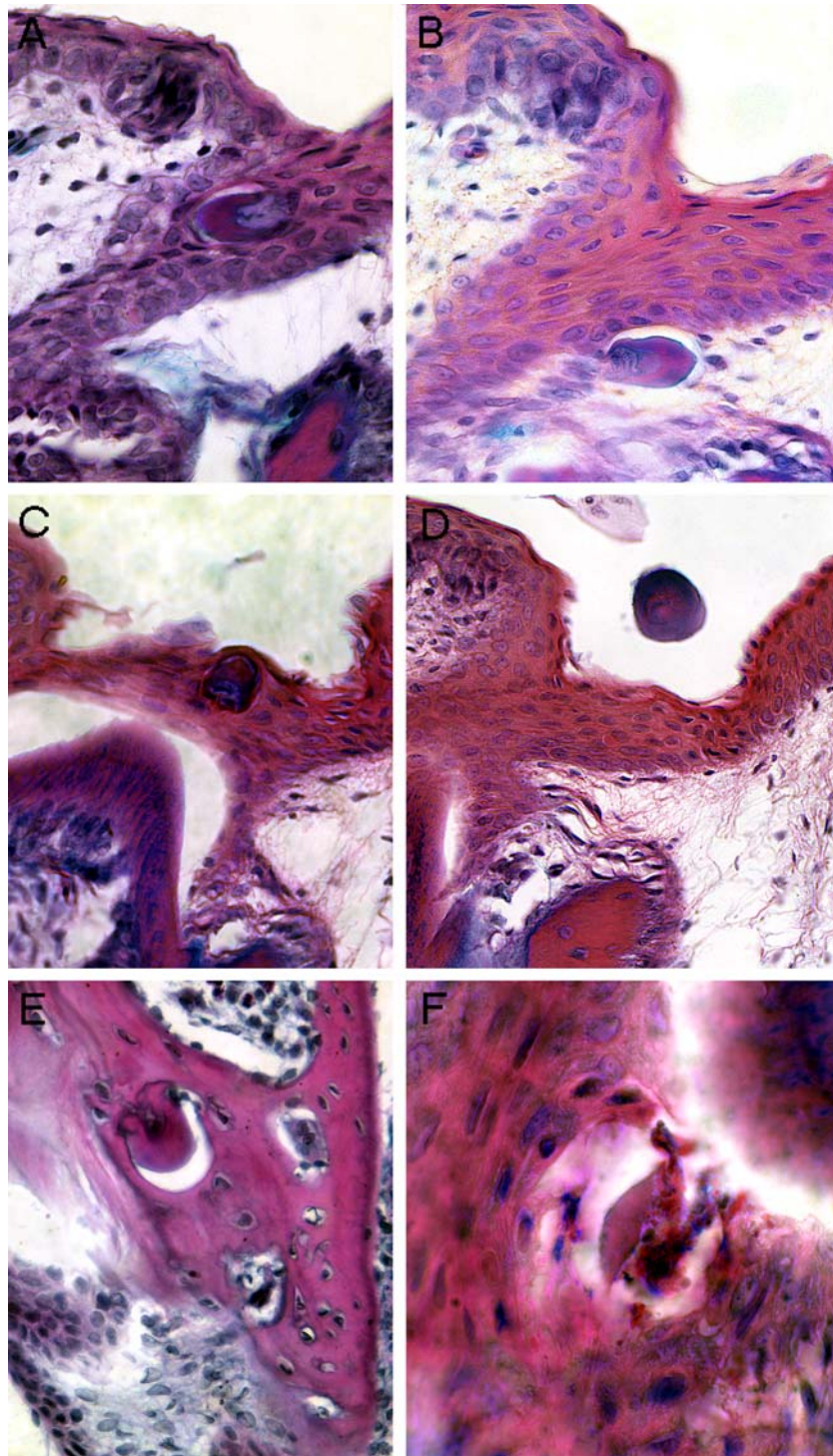


Fig. 6: The fate of the null generation teeth. Trichrome stained sections. (A-E) show teeth in a lower jaw, while F) is the upper jaw. A) Some superficial teeth are pushed orally as the functional tooth that forms underneath erupts. B) In some cases these teeth are shown floating free in the oral cavity having been shed into the mouth. C) Null generation teeth are very often enclosed in the dental lamina where they can turn around so that the dentin faces aborally. D) Null generation tooth pushed out of the dental lamina as it grows. E) Some of the null generation teeth are resorbed by osteoclasts-like cells from the outside in. F) In a few cases later initiating null generation teeth appeared to have become ankylosed to the bone of attachment in the upper jaw. Here these tooth germs have become nearly completely encapsulated by bone. Arrows point to null generation teeth.

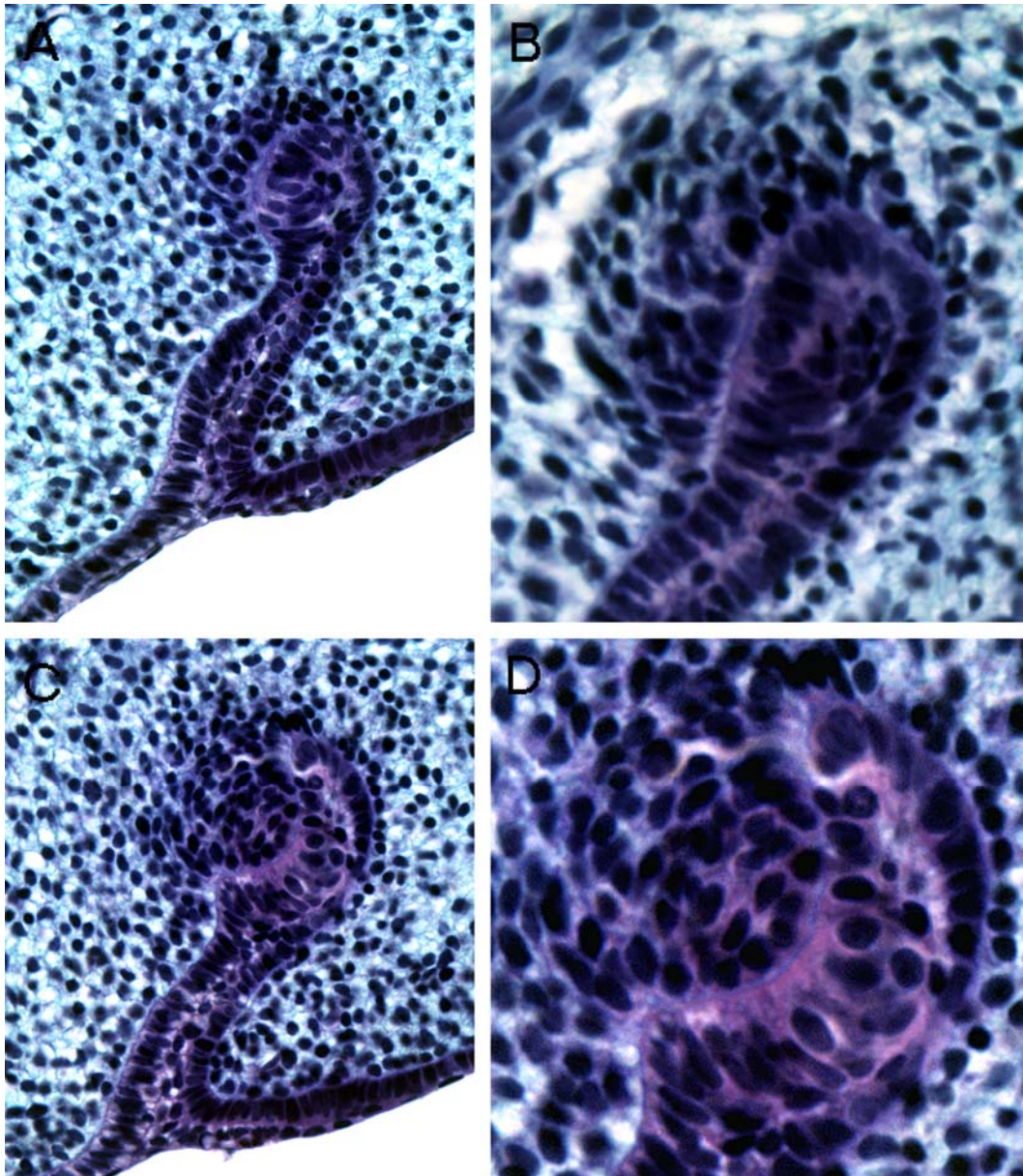


Fig. 7: Functional tooth development: bud and cap stage. A) Functional tooth development is initiated deeper in the mesenchyme from the end of the growing dental lamina. The bud stage. B) Detail of epithelial bud surrounded by the condensing mesenchyme. C) The cap stage. D) Detail of the cell organization of the enamel organ and mesenchymatic cells in the dental papilla at the caps stage.

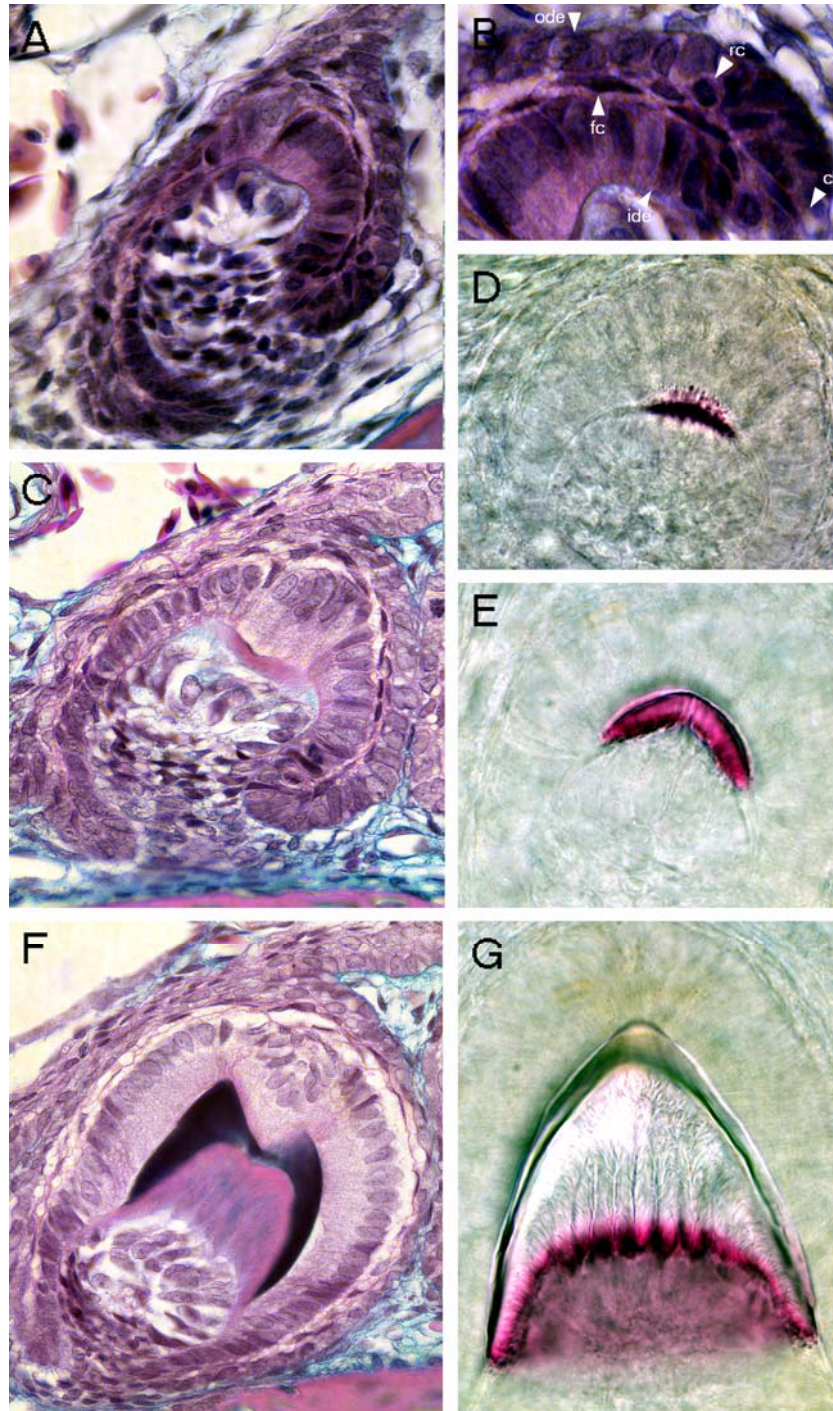


Fig. 8: Tooth crown formation in function teeth: from bell stage to mineralization. A - C) Frontal sections stained by trichrome. D- F) Alizarine preparations from the lower jaw. A) Bell stage. The first ameloblasts differentiate in the center of the IDE overlying the differentiating odontoblasts. B) Slightly more advanced bell stage, showing the first signs of dentine deposition, which occurs prior to enamel formation. Note the tooth shape is very constant between A and B. C) Detail of the enamel organ at the bell stage. The enamel organ is composed of several layers: Inner dental epithelium (ide), outer dental epithelium (ode), flattened stratum intermedium like cells (fc) and rounded stellate reticulum like cells (rc). D-F) Successive tooth crown mineralization. D) Numerous odontoblastic processes (arrow) are observed during the predentine production. E) Dentine formation spreads out from the apex (arrows). F) Late stage tooth germ. The lines in the dentine (d) show the odontoblastic processes and the saw-like shaped front of dentine adjacent to the odontoblasts. The dentine is capped by enamel (e).

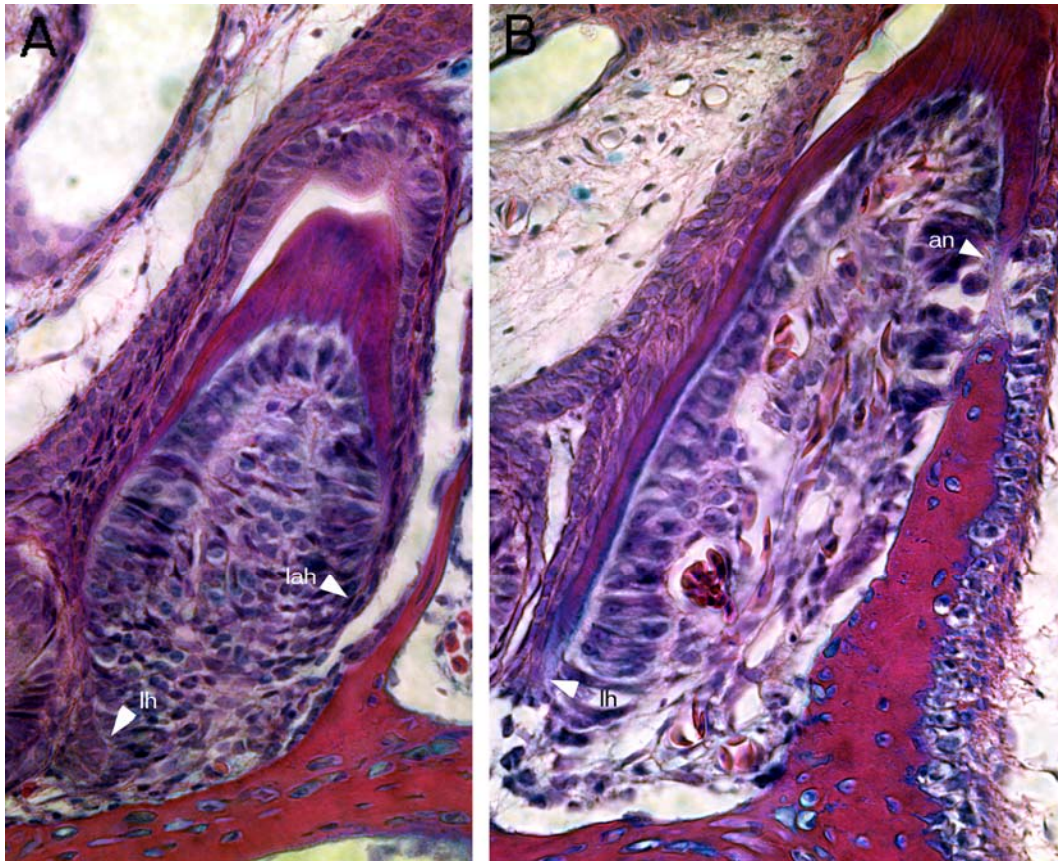


Fig. 9: Development of the tooth base. A) Asymmetrical growth of the enamel organ is important for formation of the tooth base. The lingual side (Lin) of the enamel organ is longer and extends deeper than the labial one (Lab). B) The labial side of tooth base starts to undergo ankylosis before the lingual side. The apical end of the enamel organ on the lingial side is formed by a double layer of cells similar to HERS (Hertwig's epithelial root sheath). Arrowheads point to the ends of the tooth base on both sides. Arrows indicate blood vessels that populate the dental pulp.

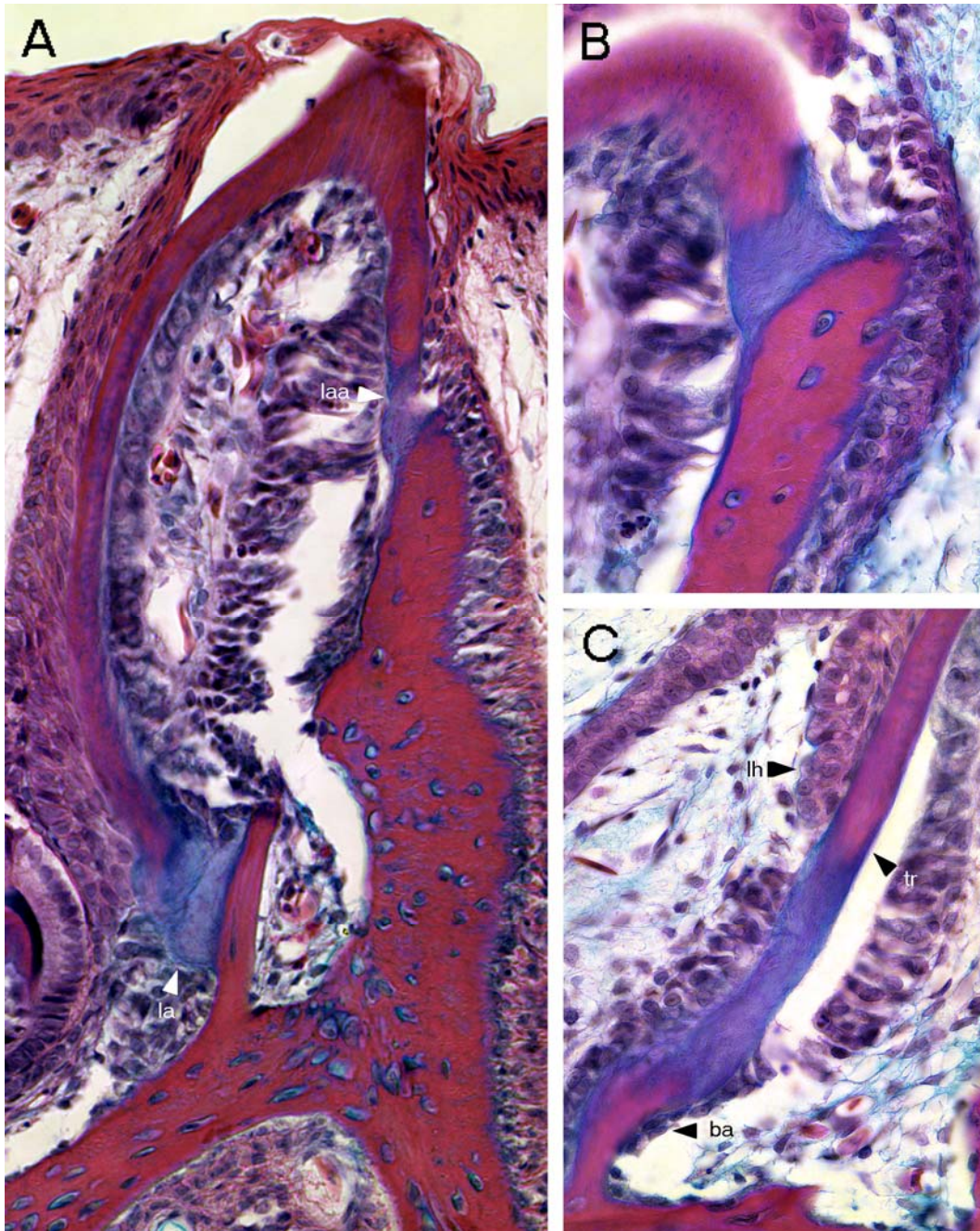


Fig. 10: Pleurodont ankylosis: premineralization stage. A) The bone and tooth are initially joined by a cell matrix before mineralisation of the join. B) High power of the labial side showing the first signs of ankylosis. C) High power of the labial side. ba - bone of attachment, lh – lingual side of HERS, tr - dentine base. The red stain shows bone and dentine, while the blue stain shows matrix deposition at the site of connection.

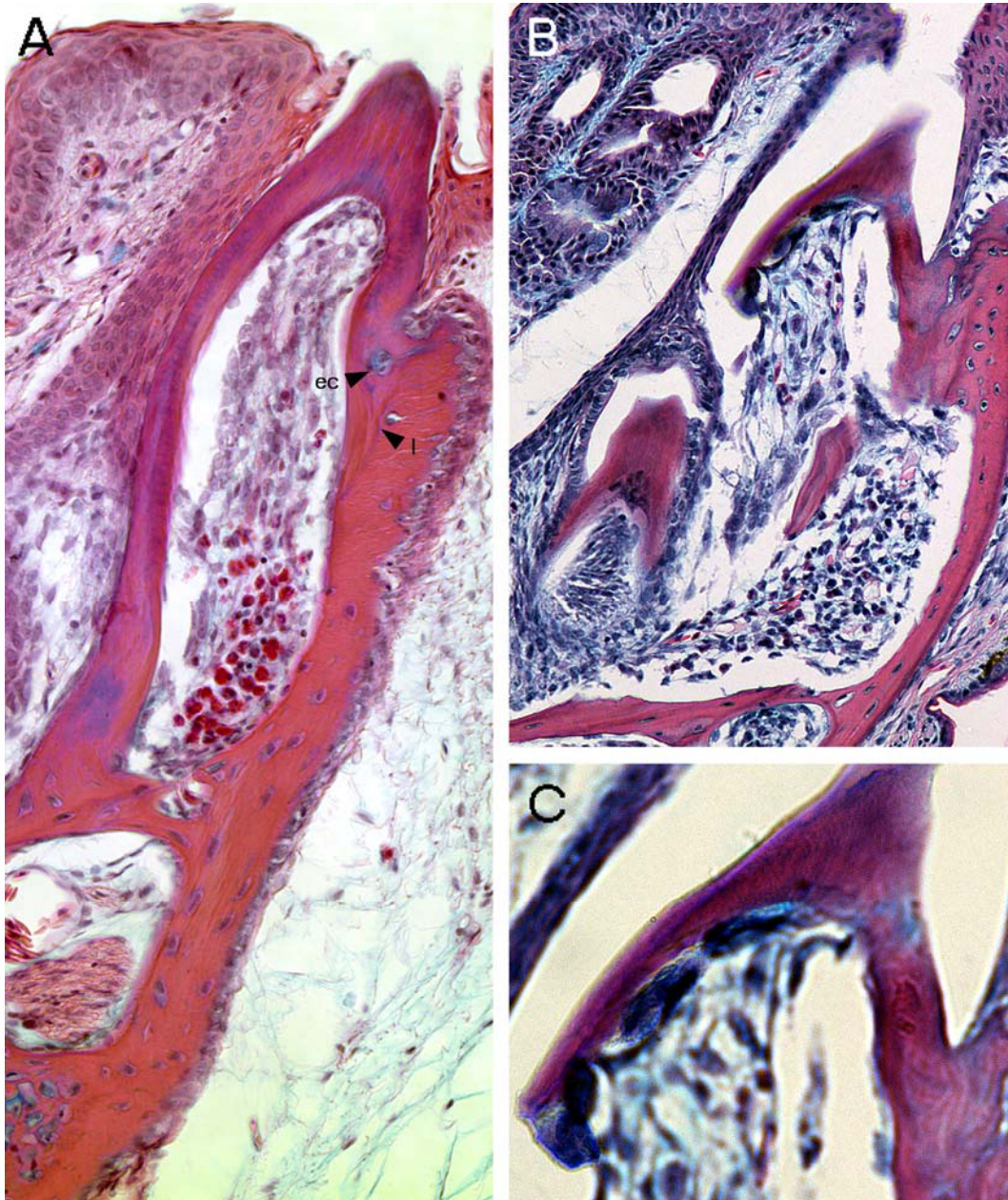
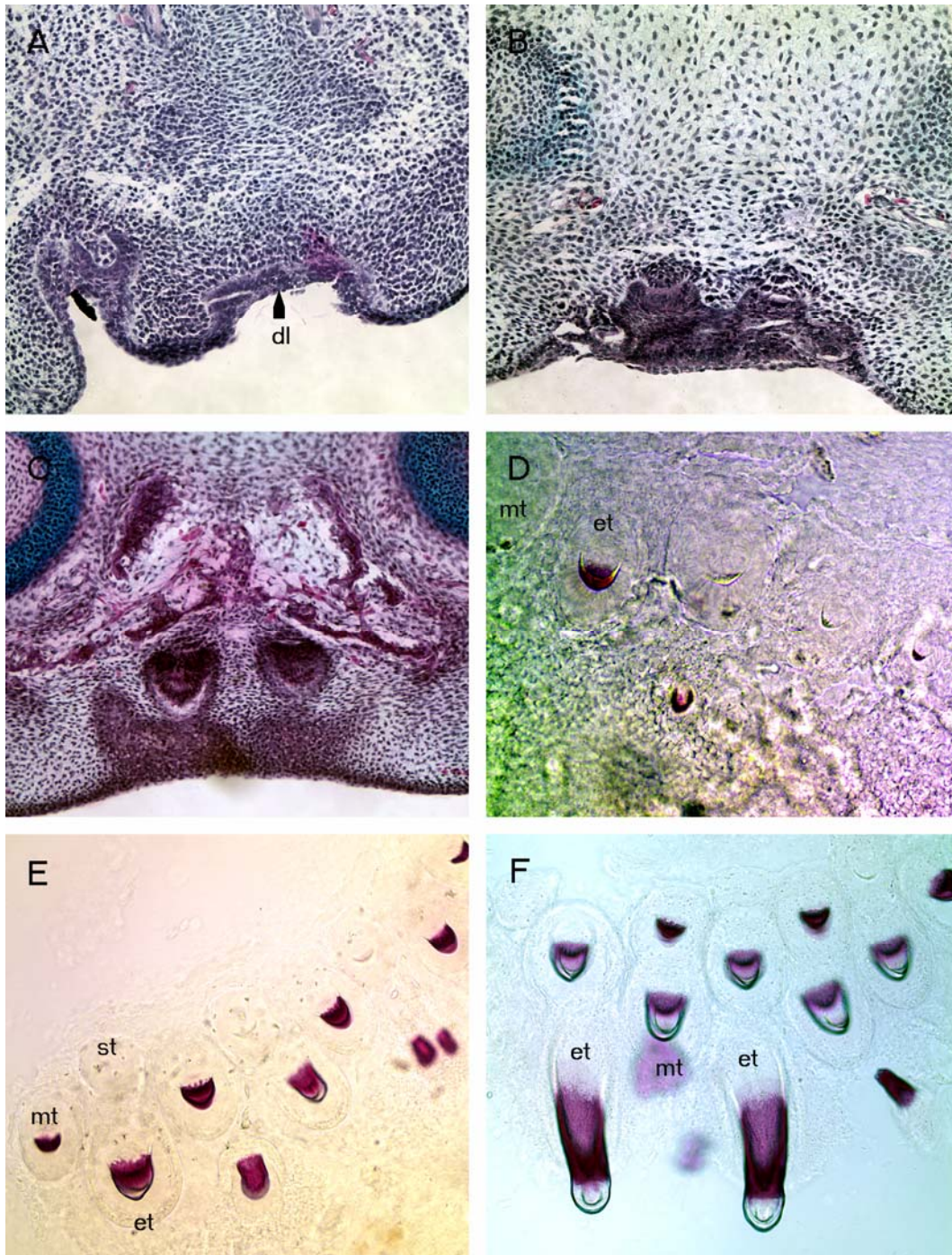


Fig. 11: Pleurodont ankylosis and later tooth resorption. A) The sites of fusion become mineralised and stain red with alizarin red. The tooth is now firmly attached to the bone. Some cells are observed trapped within the join (ec). A thin suture between the bone and dentine is apparent (l). B) Resorption of the functional tooth in the upper jaw. The resorption starts from the lingual side, where a successional tooth waits to become functional. The labial side remains attached to the bone until the resorption of the lingual enamel free dentine base is complete. C) Resorption of the lingual side in detail. Big multinucleated cells, probably osteoclasts, are found lining the inner side of the lingual dentine base.



Obr. 12: Vývoj vaječných zubů. A) Ve stádiu 18dpo je vyvinutá poměrně mohutná zubní lišta v premaxilární oblasti (dl). B) Ve stádiu 22dpo jsou zárodky dvou vaječných zubů ve stádiu pohárku. V této době začínají chondrifikovat nosní pouzdra. C) Ve stádiu 32 dpo byly zárodky vaječných zubů ve stádiu zvonku. Byly přítomny premaxilární kosti a nosní pouzdra byla plně chondrifikována. D-F) Zobrazují vypreparované zubní lišty se zubními zárodky, jejichž kalcifikovaná stádia jsou obarvena alizarinem. D) Ve stádiu 35dpo byly vaječné zuby (et) v časném mineralizačním stádiu. Mezi vaječnými zuby byl zubní zárodek (mt) ve stádiu před mineralizací. E) Ve stádiu 40dpo je zřetelná pokročilejší mineralizace korunek vaječných zubů. Na pozici vaječného zubu se vyvíjí náhradní zub (st), který je v premineralizačním stádiu. F) Ve stádiu 50dpo je patrná mineralizace zubních bází vaječných zubů. Náhradní zuby za zuby vaječné jsou ve stádiu mineralizace.

Tabule normálního vývoje pro varany: varan mangrovový
(*Varanus indicus*)

A Developmental Staging Table for the Monitor Lizards:
Varanus indicus, the Mangrove Monitor

Martina Gregorovicova*¹, Oldrich Zahradnicek¹, Ivan Horacek¹, Abigail S
Tucker²

¹Department of Zoology, Faculty of Science, Charles University, Prague,
Czech Republic.

²Department of Craniofacial Development and Orthodontics, Floor 27
Guy's Tower, Guy's Hospital, King's College London, London Bridge,
London, UK SE1 9RT

*Author for correspondence: martina.greg@email.cz

Key words: *Varanus indicus*, varanidae, monitor lizards, stadiality,
development

Summary:

Evolutionary phenotypic changes within organismus are mediated by changes at the developmental level. The constructions of staging tables of development of a wide spectrum of vertebrate species from different vertebrate lineages provide us possibilities of reconstruction of evolutionary traits leading to development of novelties of vertebrate lineages. We present here for the first time the staging table of normal *in ovo* embryonic development of mangrove monitor lizard *Varanus indicus* from family Varanidae (Toxicofera) clade which is suppose to be a close relative to specialized limbless snakes. Thus we fill the information gap on development of body forms within the phylogenetical context. Monitor lizards are active top predators and their novelties as large teeth with tooth base formed by plicidentine, high metabolism, large and effective hearth, highly developed musculature, specialized vomeronasal organ and prey detection with aid of a long and highly specialized tongue are correlated with their feeding strategy which is unique between Squamates. *In ovo* incubation of *V. indicus* is long, takes around 180 days in 28C and the hatchlings are in compare to generalized squamate species much bigger similarities to crocodiles which are also top predators. Our results show that *V. indicus* exhibits similar dynamics of development as other squamates with limbs except the accelerated embryonic development of structures adapted for predation life style as are narial region with vomeronasal organ, eyes, claws, large hearth and big body with robust musculature.

Introduction:

Evolutionary phenotypic changes within organisms are mediated by changes at the developmental level. An understanding of the developmental biology of a wide spectrum of vertebrate species is therefore necessary to enable systematic research of the evolution of vertebrate body plans and the origin of novelties. A prerequisite for such studies are detailed comparative information and the creation of staging tables of normal development. Such tables provide instant information on taxon-specific developmental dynamics, acting as the basic source of comparative data and as templates onto which knowledge of development can be weaved.

Although the first staging table was compiled in the 18th century, the number of taxa for which such developmental information is available is still surprisingly small. The most precise developmental tables are available just for five vertebrate model taxa: zebrafish, xenopus, chick, mouse, human (Hamburger et Hamilton, 1951; Nieuwkoop et Faber, 1967; Kimmel et al., 1995; Theiler, 1972). Xenopus, zebrafish, chick and mouse represent the most widely studied vertebrate models from a developmental point of view, and display many of the crucial qualities expected from a model taxon: small body size, short generation time, rapid and stereotypical development, abundant offspring, early separation of germ line and soma, relative immunity to environmental influences and easy of laboratory culture (Bolker, 1995; Bolker et Raff, 1997). Although these model taxa represent major vertebrate clades both anamniote (zebrafish, xenopus) and amniote (chick, mouse), for a number of other important high-rank taxa the information is rather scarce. Of these information on reptiles is most obviously missing. Reptiles are the most speciose group of non-volant tetrapods covering most of the cladogenetic diversity observed in amniotes. The extant reptiles include about 8000 species belonging to three major amniote clades: Chelonia, Archosauria and Lepidosauria, the latter with Sphenodontia and Squamata (Zug et al., 2001).

Within the reptiles, staging tables of normal development are currently available for chelonians, e.g. *Chelydra serpentina* (Yntema, 1968), and non-avian archosaurs e.g. *Alligator mississippiensis* (Murray et al., 1990), *Crocodylus porosus* (Magnusson and Taylor, 1980) and *Crocodylus niloticus* (Peterka et al. 2010). A number of staging tables have also been generated for the Squamata, and cover the following clades: Scincidae: *Hemiergis spp* (Shapiro, 2002), Gekkota: e.g. *Paroedura pictus* (Noro et al., 2009), *Eublepharis macularius* (Wise et al., 2009), iguanians: *Agama impalearis* (Mouden et al., 2000), *Chamaeleo lateralis* (Blanc, 1974), *Calotes versicolor* (Muthukkaruppan et al., 1970), *Liolaemus tenuis* (Lemus et al., 1981) and *Anolis sagrei* (Sanger et al., 2008), Ophidians: e.g. *Thamnophis sirtalis* (Zehr, 1962), *Naja kaouthia* (Jackson, 2002) and *Python sebae* (Boughner et al., 2007), Anguimorpha: *Anguis fragilis* (Nicolas, 1904) and Lacertidae: e.g. *Podarcis vivipara* (Dufaure et Hubert, 1961) or *Podarcis agilis* (Rieppel, 1994). In many cases, however, these tables of development are fragmented and do not cover the whole development of the species. Only a few of these species can be considered to serve as model taxon for detailed developmental studies in reptiles, although the leopard gecko *Eublepharis macularius*, the madagascan ground gecko *Paroedura pictus*, and the anole lizard *Anolis carolinensis* are the most promising (Wise et al., 2009; Sanger et al., 2008; Noro et al., 2009). Unfortunately, almost no developmental information and/or reliable staging tables are available for the other clades, which are essential for squamate phylogeny such as the basal Dibamidae, Amphisbaenia, Teiioidea, Xantusiidae, Cordilidae, Helodermatidae or Varanidae.

The main lineages of squamates probably diverged over a short time window during the Triassic around 200 Mya (Albert et al., 2009), diverging into a great variety of morphologically, behavioural and ecological forms (Zug et al., 2001; Pianka et Vit, 2003; Pough et al., 2004). As suggested by recent molecular data the base divergence is associated with the limbless group of dibamids followed by the gekkonids (Vidal et Hedges, 2005). The other clade includes the xantusiids, cordylids, and scincids (Vidal et Hedges, 2004, Townsend et al. 2004, Whiting et al., 2003), while the remaining group of lizards, snakes and amphisbaenians comprise two major clades, the Laterata (with Amphisbaenia, Lacertidae and Teiioidea) and the Toxicofera (Vidal et Hedges, 2005). The toxicofera possess venom in their glands and include Iguania, Anguimorpha, and Serpentes (Vidal et Hedges, 2005).

The present study providing the staging table of normal development for the mangrove monitor *Varanus indicus* (Daudin, 1802). This presents the first developmental data on Varanidae, the important basal group of the Anguimorpha (Vidal et Hedges, 2004, Townsend et al., 2004, and Fry et al., 2005). The Varanidae family comprises 73 recognised species within the monophyletic genus *Varanus* (Baverstock et al., 1993, Koch et al., 2010). Monitor lizards, which live in Australia, South-East Asia and Africa, are terrestrial, saxicolous, semi-arboreal, arboreal or aquatic and cover a wide spectrum of habitats (deserts, savannas, tropical forests, mangrove swamps). Most of them are active predators or top predators (Pianka, 1994, Losos et Greene, 1988). Only one species, *Varanus olivaceus* is frugivorous (Auffenberg 1988). Their morphology is conservative but body size varies from 0.2m in length, as found in *Varanus brevicauda* weighing 8-17g (Pianka et King, 2004), to over 3m in length, as found in *Varanus komodoensis*, weighing more than 70kg (Pianka et King, 2004). Monitor lizards possess strong legs, a long neck and tail, and can be good runners, climbers or swimmers. They possess some chemosensory specialization, a deeply forked tongue (Smith, 1986), specialized homodont or heterodont dentition, big claws and many autapomorphic characters (see Lee, 2000). Varanids possess genotypic-dependent sex determination (Valenzuela, 2004; Pokorná et Kratochvíl, 2009).

The mangrove monitor *Varanus indicus* (Daudin, 1802) is a medium sized monitor lizard with an average snout vent length of about 60 centimetres (Pianka et King, 2004). It has generalized proportions and lacks distinct sexual dimorphism. *V. indicus* clearly prefers mangroves (Cogger, 1981) and is well adapted to salt water, often foraging close to water or fleeing into the water (Pianka et King, 2004). It feeds opportunistically on a wide range of invertebrate and vertebrate prey as well as eggs and carrion (Pianka et King, 2004). This species possesses a saw like dentition, with big sharp teeth. The mangrove monitor, like other goannas, lays typically 10 eggs in each clutch (McCoid, 1993; Velenský, personal communication). The eggs have leathery shells and hatch after 7-8 months (about 180-200 days) (Velenský, personal communication). The incubation time is typically longer for varanid lizards in general than for other clades such as Iguania, Gekkota or Lacertidae (Bichard et Marcellini, 1996).

It has been suggested that the varanid body plan is morphologically conservative and close to that of the presumed plesiomorphic conditions in Toxicofera. The

pronounced variability in body size makes varanids as an ideal model for comparative studies on the evolution of body size (Thompson et Pianka, 2001). However, how the body structures in monitor lizards is formed and their growth controlled during development is largely unknown. The present study is thus intended to provide the first data for such studies.

Material and Methods:

1. Embryonic material

Embryonal material of *Varanus indicus* was provided by the Prague Zoological Garden thanks to their successful captive breeding programme. Two clutch of this valuable monitor lizard species were provided for our study. Fertilised eggs were laid at the zoo and incubated for up to 180 days at a temperature of 28°C and at 70% humidity to simulating natural conditions. A total of 14 embryos were collected at regular intervals between between day 2 and day 161 after oviposition. Embryos were sacrificed in accordance with Czech Republic law against animal cruelty (§17 no. 246/1992) with protocol number CZ 00059 and fixed in 4% PFA for 48 hours at a temperature of 8°C. After fixation embryos were stored in 70% ethanol. Embryos were photographed using a Pentax istD and Olympus SZX12 camera lens. Images were processed by using Zoner Photo Studio version 12 and Adobe Photoshop CS3.

2. Staging technique

As the basic criteria for the determination of our staging table the stage of development of the limbs, head and the body were assessed. These criteria correlate with those previously established for other lizards (Lemus et al. 1981, Sanger et al., 2008; Noro et al., 2009; Wise et al., 2010). Staging criteria for limbs were established as follows: forelimb-bud, early limb bud, paddle-shaped bud, digits condensation, interdigits web reduction, digit pads and their switching. Staging criteria for body were established according to body segmentation, branchial arches development, presence of blood vessels and heart, foliation and pigmentation. For the head particularly attention was given to the development of the eye (lens, eyelids, haw), nares (presence, forming and penetration), foliation, presence of tympanum, position of lower jaw to the eye and promination of the brain and its position. Particular stages were arranged into standard categories according to Sanger et al. (2008) and Wise et al. (2010).

Results:

Forelimb-Bud

(st. 1; dpo 2; Fig. 1a-b)

Cranium: The primary brain vesicles (prosencephalon and mesencephalon) and the secondary brain vesicles (metencephalon and myelencephalon) have formed. The mesencephalon forms a clearly distinguishable bulge at the back of head that is approximately twice as long as broad.

Frontonasal process: The frontonasal mass is apparent and not yet divided in to medial nasal and lateral nasal processes.

Otic Vesicles: The otic vesicles are clearly visible at the level of the second pharyngeal arch.

Eye: The eye is round, and the margins of the choroid fissure are in contact and have begun to fuse.

Pharyngeal arches: The maxillary prominence of the first pharyngeal arch is evident and reaches the posterior margin of the eyes. The mandibular processes are fused medially and separated from the second pharyngeal arch, the hyoid arch by the first pharyngeal cleft. The pharyngeal arches 3-5 are also apparent and separated by clefts 2, 3 and 4.

Body: 49 somites are apparent, the tail is bent inward and its apical end is unsegmented. The lateral body walls are not fused.

Flexure and rotation: Cranial flexure is in progress, with the axes of the prosencephalon and myelencephalon/metencephalon forming an acute angle. The cervical flexure creates a broad curve.

Limbs: Forelimb buds are present as small protuberances, while hindlimb buds are not yet visible.

Forelimb and hindlimb Buds-apical ectodermal ridge

(st. 2; dpo 10; Fig. 1c-e)

Cranium: The brain vesicles are apparent as paired structures. The cerebellum is visible. Mesencephalic bulges, the optic tectum, are equal in length and diameter to the eye.

Frontonasal process: The medial nasal and lateral nasal processes are distinguish and in contact, with clear grooves between.

Eye: Pigmentation is apparent in $\frac{3}{4}$ of the upper region of the eye with a maximum density in the anterior, posterior and dorsal segments. The lens is faintly observable.

Pharyngeal arches: The maxillary and mandibular processes appears approximately level with the center of the eye. A fissure in the mesial area of the mandible is apparent. The mandibular processes start to fuse with the hyoid arch and the cleft starts to close. The 2nd, 3rd and 4th clefts are apparent between the 3rd, 4th and 5th arch.

Body: The body segmentation is still apparent, but faint making counting somites difficult. The tail has one and a half curves.

Limbs: Both forelimb buds and hindlimb buds are present and possess an apical ectodermal ridge. The limb buds are both approximately twice as long as wide.

Paddle-Shaped Bud

(st. 3; dpo 24; Fig. 1f-h)

Cranium: The brain vesicles are further regionalized. The cerebrum and diencephalon are both apparent. The parietal organ is visible for the first time as a small protuberance of the diencephalon.

Frontonasal process: The medial nasal processes project ventrally and fuse with lateral nasal and medial nasal processes.

Eye: The pigmentation is almost homogeneously distributed across the eye except for a narrow strip of pigment free tissue where the choroid fissure was present. Pigment concentration is slightly higher in the anterior and posterior segment of the eye. The lens is more apparent than at previous stages.

Pharyngeal arches: The rostrum has the slight appearance of a hooked beak from a lateral view. the mandible has grown out near to the anterior end of the eye and has completely fused with the hyoid arch. The third and fourth arches are almost flat and only thin grooves are apparent between them.

Body: The body segmentation is only weakly apparent and the counting of segments is impossible externally. The heart protrudes from the thoracic cavity.

Limbs: The regionalization of both forelimb and hindlimb buds into autopodium, zeugopodium and stylopodium has started. The autopodiums have a paddle-like shape. The limbs are directed slight ventro-caudally.

Digits Condensation

(st. 4; dpo 43; Fig. 2a-d)

Eye: The upper eyelids start to develop. The pigmentation starts to be apparent in the ventral part of the strip where the choroid fissure had been present.

Frontonasal process and Pharyngeal arches: The upper jaw has a hooked beak-like shape. The external naris are apparent as a shallow depression. The 2nd-5th arches, and clefts between them, are no longer apparent.

Body: The urogenital papilla is apparent. Body segmentation is apparent only in the tail area.

Limbs: Mesodermal condensations of the long bones in the stylopodium and zeugopodium are apparent. The elbows and knees are faintly visible. The mesodermal condensation of digits II, III, and IV and also faint condensations of digits I and V in forelimb and hindlimb buds are in evidence. The interdigit webbing between the condensations starts to thin. The fourth digit is noticeably longer than the other digits.

(st. 5; dpo 32; Fig. 2e-g)

Cranium: The optic tectum starts to flatten. The parietal organ is pigmented. The external auditory meatus appears as a slight indentation but apparent tympanum is lacking.

Eye: The eye pigmentation of the retina and iris increase further. The lower eyelids start to form. Both upper and lower eyelids form margins around the eyes.

Pharyngeal arches: The maxillary processes have fused with the medial nasal processes. The mandible is approximately equal in length to the upper jaw.

Body: The heart is clearly visible and still little protrudes from the thoracic cavity.

Limbs: Condensation of five digits is visible in both the forelimb and hindlimb autopodium. Digital joints are faintly apparent in digits II, III, IV, while digits I and V are still without signs of joints. Further thinning and regression of the interdigit webbing occurs. The long bones and joints of the stylopodium and autopodium of both forelimbs and hindlimbs are more distinct.

Further digits and webbing Reduction

(st. 6; dpo 56; Fig. 2h-k)

Cranium and head: The cerebrum is apparent as a paired swellings in the area of the presumptive frontal bones. The cerebellum is apparent as a small protuberance behind the optic tectum, which is lower than in the previous stage. The cranium starts to have a dome shape. The tympanum is evident. The external nares are visible as depressions.

Eyes: The area where the choroid fissure was present is completely pigmented, although less intense than in the surrounded areas.

Body: The heart is still visible but covered in the thoracic cavity. The first signs of scale development are apparent on the dorsal surface of the body. The urogenital papilla is more noticeable.

Limbs: The regression of the interdigital webbing on the fore- and hind- limbs continues and the incissions reach the first $\frac{1}{4}$ to $\frac{1}{3}$ of the length of the digits. Digit joints are apparent in all fingers. Digits 1 and 5 are noticeable shorter than other digits.

Claws

(st. 7; dpo 63; Fig. 3a-d)

Head: The cerebrum swellings in the area of the presumptive nasal and frontal bones are diminished in size. The optic tectum (mesencephalic area) also diminishes in size. The height of the head is almost equal to its length. The lower jaw is longer than the upper jaw region (mandibular prognathism). The external naris are pronounced.

Eye: The developing upper and lower eyelids partially cover the eye approximately to the level of the pupil.

Body: The heart no longer protrudes from the thoracic cavity.

Limbs: The interdigit webbing is almost absent. Phalanges and joints between them are more apparent in contrast to the previous stage. The claws are apparent for the first time, but are not opalesced yet.

Scale Anlagen

(st. 8; dpo 73; Fig. 3e-h)

Head: The brain swellings further decrease in size. The jaws start to grow out. The lower jaw is almost equal to the upper jaw. The length of the pre-orbital region of the head exceeds the diameter of the eye.

Eye: Upper and lower eyelids spread behind the caudal margin of the eye.

Body: Hemipenises are apparent and stick out of the body. Scales cover the whole body, including the limbs, while the head remains free of scales.

Limbs: The interdigit webbing is almost completely gone except for the proximal area of interdigit space.

Claws are apparent on all digits.

First Full Scales

(st. 9; dpo 81; Fig. 3i-k)

Head: The swelling of the presumptive parietal bone is distinct and contributes to the dome-like profile of the head (from the lateral view). Both upper and lower jaws are equal in length and the rostrum starts to extend.

Eye: The upper and lower eyelids spread to the rostral margin in front of the eye.

Scales: The ventral side of the head also possesses scales. Labial scales on the lower jaw are faintly visible. The area of the brain swellings is free of scales.

Limbs: Interdigits webbing is apparent only in the proximal area of autopodium between fingers III and IV.

(st. 10; dpo 88; Fig. 4a-d)

Head: Nares are evident as well-marked depressions.

Eye: The Haw starts to develop.

Scales: Scales cover the limbs and are also apparent on the upper jaws.

Limbs: All digits are completely separated. Claws are well developed.

Fully Developed Scales

(st. 11; dpo 95; Fig. 4e-h)

Scales: Scale development continues. They have flatter hexagonal shape. All body scales are overlapping. The scales in the brain area are faint, but apparent. The scales on the lower and upper jaw are more visible.

Pigmentation: The first pigmentation is just apparent in the claws but not yet elsewhere.

(st. 12; dpo 103; Fig. 4i-l)

Head: The optic tectum is reduced to small protuberance. The external naris are closed. Rostrum is still extending.

Scales: Flat scales on the eyelid and anterior snout are discernible, increasing the fold to the eyelid.

Pigmentation: Further development of pigmentation in the claws but not yet elsewhere on the body.

Pigmentation

(st. 13; dpo 130; Fig. 5a-d)

Head: The optic tectum is not longer apparent. The head is flattened and with similar proportions as at hatching. The external nares are present as distinct pits but are still closed. The rostrum is further extended. The egg tooth is apparent in the premaxillary region. The parietal organ is still clearly visible.

Eye: The hawk has developed and the eye starts to shut.

Scales: Scaly skin is complete with scales covering the whole skull.

Pigmentation: Pigmentation is more intense and the colour pattern is clearly visible.

Body: The hemipenes are well developed and located outside the body. They are fully perfused with blood and almost at a similar length to at hatching.

Near Hatchling

(st. 14; dpo 161; Fig. 5e-h)

Head: The head shape is similar to at hatching. The external nares are still closed. The egg tooth is well developed and directed forward.

Eye: The eye is shut.

Pigmentation: The juvenile colour pattern is complete (dorsal: base black, yellow spots and strips – on the tail; ventral: base yellow, black strips on the belly, tail, inner sides of the thighs, black spots on the throat and inner side of forelimbs).

Body: Hemipenes are now located inside the body in the cloaca and as such are no longer visible. The yolk is not fully consumed.

Discussion:

Here, for the first time, we present a staging table of normal embryonic development for Varanidae. This staging is primarily intended to provide a reliable basis for comparisons of the developmental dynamics of this clade with those in other reptile taxa. The primary motivation of this study was to reveal the specificities of the developmental dynamics by which this group differs from other clades of squamate reptiles and those which it shares with other clades of Toxicofera. Varanidae hold a key position within the tree of Toxicofera (Vidal et Hedges, 2009), and it can be expected that some of their specificities are related to true developmental apomorphies of Toxicofera and may be responsible for the considerable evolutionary success of this clade (cf. snakes as a sister group to varanoids). The adult characters of varanids that distinguish this clade from that of most other reptiles centre around a prominent

disposition for predation of active vertebrates. These include a reduced number of large teeth, a relatively high metabolic rate for a reptile, a large and effective heart, highly developed musculature related to locomotion, specialized vomeronasal organ, and prey detection with the aid of a long and highly adapted tongue (Smith, 1986.). A basic comparison of embryogenesis in reptile models suggests that embryonic development of some of these adaptive characters, such as the eyes and claws, is more accelerated in *Varanus* than in the other groups, relative to the time of embryonic development. For example, the claws are well developed in *Varanus* half way through post-oviposition development, while those of the *Crocodylus* reach this stage around two-thirds of the way through post oviposition development, and those of *Chelydra* do not form until almost hatching.

Yet, it should be remembered that developmental dynamics in reptiles can be considerably affected by the environment (such as ambient temperature and humidity) and for any comparative purposes the developmental data should be specified with these regards. These factors may considerably influence also the total length of incubation period. For instance, in the gecko *Paroedura pictus* the incubation time is around 60 days at 28° C, but 50 days at 30° C (Kratochvil, personal communication). The ambient condition during embryonic development such as temperature affect not only the time of development *in ovo*, but also, from the morphological point of view, the body size, shape, and, in a wide spectrum of reptiles, sex determination, and therefore produce a considerable amount of intraspecies variation (e.g. Janzen et Paukstis 91, Booth, 2006, Brana et Ji, 2000, Andrews, 2008).

The incubation period in *Varanus* takes about 180 days at 28° C. In comparison to other squamates this is remarkably long. In anole lizards, which are Iguanids, the incubation time takes less than one month (Sanger et al., 2008). In chamaeleons incubation is around 200 days (Necas, 1999), which is similar to the mangrove monitor of this study, however, the prolonged incubation of chamaeleons is partly caused by a 60-75 day diapause of development which starts after oviposition when the embryo is at the gastrula stage (Andrews et Donoghue, 2004). Such a diapause does not occur in *Varanus*. In archosaurians, the incubation time is shortened incomparison to *Varanus*, e.g. in *Crocodylus niloticus* it takes 85-95 days at 32° C (Peterka et al., 2010). Even taking in account the temperature differences for the incubation times this is a large difference between two large predatory reptiles. In turtles incubation times vary from two months (e.g. *Chelydra serpentina* around 63

days at 30° C - Yntema, 1968) to almost one year (e.g. *Acantochelys spixii* in which total incubation time is over 11 months at 28° C), but again this difference is exaggerated by the presence of a diapause in many species of turtle (Lawson, 2009). Without a diapause the obligatory long incubation period in *Varanus* could be looked upon as a strategy to produce a big juvenile capable of acting as active predators immediately after hatching.

The duration of incubation is further influenced by the extent of intrauterine development and the stage of embryonic development at oviposition, which show a considerable variation both between- and within-species of reptiles. For instance at oviposition the *Chamaeleo calyptratus* embryo is at the gastrula stage (Andrews, 2008). This is similar to *Sphenodon punctatus* (Rhynchocephalia) (Moffat, 1985), in the Lepidosaurian sister group of Squamata, which is also characterized by a very long time incubation period of 150 - 328 days depending on the incubation temperature (Thompson, 2009). Oviposition at an early developmental stage and a long incubation may therefore represent the plesiomorphic condition in all Lepidosaurians. In most extant clades of reptiles, however, the early stages of organogenesis have initiated before laying. Crocodiles, e.g. *Crocodylus porosus*, lay eggs with embryos at the stage before limb bud formation (Magnusson et Taylor, 1980). In the model taxon of the basal Squamata, the madagascarian ground gecko *Paroedura pictus*, the embryos are laid with clear development of the branchial/pharyngeal arches, as reported by Noro et al. (2009), while in our material of the same species we found also those at the neurula stage (Starostová et Zahradnické, personal observation). Another geckonid lizard, *Eublepharis macularius* possesses forelimb buds, but no hindlimb buds at oviposition (Wise et al. 2009), similar to the iguanid *Anolis sagrei* (Sanger et al. 2008). Both forelimb and hindlimb buds are present in a iguanid *Liolaemus tenuis*, though the former are larger at the time of oviposition (Lemus et al. 1981). In this respect, *Varanus* does not differ from the standard squamate situation, with the earliest embryos in our collection (second day after oviposition) possessing forelimb buds (but no hindlimb buds) similar to *E. macularius* and *A. sagrei*.

It seems apparent that in all lepidosaurs (with the exception of the snakes), forelimb buds are formed prior to hindlimb buds (e.g. Lemus et al. 1981, Sanger et al. 2008, Noro et al. 2009, Wise et al. 2009). The forelimb and hindlimb buds are of equal size in *Varanus* (at 10dpo) and *P. pictus* (at 12dpo - Noro et al. 2009) while in *Anolis sagrei* the hindlimb buds grow larger than the forelimb buds (Sanger 2008). The latter

species (representing the iguanid lizard) show the most striking set of autapomorphies in developmental dynamics: the incubation period is extremely short, the structures related to the derived adult character appear quite early in embryogenesis (lens formation, toe lamellae, pigmentation) and even the sexual dimorphic characters (including colouration) are established during embryonic development. The iguanid lizard *Liolaemus tenuis* also exhibits certain differences compared to other taxa (including both gekkotans). Similar to *Varanus*, incubation period is quite long (aprox. 130 days, Lemus et al. 1981), but hindlimb development is considerably accelerated. Toes, claws, heart development and external auditory meatus (EAM) appears significantly earlier, while lens and eye pigmentation are delayed (but pigmentation of eye precedes significantly lens formation) in comparison to other taxa.

In these respect, *Varanus* shows a developmental dynamic which corresponds in most aspects to a standard lepidosaurian pattern, as represented by *Paroedura* or *Eublepharis*. Besides its extremely long incubation period, it differs from other squamate taxa in a few specific areas. The nasal process, formation of the external naris, lens formation and haw all appear early in development (partly shared with *Python*). Development of the heart begins quite early and takes longer time than in other taxa. Scale development begins somewhat later, although it terminates at a similar stage to other taxa (particularly if compared with snakes). The first appearance of claws is roughly synchronous with other forms but the period of claw development is considerably prolonged, also scale pigmentation is delayed and (in contrast to *Anolis*, *Liolaemus* and snakes) prolonged throughout the whole second half of embryogenesis.

Summing up these specificities, it seems that *Varanus* exhibits an accelerated embryonic development in the structures directly related to adaptations for active predation (narial region with vomeronasal organ, eyes, claws, large heart and robust body and limbs). The former two developmental specificities seems to be shared also by snakes, which differ from *Varanus* in their very rapid establishment of head scalation and the cloacal region. The reliability of these comparisons and the possible phylogenetic meaning of the observed specific differences are currently restricted by the very limited spectrum of taxa for which any developmental data are available, and the incompatibility of the descriptive characteristics applied in individual model taxa. Further research is therefore needed to fill in these large gaps in our knowledge, and create a more uniform and useful system of staging.

Acknowledgements

We appreciate to Petr Velenský for to providing us samples of *V. indicus*. This work was supported by the Grant Agency of the Academy of Sciences, grant KJB601110910.

Reference:

- Albert E.M., San Mauro D., Ruber L., García-París M., Zardoya R., 2009. Effect of taxon sampling on recovering the phylogeny of squamate reptiles based on complete mitochondrial genome and nuclear gene sequence data. *Gene* 441, 12-21.
- Andrews R.M., 2008. Effects of Incubation Temperature on Growth and Performance of the Veiled Chameleon (*Chamaeleo calytratus*). *J. Exp. Zool.* 309A, 435–446.
- Andrews R.M., Donoghue S., 2004. Effects of temperature and moisture on embryonic diapause of the veiled chameleon (*Chamaeleo calytratus*). *J. Exp. Zool.* 301A, 629–635.
- Auffenberg W., 1981. The behavioral Ecology of the Komodo Monitor. University of Florida, Gainesville, 406 pp.
- Auffenberg W., 1988., Gray`s monitor lizard. University of Florida, Gainesville.
- Baverstock P.B., King D., King M., Birrel J., Krieg M., 1993., The evolution of species of the Varanidae: microcomplement fixation analysis of serum albumins. *Austr. J. Zool.* 41, 621-638.
- Birchard G. F., Marcellini D., 1996. Incubation time in reptilian eggs. *J. Zool.* 240, 621-635.
- Blanc F., 1974., Table de développement de *Chamaeleo lateralis* Gray, 1831. *Ann Embryol Morphol* 7, 99–115.
- Bolker J. A., 1995. Model systems in developmental biology. *BioEssays* 17, 451–455.
- Bolker, J. A., Raff R. A., 1997. Beyond worms, flies, and mice: it's time to widen the scope of developmental biology. *J. NIH. Res.* 9, 35–39.
- Booth D. T., 2006. Influence of incubation temperature on hatchling phenotype in reptiles. *Physiol. Biochem. Zool.* 79, 274–281.
- Boughner J. C., Buchtová M., Fu K., Diewert V., Hallgrímsson B., Richman J.M., 2007. Embryonic development of *Python sebae* - I: Staging criteria and macroscopic skeletal morphogenesis of the head and limbs. *Zoology* 110(3), 212-30.

- Brana F., Ji X., 2000. Influence of incubation temperature on morphology, locomotor performance, and early growth of hatchling wall lizards (*Podarcis muralis*). *J. Exp. Zool.* 268, 422–433.
- Dufaure J., Hubert J., 1961. Table de developpement du lizzard vivipare: *Lacerta (Zootoca) vivipara* Jacquin. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.* 50, 309–328.
- Fry BG, Vidal N, Norman J, Vonk FJ, Scheib H, Ramjan R, Kuruppu S., Fung K., Hedges S. B., Richardson M. K., Hodgson W. C, Ignjatovic V., Summerhayes R., Kochva E., 2005. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature* 439(7076), 584-588.
- Hamburger V., Hamilton H. L., 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88.
- Jackson, K. 2002. Post-ovipositional development of the monocled cobra *Naja kaouthia* (Serpentes: Elapidae). *Zoology* 105 (2002): 203-214.
- Janzen F. J., Paukstis G. L., 1991. Environmental sex determination in reptiles: ecology, evolution, and experimental design. *Q. Rev. Biol.* 66, 149–179.
- Kimmel C. B., Ballard W. W., Kimmel S. R., Ullmann B., Schilling T. F., 1995. Stages of embryonic development of the zebrafish. *Dev. Dyn.* 203(3), 253-310.
- Koch A., Auliya M., Ziegler T., 2010. Update checklist of the living monitor lizards of the world (Squamata: Varanidae). *Bonn. Zool. Bullet.* 57(2), 127-136.
- Lawson D., 2009. TSA Animal Management: New Vision and New Process. Turtle survival alliance. 19-21.
- Lee S. M., 2000. Soft anatomy, diffuse homoplasy, and the relationships of lizards and snakes. *Zoologica. Script.* ,29, 101–130.
- Lemus D., Illanes J., Fuenzalida M., Paz De La Vega Y., Garcia M., 1981. Comparative analysis of the development of the lizard, *Liolaemus tenuis tenuis*. II. A series of normal postlaying stages in embryonic development. *J. Morphol.* 169(3), 337–349.
- Losos, J. B., Greene, H. W., 1988., Ecological and evolutionary implications of diet in monitor lizards. *Biol. J. Linn. Soc.* 35, 377-407.
- Magnusson, W.E., Taylor, J. A. 1980, A description of developmental stages in *Crocodylus porosus*, for use in aging eggs in the field. *Australian Wildlife Research* 7(3): 479-485.
- McCoid, M. J. 1993., Reproductive output in captive and wild mangrove monitors (*Varanus indicus*). *Varanews* 3, 4-5.

- Moffat L. A. 1985., Embryonic development and aspects of reproductive biology in the Tuatara, *Sphenodon punctatus*. In *Biology of the Reptilia*, vol. 14, Development A, eds C. Gans, F. Billett a PFA Maderson, pp. 493-522. new York: John Wiley a Sons.
- Mouden El, E., Bons, J., Pieau, C., Renous, S., Znari, M., Boumezzough, A. 2000. Table de développement embryonnaire d'un lézard agamidé, *Agama impalearis* Boettger, 1874
- Murray J. D., Deeming D. C., Ferguson M. W. J., 1990. Size dependent pigmentation pattern formation in embryos of *Alligator mississippiensis*: time of initiation of pattern generation mechanism. *Proc. Roy. Soc. D239*, 279-239.
- Muthukkaruppan V., Kanakambika P., Manickavel V., Veeraraghavan K., 1970. Analysis of the development of the lizard, *Calotes versicolor*. *J. Morphol.* 130, 479–490.
- Necas P. 1999. Chameleons: nature's hidden jewels. Frankfurt am Main: Edition Chimaira.. 348pp
- Nicolas A., 1904. Reserches sur l'embryologie des reptiles. IV. La segmentation chez l'ovet. *Arch. Biol. Paris* 20, 611–658.
- Nieuwkoop P., Faber J., (Eds.)1967. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudln). 2nd ed. North Holland Publ. Co.. Amsterdam.
- Noro M., Uejima A., Abe G., Manabe M., Tamura K., 2009. Normal developmental stages of the Madagascar ground gecko *Paroedura pictus* with special reference to limb morphogenesis. *Dev. Dyn.* 238(1), 100-109.
- Peterka M., Sire J. Y., Hovorakova M., Prochazka J., Fougéirol L., Peterkova R., Viriot L., 2010. Prenatal development of *Crocodylus niloticus niloticus* Laurenti, 1768. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.* 314(5), 353-68.
- Pianka E. R., 1994. Comparative ecology of *Varanus* in the Great Victoria Desert. *Austr. J Ecol* 19, 395-408.
- Pianka E. R., King, King, eds 2004. *Varanoid lizards of the world*. 2004. Indiana University Press, Bloomington.
- Pianka E. R., Vitt, L. J., 2003. *Lizards: Windows to the Evolution of Diversity*. University of California Press, Los Angeles, CA.
- Pokorná M., Kratochvíl L., 2009. Phylogeny of sex-determining mechanisms in squamate reptiles: are sex chromosomes an evolutionary trap? *Zool. J. Linn. Soc.* 156(1), 168–183.

- Pough F. H., Andrews R. M., Cadle J. E., Crump M. L., Savitsky A. H., Wells K. D., 2004. *Herpetology*, 3rd Edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- Rieppel O., 1994. Studies on skeleton formation in reptiles. Patterns of ossification in the skeleton of *Lacerta agilis exigua* Eichwald (reptilia, squamata). *J. Herpetol.* 28, 145–153.
- Sanger T. J., Losos J. B., Gibson-Brown J. J., 2008. A developmental staging series for the lizard genus *Anolis*: a new system for the integration of evolution, development, and ecology. *J Morphol.* 269(2), 129-37.
- Shapiro M. D., Hanken J., Rosenthal N., 2003. Developmental Basis of Evolutionary Digit Loss in the Australian Lizard *Hemiergis*. *J. Exp. Zool. Mol. Dev. Evol.* 297B, 48–56.
- Smith K. K., 1986. Morphology and function of the tongue and hyoid apparatus in *Varanus* (Varanidae, Lacertilia). *J. Morphol.* 187, 261-287.
- Theiler K., 1972. *The house mouse: Development and normal stages from fertilization to 4 weeks of age.* Springer-Verlag (Berlin and New York).
- Thompson G. G., Pianka E. R., 2001. Allometry of Clutch and Neonate Sizes in Monitor Lizards (Varanidae: *Varanus*). *Copeia* 2001, 443-458.
- Thompson M. B. 2009., Incubation of eggs of tuatara, *Sphenodon punctatus*. *J. Zool.* 222(2), 303-318.
- Townsend T. M., Larson A., Louis E., Macey J. R., 2004. Molecular phylogenetics of Squamata: the position of snakes, amphisbaenians, and dibamids, and the root of the squamate tree. *Syst. Biol.* 53, 735–757.
- Valenzuela N., 2004. Evolution and maintenance of temperature-dependent sex determination. Pp. 131-147. *In* Valenzuela, N. and V. Lance, Eds. *Temperature Dependent Sex Determination in Vertebrates.* Smithsonian Books. Washington D.C
- Vidal N., Hedges S. B., 2004. Molecular evidence for a terrestrial origin of snakes. *Proc. R. Soc. Lond. B* 271 (Suppl.), S226–S229.
- Vidal N., Hedges S. B., 2005. The phylogeny of squamate reptiles (lizards, snakes, and amphisbaenians) inferred from nine nuclear protein-coding genes. *C. R. Biol.* 328(10-11), 1000-1008.
- Vidal N., Hedges S. B., 2009. The molecular evolutionary tree of lizards, snakes, and amphisbaenians. *C. R. Biol.* 332(2-3), 129-39.

- Whiting A. S., Bauer A. M., Sites J. W. Jr., 2003. Phylogenetic relationships and limb loss in sub-Saharan African scincine lizards (Squamata: Scincidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 29, 582–598.
- Wise P. A., Vickaryous M. K., Russell A. P., 2009. An embryonic staging table for in ovo development of *Eublepharis macularius*, the leopard gecko. *Anat. Rec.* 292(8),1198-212.
- Yntema C. L., 1968. A series of stages in the embryonic development of *Chelydra serpentina*. *J. Morphol.* 125(2), 219-51.
- Zehr D. R., 1962. Stages in the normal development of the common garter snake, *Thamnophis sirtalis sirtalis*. *Copeia* 2, 322–329.
- Zug G. R., Vitt L. J., Caldwell J. P., 2001 *Herpetology. An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*, Academic Press, San Diego, CA, USA, 2001.

Staging table (according Wise et al., 2009)

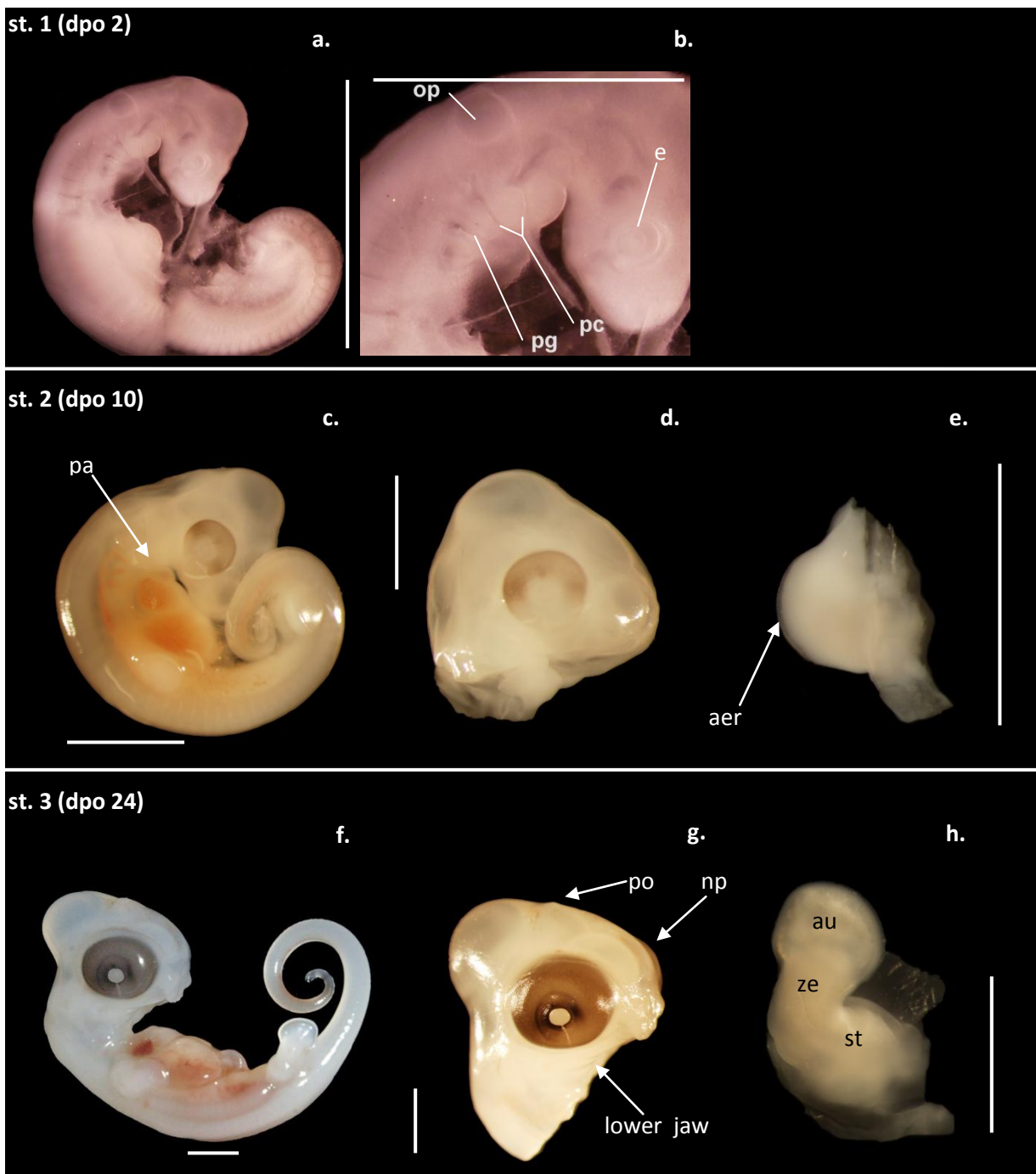


Fig. 1. Embryonic development of *Varanus indicus*, stages 1-3 (dpo 2 – 24). Each row of panels is started with a view of the whole embryo, followed by higher magnification view of important morphological features of the stage (head, limb, other). Scale bar for the intact embryo = 4 mm. Scale bars for the subsequent panels = 2mm. Lateral views. Stage 1 (**a-b**) with closer view of pharyngeal arches and otic placode (**b**). Stage 2 (**c-e**) with a closer view of head (**d**) and hindlimb bud (**e**). Stage 3 (**f-h**) with closer view of the craniofacial region (**g**) and distinction of forelimb (**h**). **aer** – apical ectodermal ridge; **au** – autopodium; **e** – eye; **np** – nasal prominence; **op** – otic placode; **pa** – pharyngeal arch; **pc** – pharyngeal cleft; **po** – parietal organ; **pg** – pharyngeal groove; **st** – stylopodium; **ze** – zeugopodium.

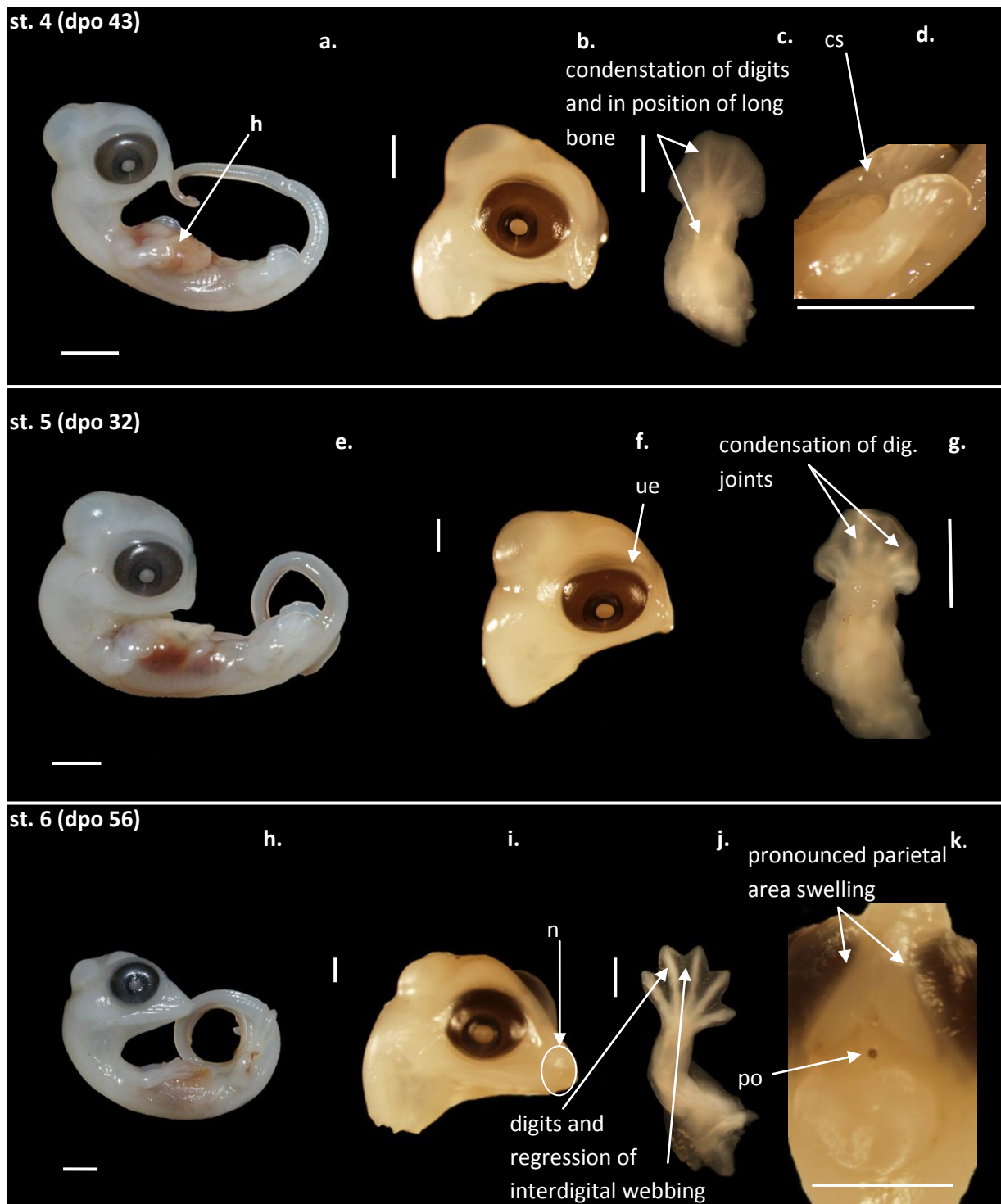


Fig 2. Embryonic development of *Varanus indicus*, stages 4-6 (dpo 43, 32, 56). Each row of panels is started with a view of the whole embryo, followed by higher magnification view of important morphological features of the stage (head, limb, other). Scale bar for the intact embryo = 4 mm. Scale bars for the subsequent panels = 2mm. Lateral views. Stage 4 (dpo 43)(a-c) with closer view of head (b) condensation of digits and in position of long bone (c) and cloacal swellings (d) and condensation of digits (c). Stage 5 (dpo 32)(e-g) with closer view of upper eyelid (f) and condensation of digits and joints (g). Stage 6 (dpo 56)(h-k) with closer view of regression of interdigital webbing (j) and area of the presumptive frontal bones (k). **cs** – cloacal swellings; **h** – heart; **ue** – upper eyelid; **n** – external naris; **po** – parietal organ.

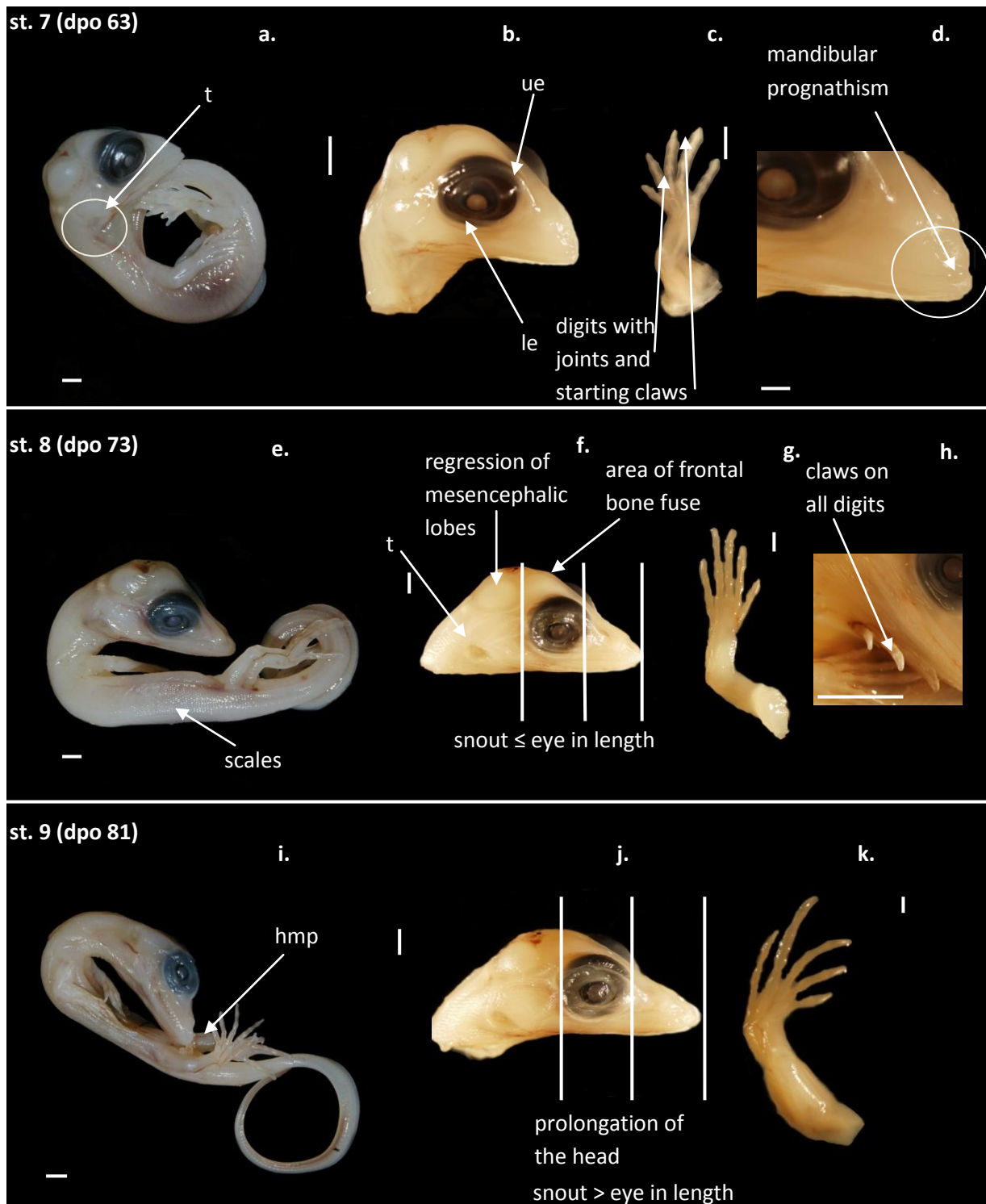


Fig 3. Embryonic development of *Varanus indicus*, stages 7-9 (dpo 63-81). Each row of panels is started with a view of the whole embryo, followed by higher magnification view of important morphological features of the stage (head, limb, other). Scale bar for the intact embryo = 4 mm. Scale bars for the subsequent panels = 2mm. Stage 7 (dpo 63) (a-d) with closer view of both eyelids (b), digits with joints (c) and mandibular prognathism (d). Stage 8(dpo 73) with closer view of regression in cranial area (f) and well developer claws (h). Stage 9 (dpo 81)(i-k) with closer view of prolongation (j) and hind limb (k). **hmp** – hemipenises; **le** – lower eyelid; **ue** – upper eyelid; **t** – tympanum.

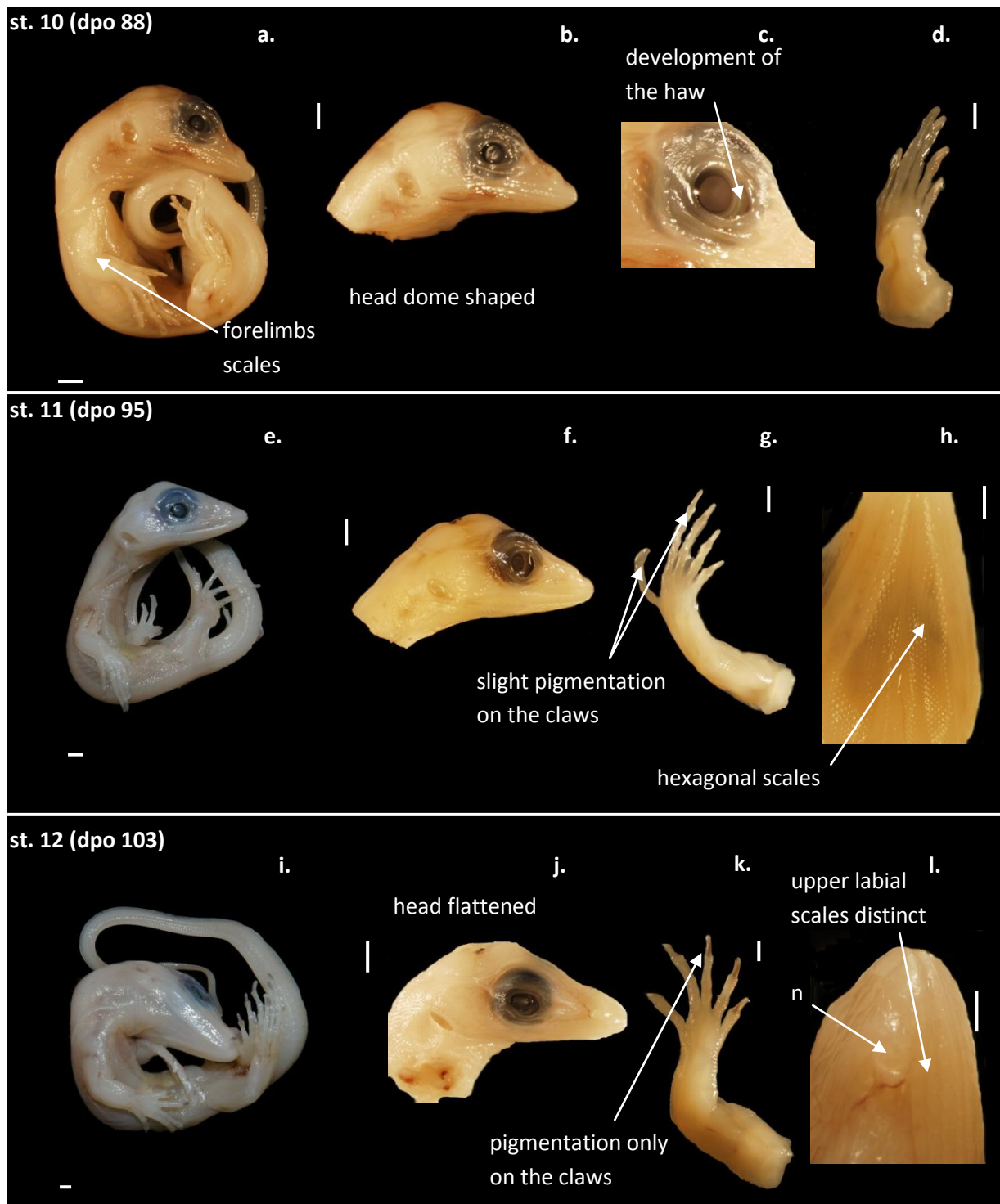


Fig 4. Embryonic development of *Varanus indicus*, stages 10-12(dpo 88-103). Each row of panels is started with a view of the whole embryo, followed by higher magnification view of important morphological features of the stage (head, limb, other). Scale bar for the intact embryo = 4 mm. Scale bars for the subsequent panels = 2mm. Lateral views. Stage 10 (dpo 88)(a-d) with closer view of head (b), development of haw (c) and hind limb (d). Stage 11 (dpo 95)(e-h) with closer view of first mark of pigmentation on the claws (g) and ventral view of lower jaw with hexagonal scales (h). Stage 12 (dpo 103)(i-l) with closer view of distinct labial scales and external naris shallow depression (l).

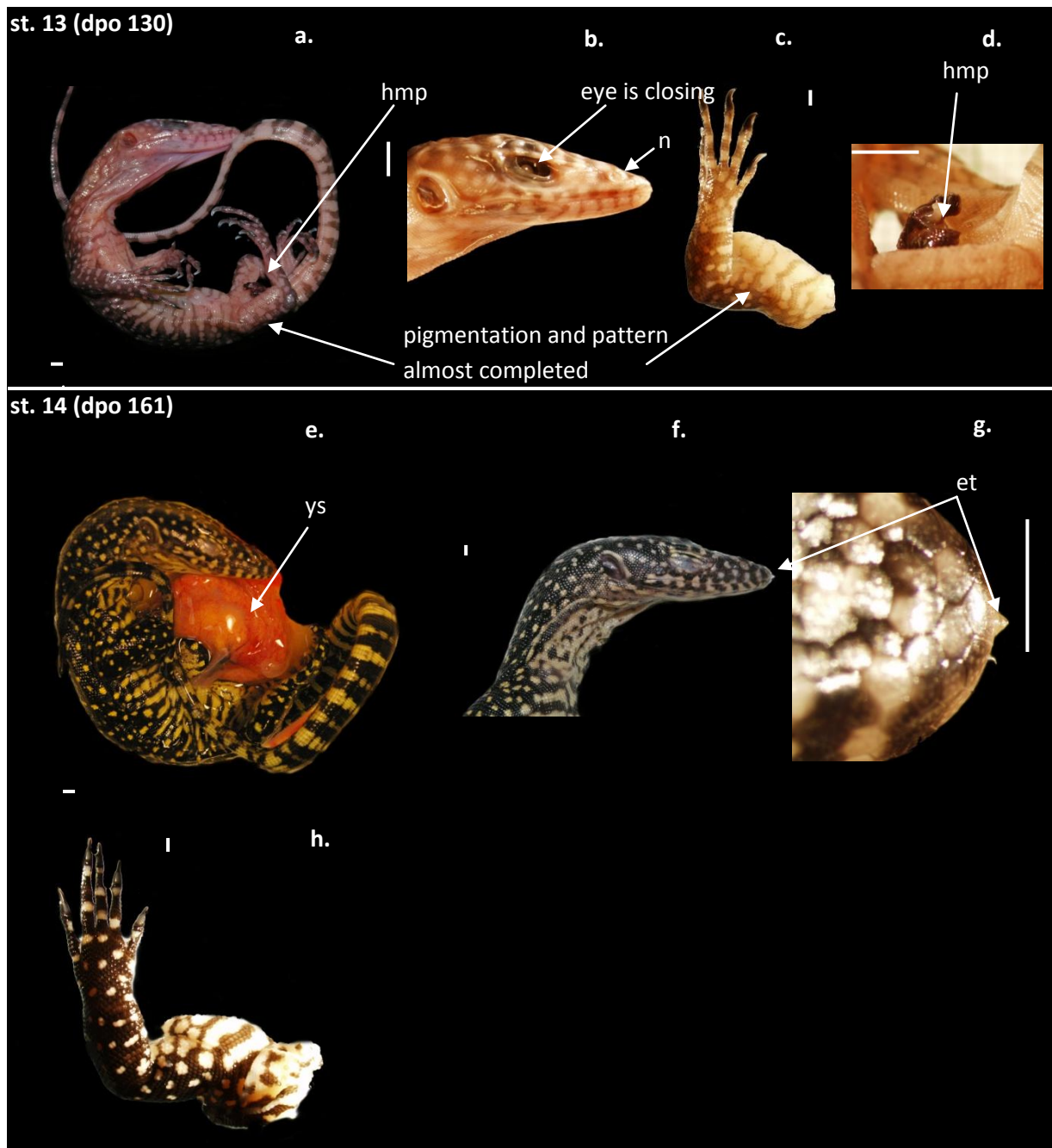
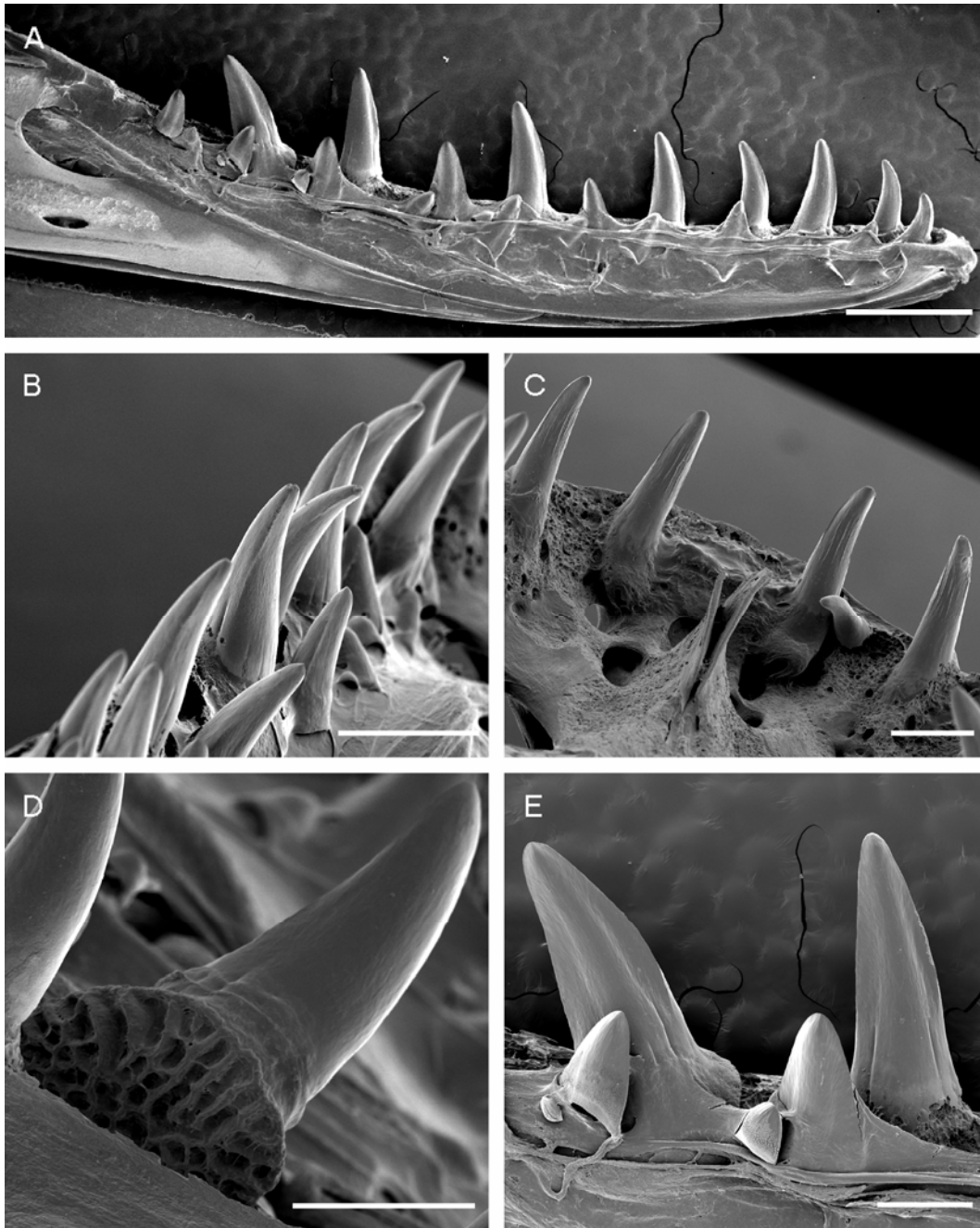
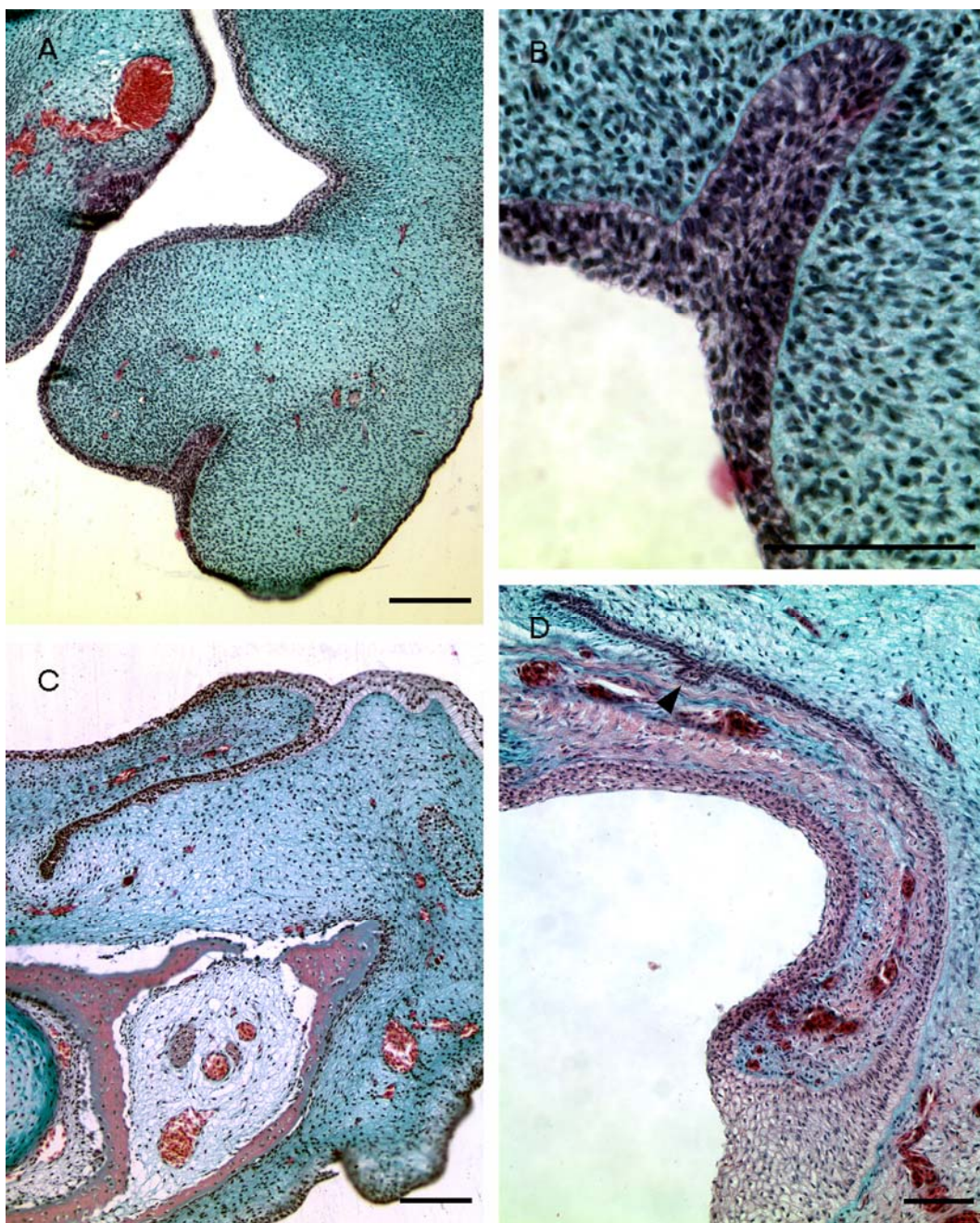


Fig 5. Embryonic development of *Varanus indicus*, stages 13-14 (dpo 103-161). Each row of panels is started with a view of the whole embryo, followed by higher magnification view of important morphological features of the stage (head, limb, other). Scale bar for the intact embryo = 4 mm. Scale bars for the subsequent panels = 2mm. Lateral views. Stage 13 (dpo 130)(**a-d**) with closer view of shutting eye and external naris flush and closed (**b**) and detail of hemipenises (**d**). Stage 14 (dpo 161)(**e-h**) with closer view of egg tooth (**g**). **et** – egg tooth; **hmp** – hemipenises; **n** – external naris; **ys** – yolk sac.

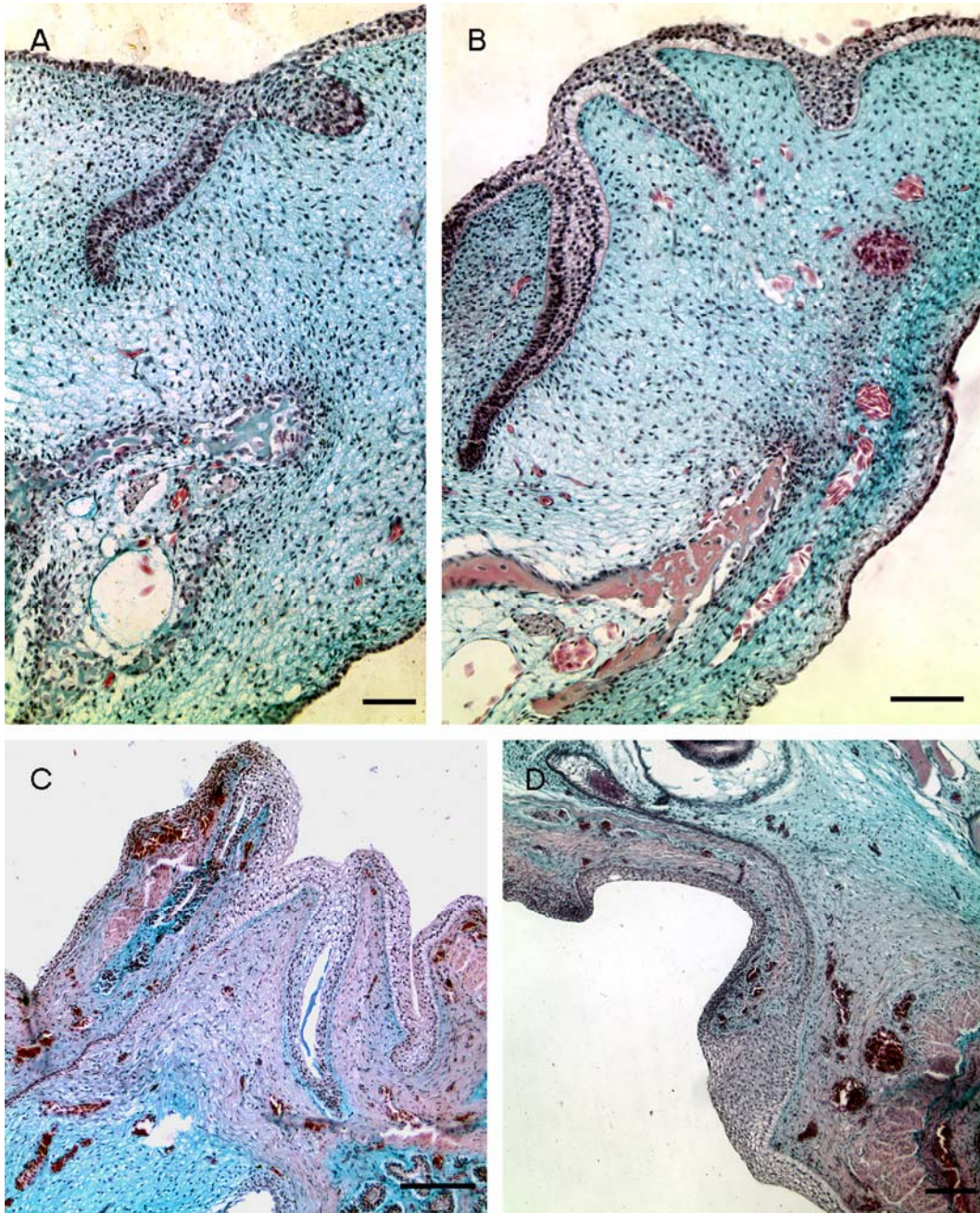
***Varanus indicus*: vývoj zubů nulté a funkčních generací**



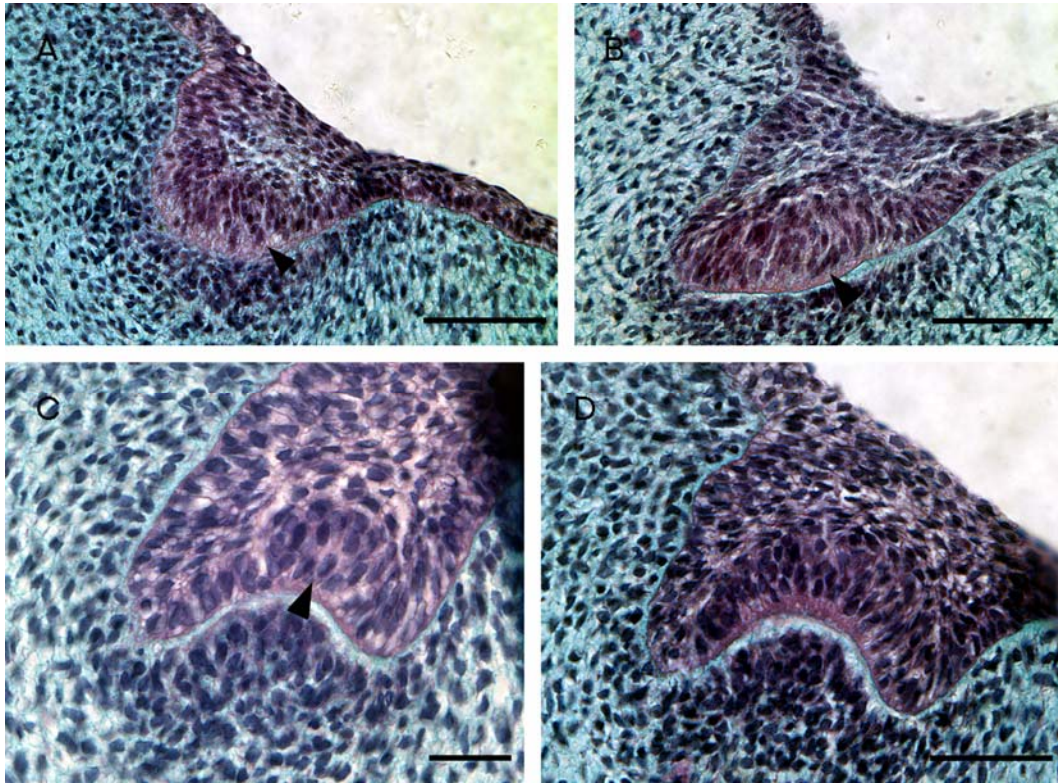
Obr. 1: Dentice mláděte *V. indicus*. A) Levá dolní čelist s pleurodontně připojenými zuby. B) Zuby na sousedních pozicích jsou vykloněny střídavě labiálně a lingválně. C) V mesiální části horní čelisti jsou zuby subtilnější a konické. E) V distální části čelisti jsou zuby dýkovité. D) Báze zubu je tvořena plicidentinem. Velikost měřítek je A) 2mm, B) 1mm, C-E) 0,5mm.



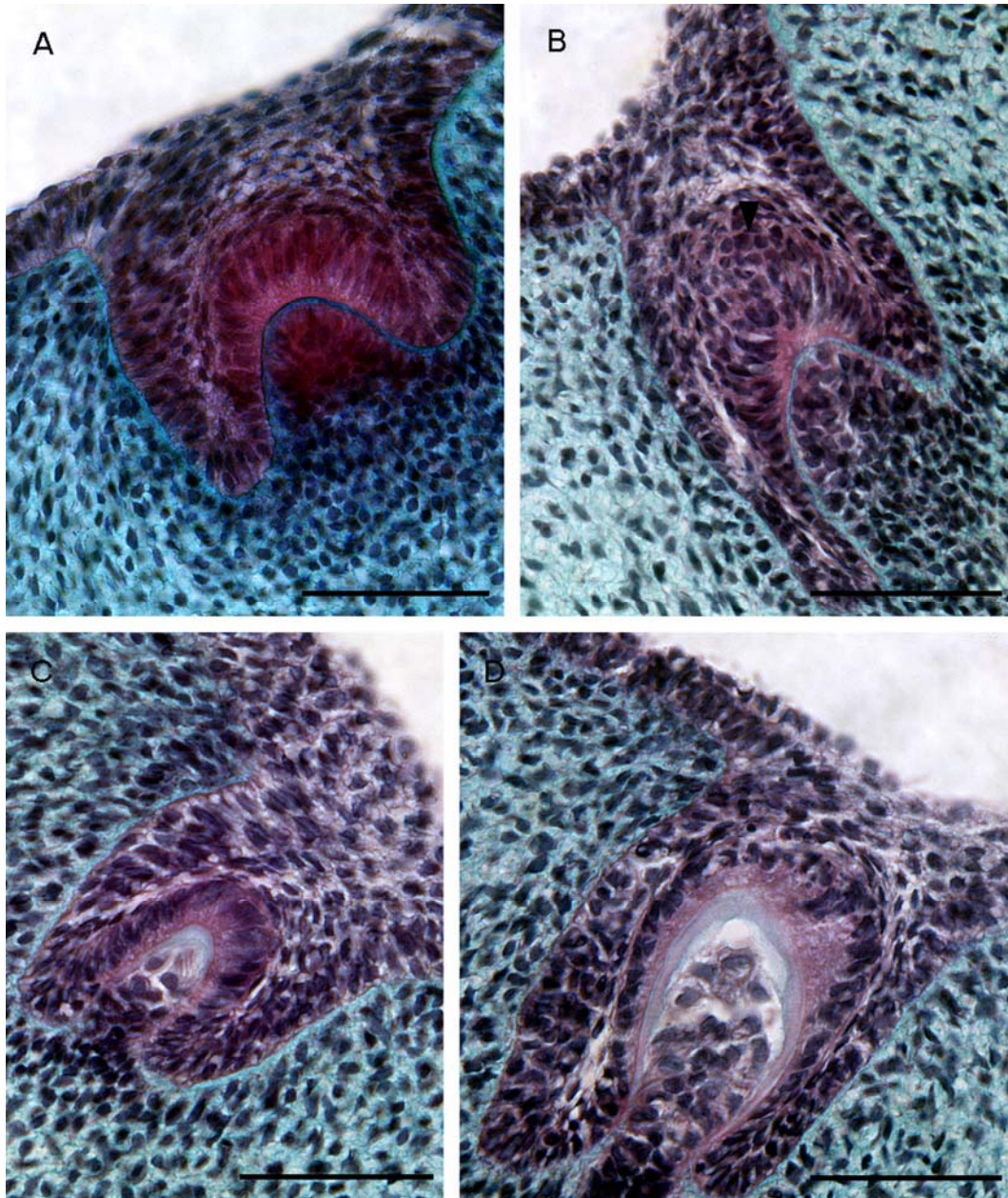
Obr. 2: Vývoj zubní lišty. A) Pravý maxillární výběžek se zubní lištou u 32 dní starého embrya (stádium 5). B) Detail struktury lišty, které roste téměř kolmo k orálnímu epitelu. C) Pravá dolní čelist u 88 dnů starého embrya (stádium 10). Zubní lišta roste hlouběji do mezenchymu a směr růstu se mění na linguální. D) U 130 dní starého embrya (stádium 13) se zubní lišta nachází na hranici mezi podkožním vazivem a nediferencovaným mezenchymem. Zubní lišta u tohoto staršího stádia vytváří krátké prstovité výběžky. Velikost měřítek je A, C) 0,1mm, B, D) 0,05mm.



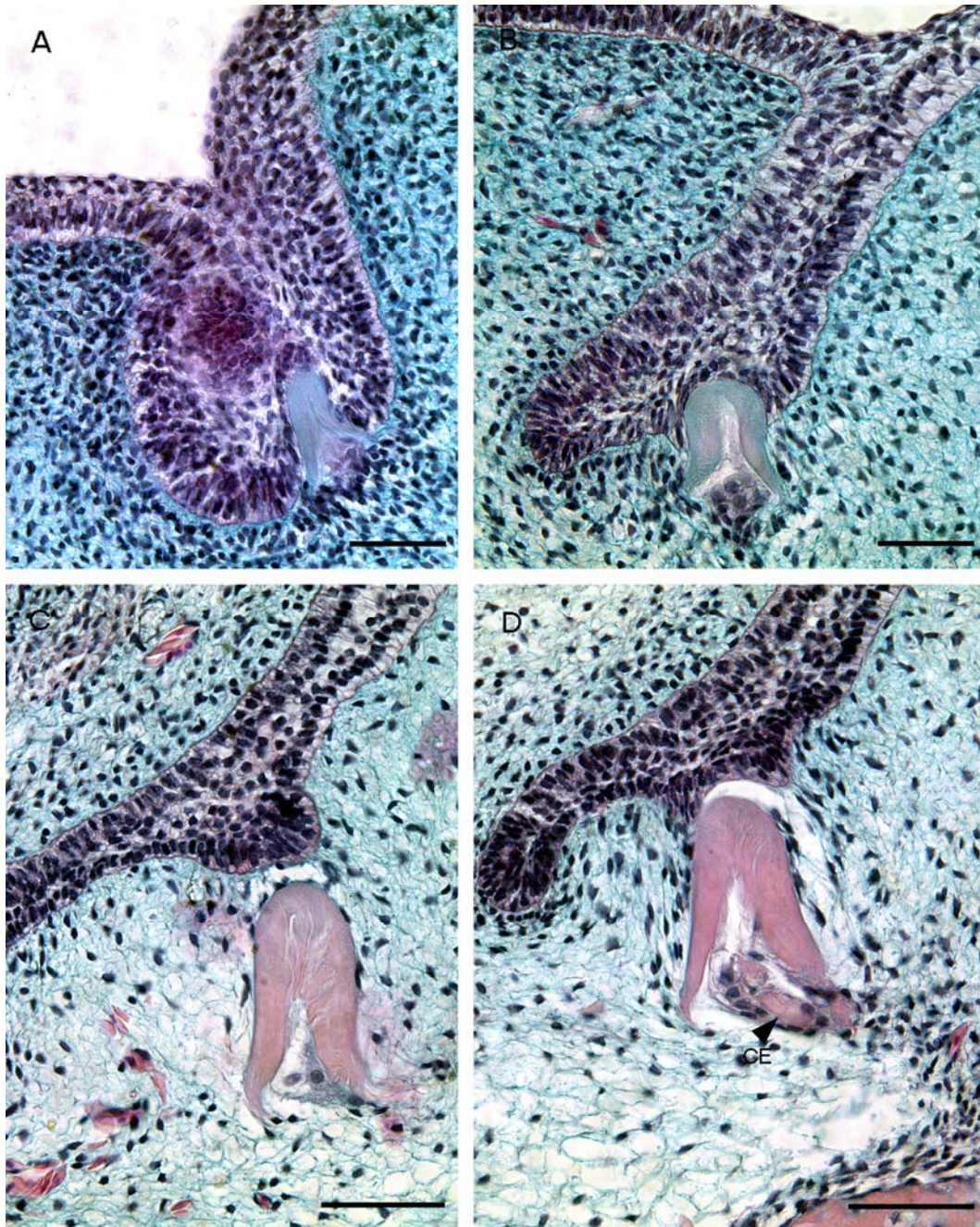
Obr. 3: Vývoj orálních žláz. A) U embrya 56 dní starého (stádium 6) byl v dolní čelisti patrný vývoj zubní žlázy ze společného primordia se zubní lištou. B) U 73 dní starého embrya (stádium 8) se vyvíjí v dolní čelisti labiálně k zubní žláze labiální žláza. C) U 130 dní starého embrya (stádium 13) je v dolní čelisti patrná žláza vyvíjející se na linguální straně od zubní lišty. D) V horní čelisti v průběhu embryogeneze žlázy nevznikají, jak je patrné u 130 dní starého embrya (stádium 13). Velikost měřítka je A-C) 0,05mm a D) 0,1mm.



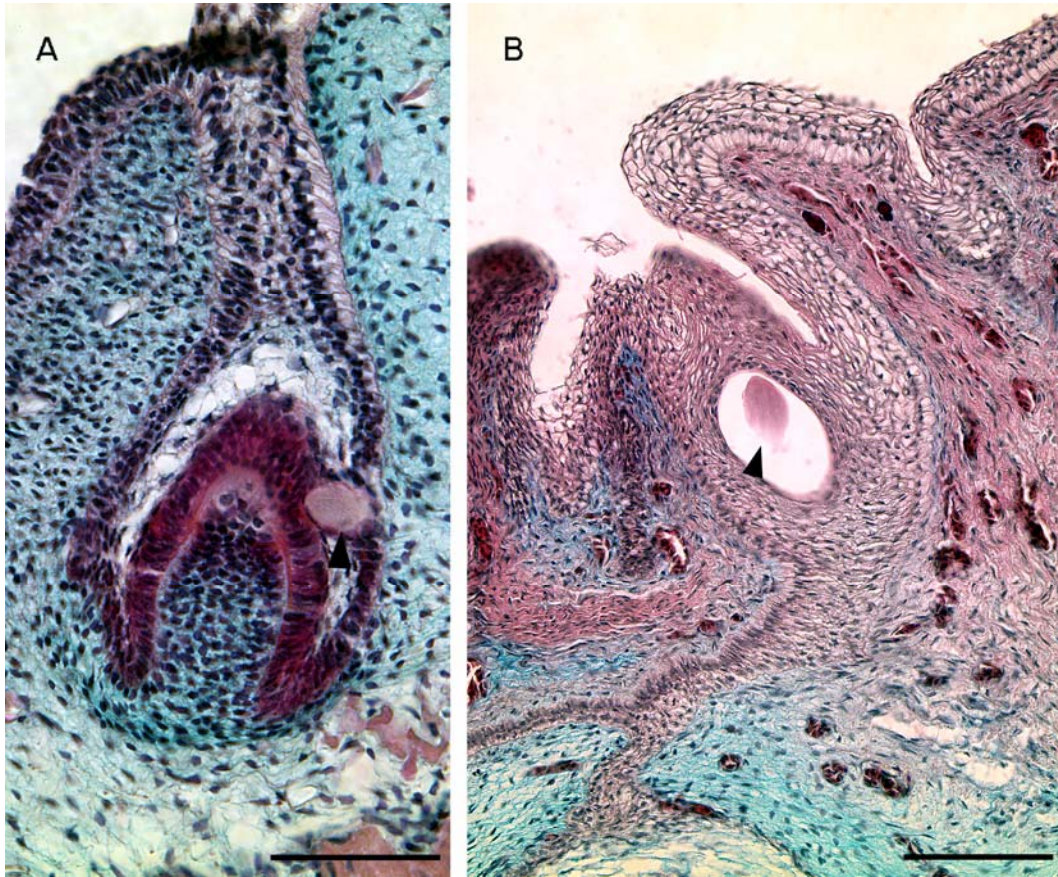
Obr. 4: Vývoj zubů nulté generace: stádium pupenu a pohárku. A-B) Ukazují velikostní rozdíly v epiteliálních pupenech u embrya 43 dní starého (stádium 4). C) Stádium pohárku s kulovitou strukturou v centru IDE (32 dní staré embryo - stádium 5) a D) Pozdní stádium pohárku, kde je patrné rozšíření centrálního shluku buněk do stran ((32 dní staré embryo - stádium 5). Šipky ukazují shluk buněk v centru vyvíjejícího se skloviného orgánu. Velikost měřítka je 0,05mm.



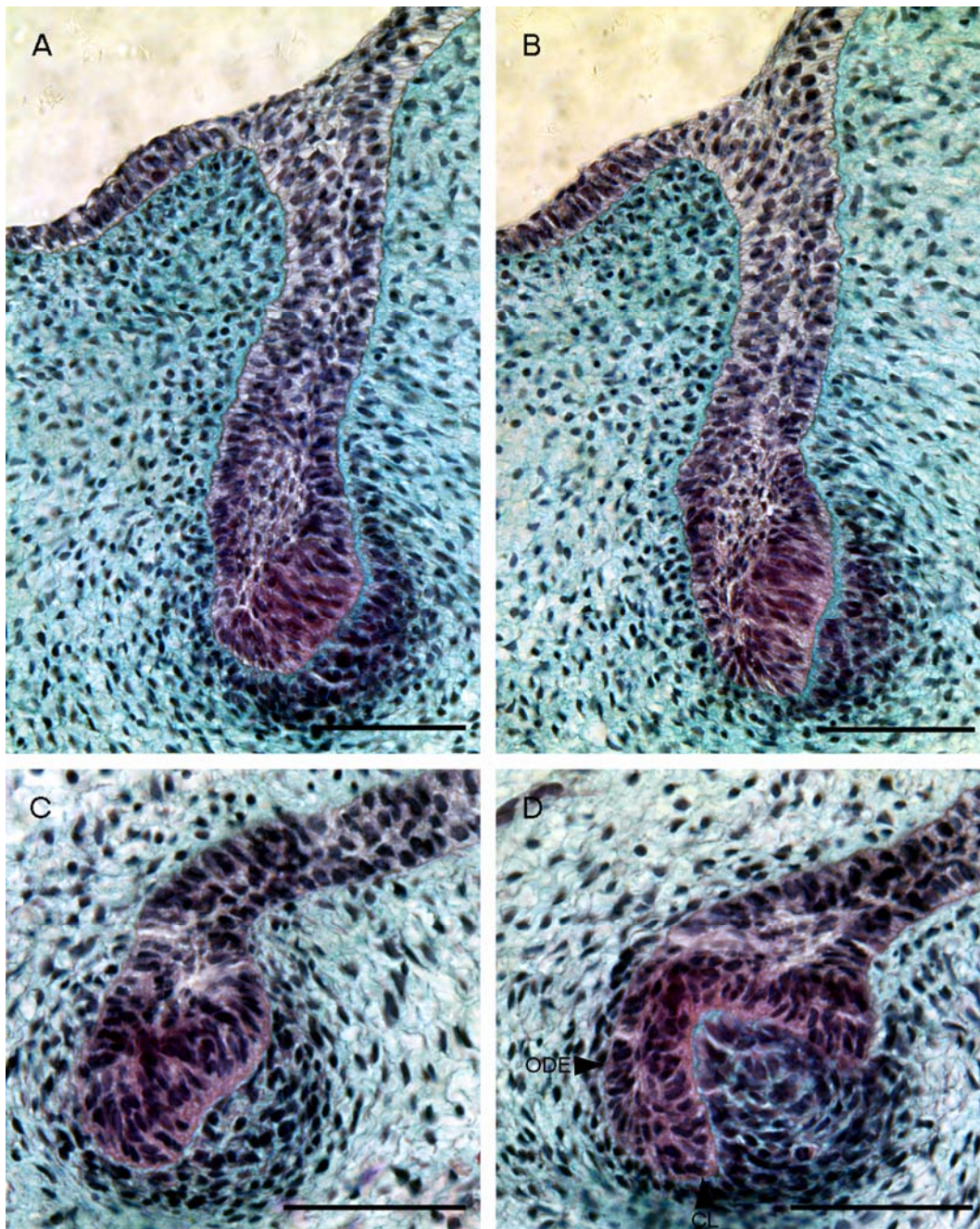
Obr. 5: Vývoj zubů nulté generace: stádium zvonku a sekreční stádium. A-B) Časné stádium zvonku různých velikostí u embryí 32 a 48 dní starých (stádium 5) . B) Ve středu sklovinného orgánu je patrný shluk buněk obklopující centrální diferencující ameloblasty. C-D) U těchto embryí jsou také přítomny zuby různé velikosti tvořené predentinem. Střední vrstvy jejich sklovinného orgánu byly rozvinutější než v předchozích stádiích. Velikost měřítka je 0,05mm.



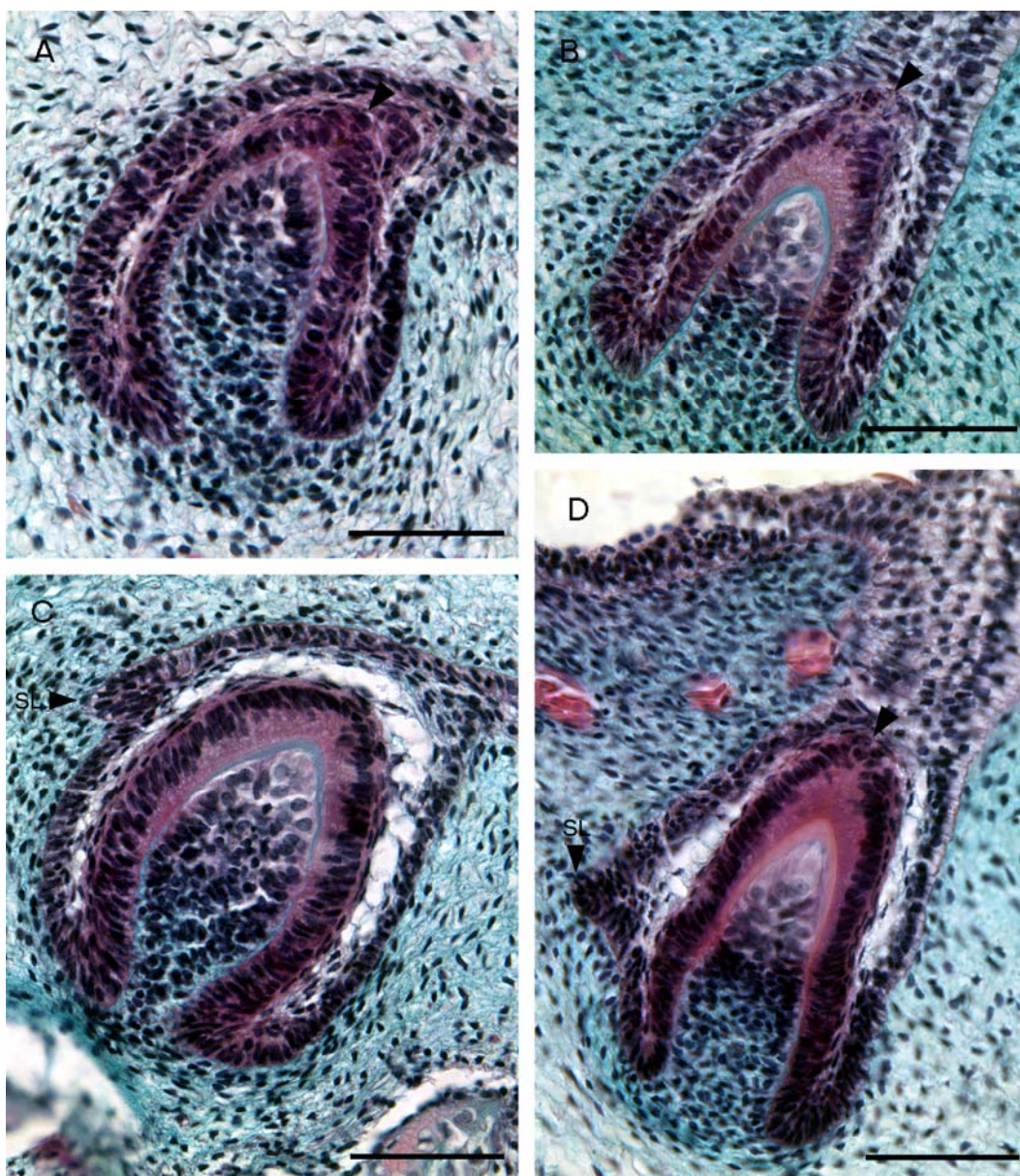
Obr. 6: Vývoj zubů nulté generace: mineralizace, odvržení zubu ze sklovinného orgánu a vznik ankylózy. A-D) Zobrazují regresní vývoj sklovinných orgánů. A-B) U 56 dní starého embrya (stádium 6) byl zachycen počátek mineralizace predentinu a B) iniciace regresního vývoje sklovinného orgánu. C) Zub v konečné fázi regrese sklovinného orgánu (73 dní staré embrya – stádium 8). D) U 63 dní starého embrya (stádium 7) byl zub ve své proximální části ještě krytý zbytkem sklovinného orgánu. Mezi bází tohoto zubu a čelistní kostí se vytváří kalcifikovaná jádra z cementu (ce), která později zprostředkovávají připojení zubu ke kosti. Velikost měřítka je 0,05mm.



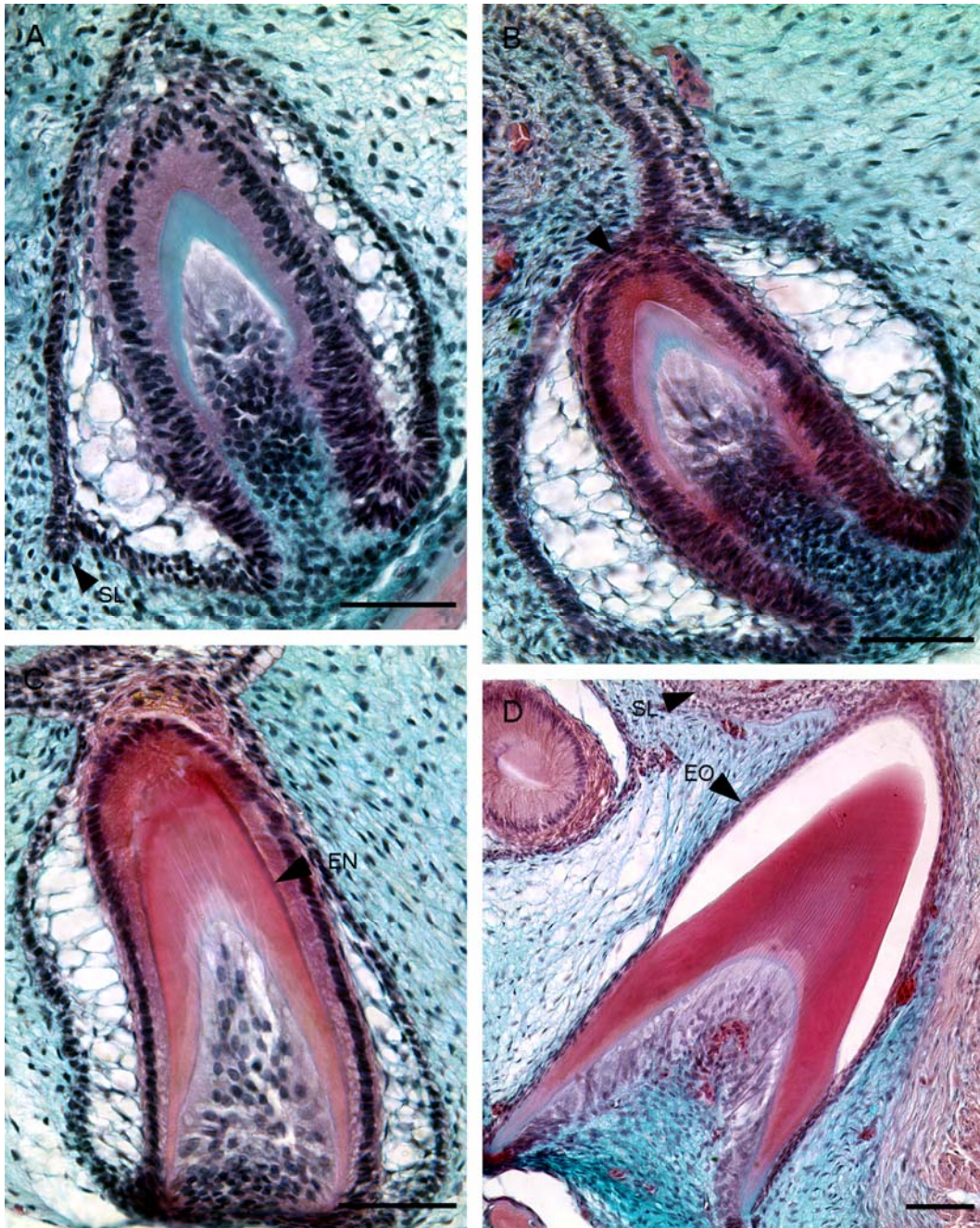
Obr. 7: Osud zubů nulté generace. A) U embrya 73 dní starého (stádium 8) jsme našli malý dentinový zub nulté generace uvnitř sklovinného orgánu vyvíjejícího se zubu první funkční generace. B) U embrya 130 dní starého (stádium 13) jsme pozorovali některé dentinové zuby uzavřené v zubní liště blízko orálního epitelu. Tyto zuby byly později odvrženy do dutiny ústní. Šipky ukazují malé dentinové zuby. Velikost měřítka je 0,05mm.



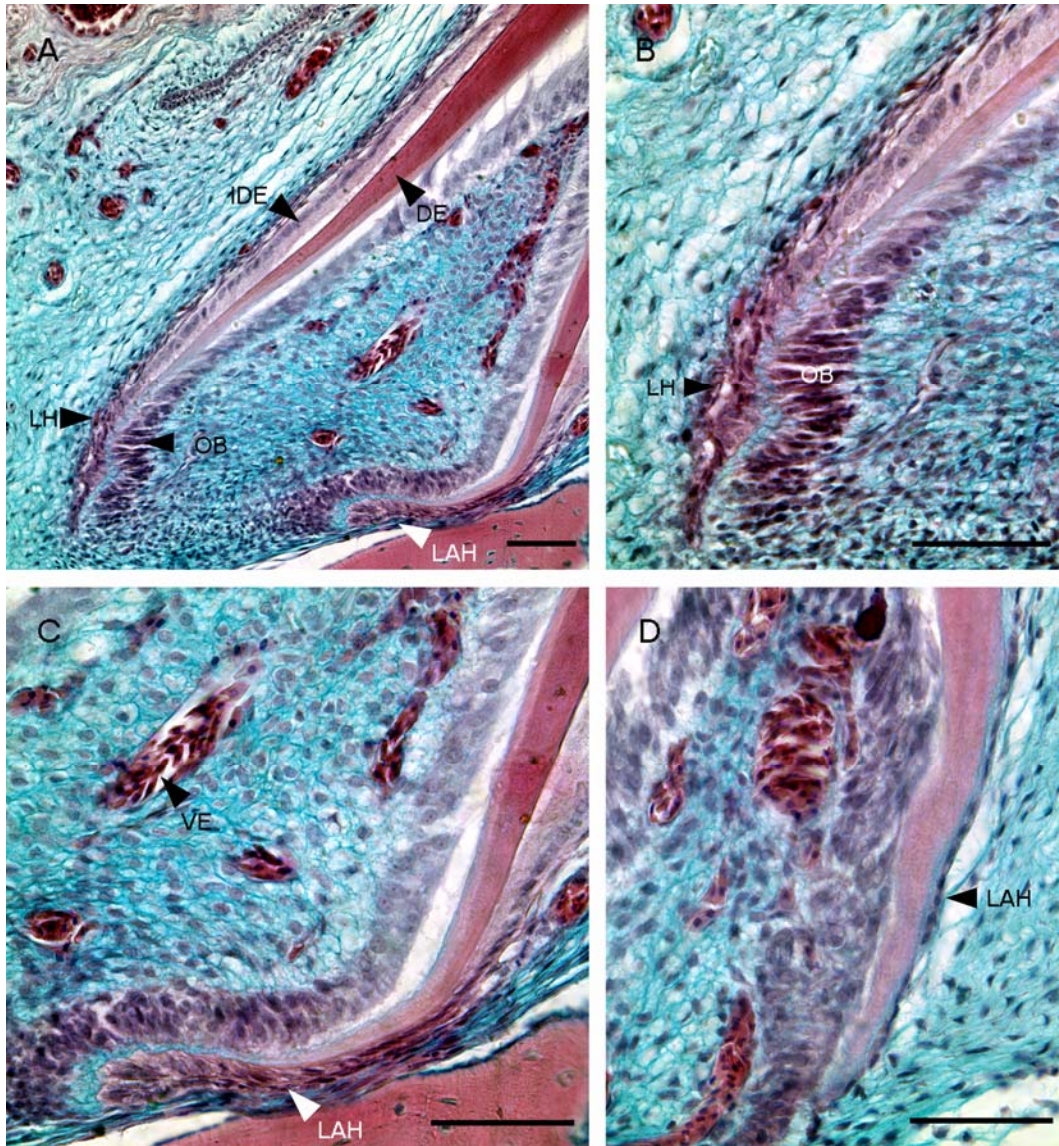
Obr. 8: Vývoj zubů první funkční generace. A-B) Časná stádia pupu u embrya 56 dní starého (stádium 6). A) Epiteliální pupen je tvořený oválným shlukem buněk, který mírně prominuje do mezenchymu. B) Shluk buněk pupu se rozšiřuje linguálním směrem a začíná se vytvářet sklovinný orgán. C) Zobrazuje strukturu velmi časného stádia pohárku u 63 dní starého embrya (stádium 7) a D) plně vyvinuté stádium pohárku u stejně starého embrya. Ve stádiu pohárku je v centru sklovinného orgánu patrný shluk buněk. Tento shluk je poměrně malý a umístěný mezi vrstvou buněk IDE a ODE. Velikost měřítka je 0,05mm.



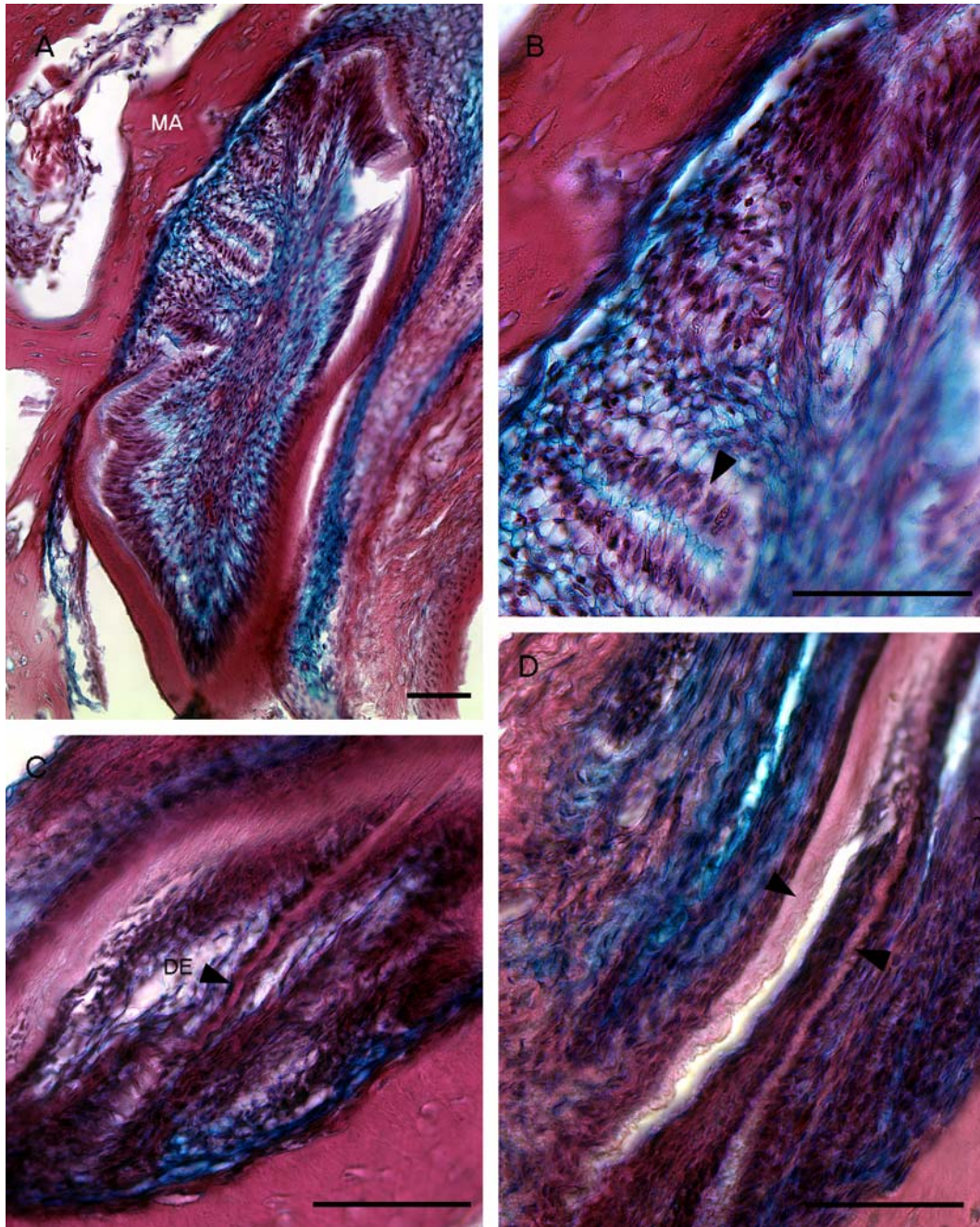
Obr. 9: Vývoj zubů první funkční generace: stádium zvonku až stádium časné mineralizace. A) Presekreční stádium zvonku u embrya 73 dní starého (stádium 8). Buňky centrální části IDE a buňky přilehlého mezenchymu zubní papily diferencují. Shluk buněk v centrální části sklovinného orgánu je stále patrný. B) Tvorbu predentinu u prvních funkčních zubů jsme pozorovali již od 56 dne inkubace (stádium 6). Tyto zuby byly nejmenší ze všech funkčních zubů. C) U staršího 73 dní starého embrya (stádium 8) byly přítomny v sekrečním stádiu větší zubní zárodky vznikající hlouběji v mezenchymu. D) Zobrazuje mineralizaci dentinu (73 dní staré embryo – stádium 8). Z lingvální strany ODE se diferencuje zubní lišta (SL). Šipka ukazuje na shluk buněk sklovinného epitelu, v kterém jsme našli apoptotická tělíčka. Velikost měřítka je 0,05mm.



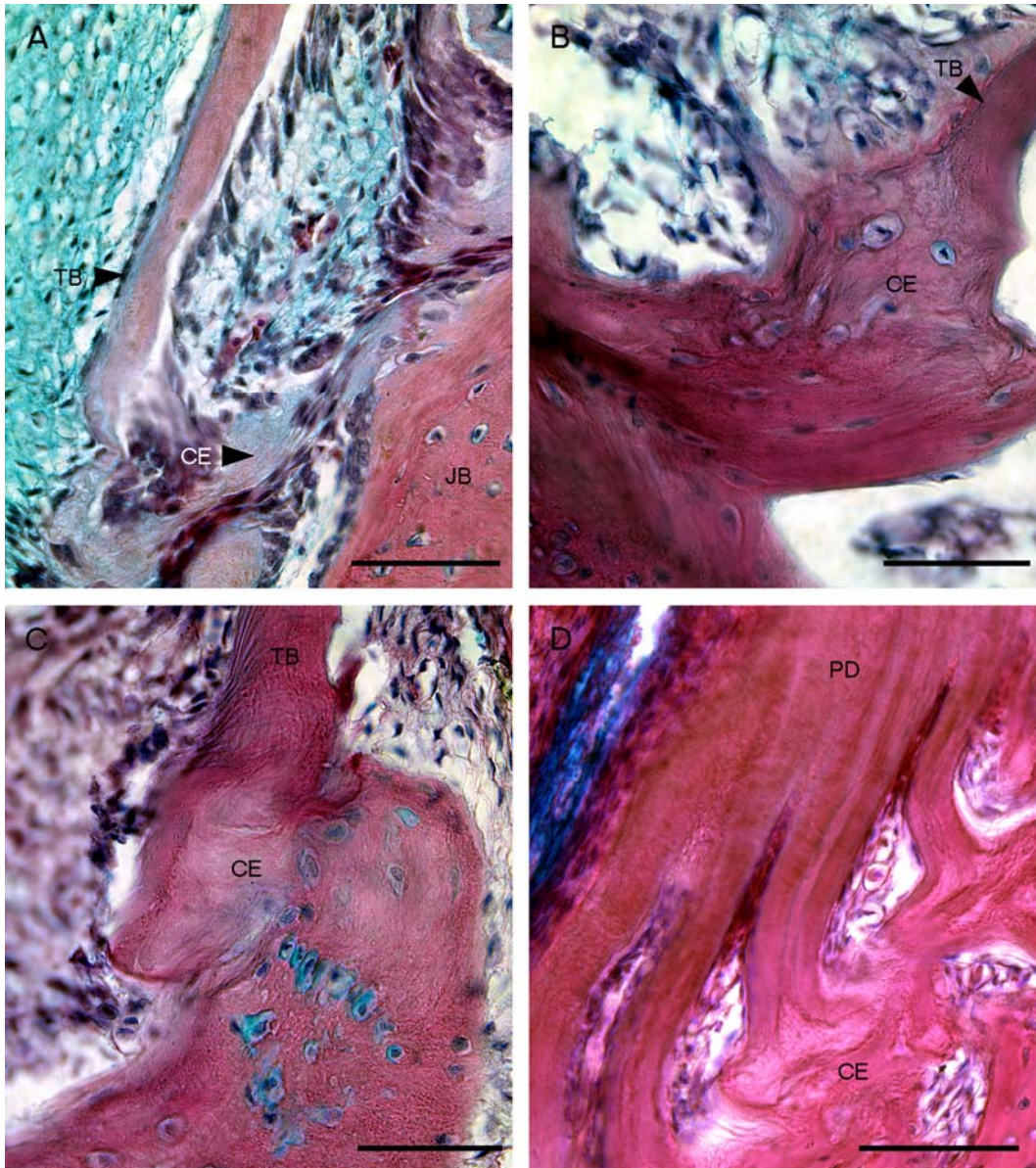
Obr. 10: Vývoj zubů první funkční generace: sekreční a mineralizační stádium. A). Před začátkem mineralizace je přítomná široká vrstva predentinu (značeno modře) (embryo 88 dní staré - stádium 10). V této fázi zubního vývoje z lingvální části ODE vybíhá zubní lišta (SL) tvořená jen vnější vrstvou. Hvězdicovité retikulum je již značně rozvinuté. B – D) Zuby v různých stádiích mineralizace u embrya 103 dní starého (stádium 12). B) Šipka ukazuje shluk buněk mezi centrem IDE a ODE, který nemá retikulární charakter. C) Tenká vrstva skloviny (EN) byla u starších mineralizačních stádií. D) Ke konci vývoje zubu dochází k regresnímu vývoji sklovinného orgánu (EO). Velikost měřítka je 0,05mm.



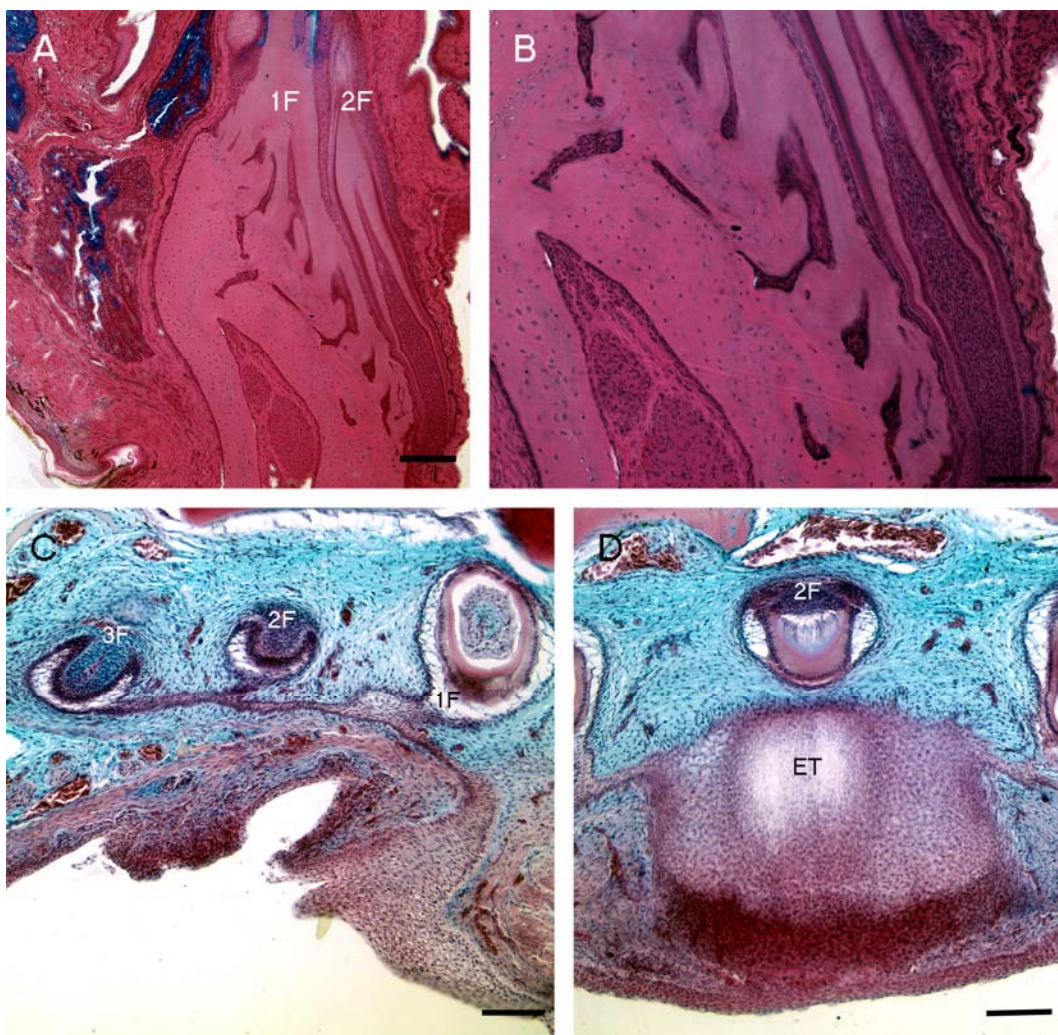
Obr. 11: Vývoj zubní báze funkčních zubů u embrya 130 dní starého (stádium 13). A) Zobrazuje dvojrstevnou HERS. B) Detail lingvální části HERS (LH). B) Detail labiální části HERS (LAH). D) U některých zárodků byl sklovinný orgán v oblasti báze tvořen jen jednou rozpadající se vrstvou HERS. (DE) – dentin, (IDE) – vnitřní sklovinný epitel, (OD) – odontoblasty, (VE) – cévy. Velikost měřítka je 0,05mm.



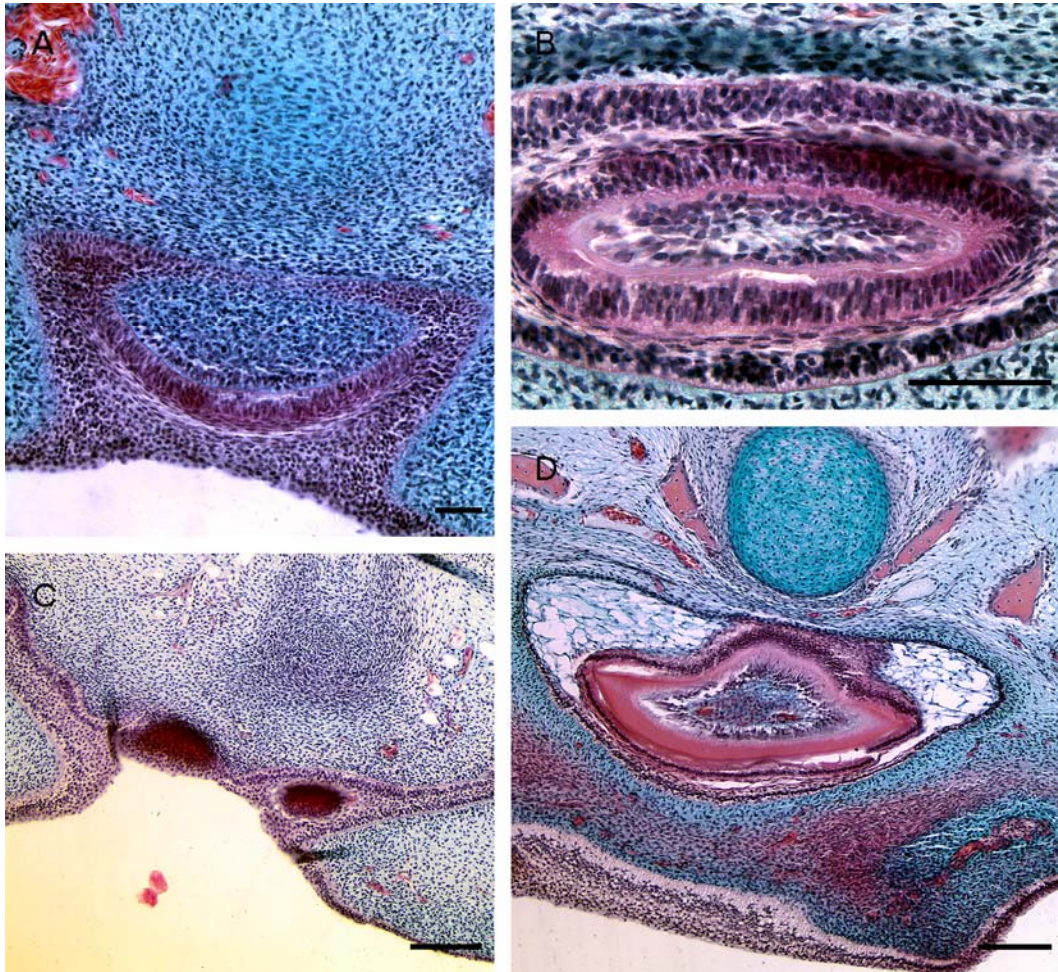
Obr. 12: Vývoj plicidentinu v oblasti zubní báze funkčních zubů u embrya 161 dní starého (stádium 14). A-B) příčný řez vyvíjející se zubní bází. B) Tvorbu plicidentinu předchází vznik invaginací IDE do mezenchymu zubní papily (šipka). C) U starších zubních zárodků je patrná formace dentinových lamel (DE), D) Ty se v průběhu svého vývoje rozvětvují (šipky). Velikost měřítka je 0,05mm.



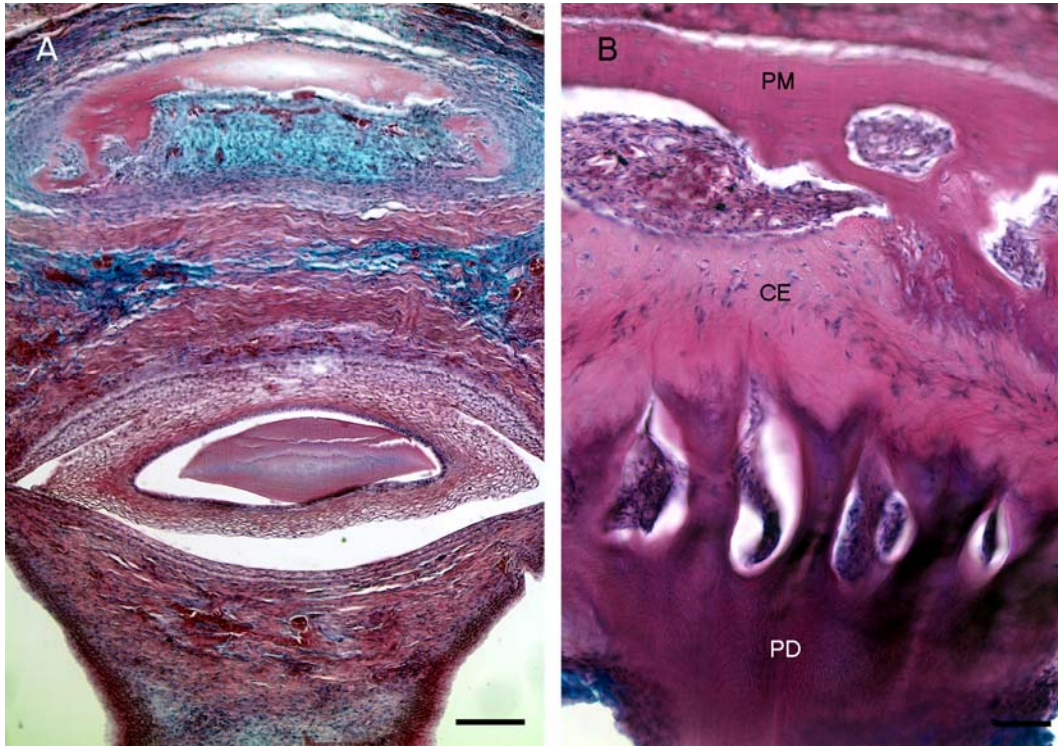
Obr. 13: Vývoj zubů první funkční generace: vznik ankylózy. A) U 130 dní starého embrya (stádium 13) je patrný vznik mineralizujících okrsků cementu mezi zubní bází a čelistní kostí (CE). B-D) Později u 161 dní starého embrya (stádium 14) je u zubů patrné mineralizované spojení mezi centimem zubní báze (TB) a čelistní kostí. B) Detail lingvální části ankylózy. C) Detail labiální části ankylózy. V cementu blíže kosti jsou patrné uzavřené buňky, zatímco v cementu u zubní báze tyto buňky patrné většinou nejsou. D) Záhyby plicidentinu jsou v místě připojení ke kosti rozšířené. (JB) – čelistní kost, (PD) – plicidentin. Velikost měřítka je 0,05mm.



Obr. 14: Vývoj náhradních funkčních zubů. A) Na konci inkubace u embrya 161 dní starého (stádium 14) jsme pozorovali podél lingvální strany zubu první funkční generace (1F) přítomnost náhradního zubu druhé funkční generace (2F). B) Tento náhradní zub je v pokročilém stavu mineralizace. V tomto stádiu není stále pozorovatelná resorpce báze zubu první funkční generace. C) V průběhu vývoje jsme pozorovali u starších embryí vznik tří funkčních zubních generací (1F, 2F, 3F). D) Náhradní zuby vznikají i na pozici vaječného zubu (ET). Velikost měřítka je A) 0,1mm a B-D) 0,05mm

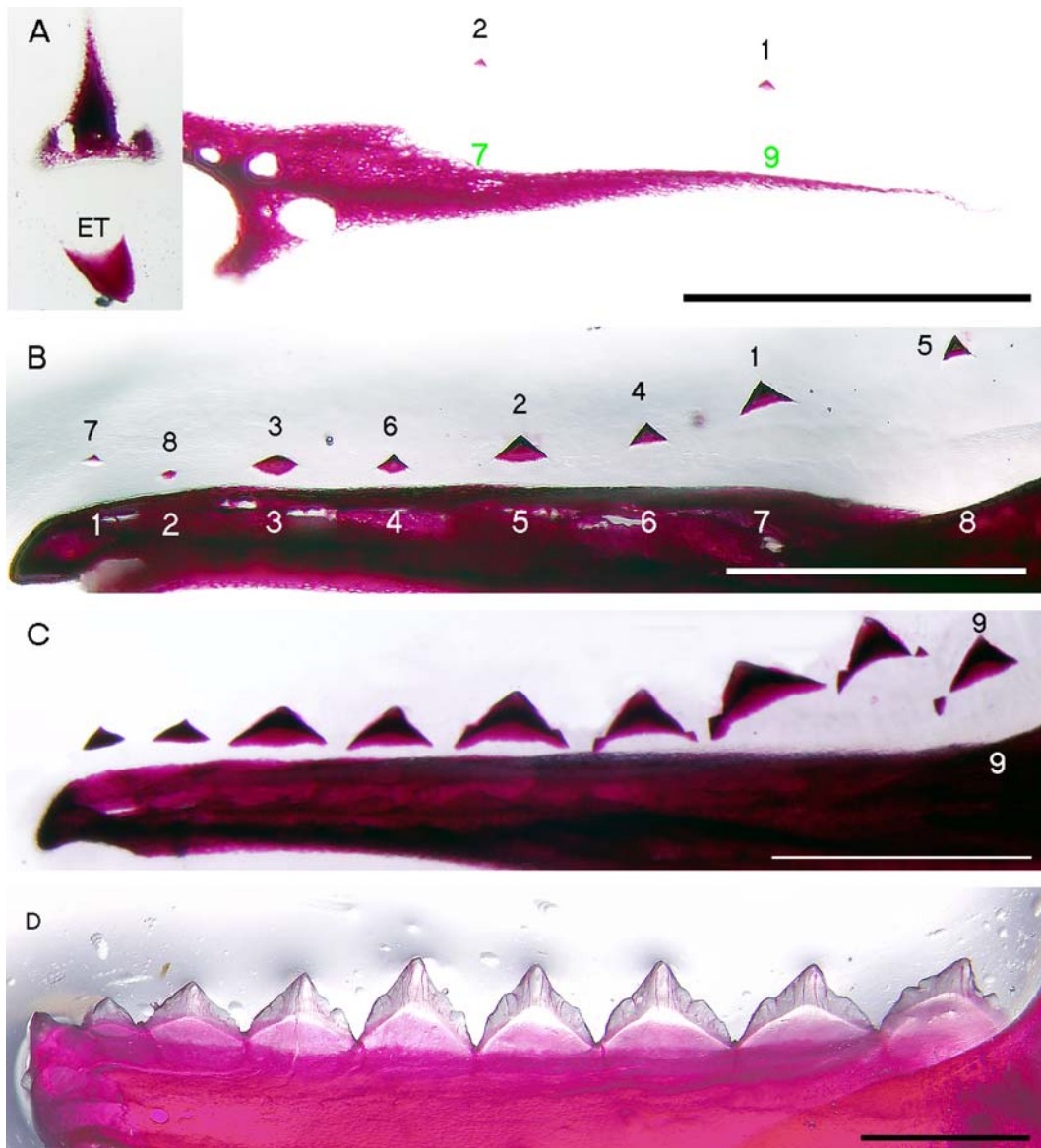


Obr 15 Vývoj vaječného zubu. A) Vaječný zub se vyvíjí blízko orálního epitelu. Jak je patrné ze stádia pohárku, na jeho vývoji participuje velká buněčná populace (56 dní staré embryo - stádium 6) B) U 63 dní starého embrya (stádium 7) jsme pozorovali vytvořenou tenkou vrstvu dentinu., C) Proximální část sklovinného orgánu je v tomto stádiu v kontaktu s orálním epitelem. D) U 103 dní starého embrya (stádium 12) byly mineralizace vaječného zubu v pokročilém stupni vývoje. Strany zuby tvořily ostré lišty. Hvězdčité retikulum bylo značně rozvinuté. Velikost měřítka je A-B) 0,05mm, C-D) 0,1mm.



Obr. 16: Vývoj vaječného zubu. A) Na struktuře sklovinného orgánu u embrya 130 dní starého (stádium 13) je patrný regresní vývoj. B) Široká báze vaječného zubu tvořená plicidentinem (PD) je u embrya 161 dní starého (stádium 14) spojena s premaxillou (PM) vrstvou cementu (CE). Velikost měřítka je 0,05mm.

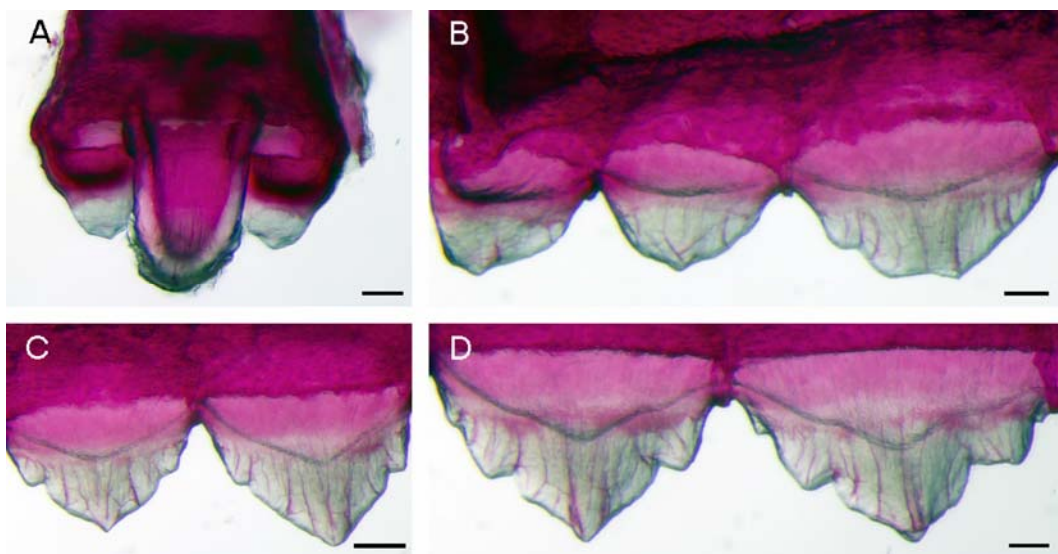
**Vývoj dentice u *Chamaeleo calyptratus*: monofydoncie,
akrodoncie a heterodoncie**



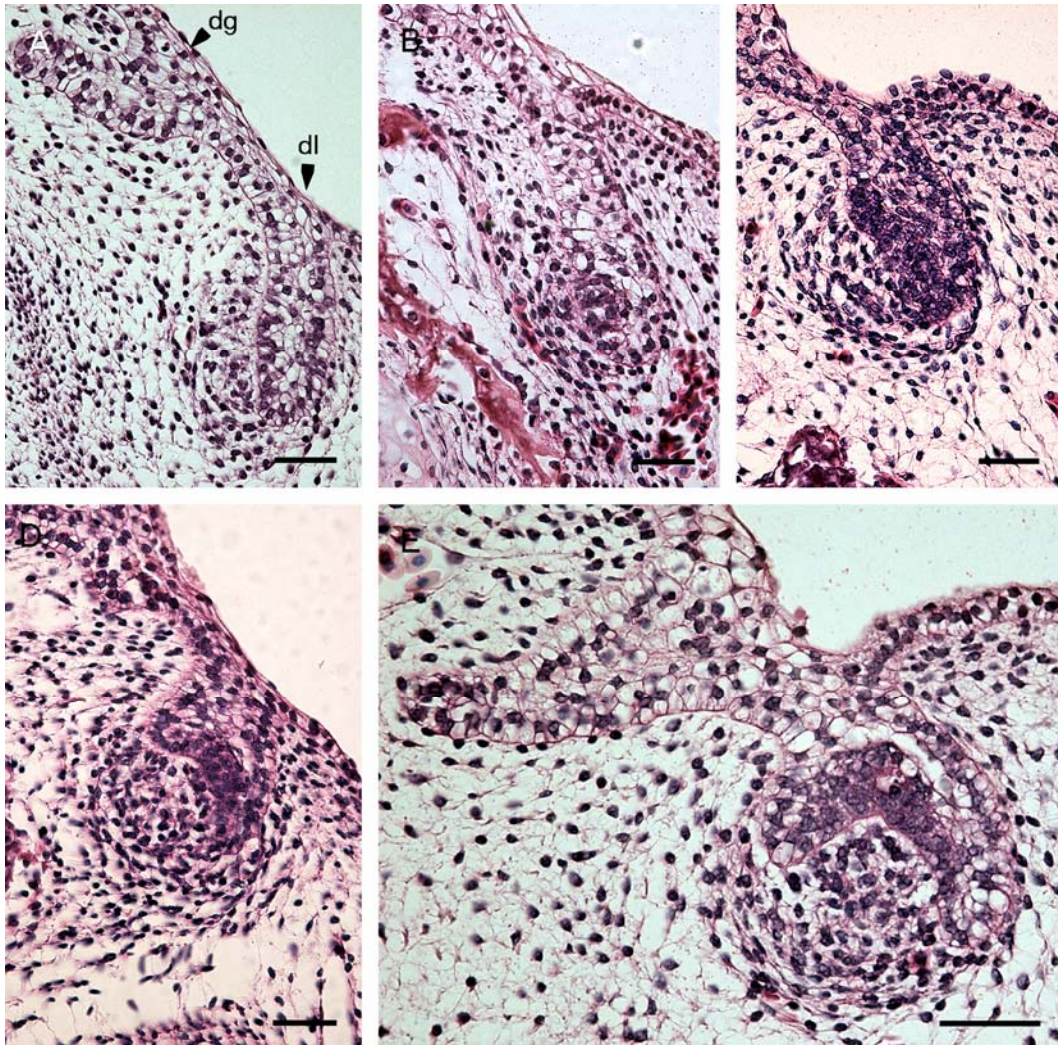
Obr. 1: Vývoj zubního uspořádání v průběhu embryogeneze A) v horní a B-D) dolní čelisti. A) Ze stupně mineralizace zubů ve stádium 38 je patrné že vaječný zub (ET) vzniká jako první. V oblasti maxilly pak vzniká první zub na zubní pozici 9 a druhý na pozici 7. B) Ve stádium 40 je patrné ze stupně mineralizace zubních zárodků časoprostorový sled zakládání zubů. C) Ze stupně mineralizace bočních zubních hrbolků (stádium 41) je zřejmé, že v pokročilé embryogenezi se zakládají nové zuby na distálním konci zubní řady. Mesiální a distální boční hrbolky mineralizují nezávisle na centrálním hrotu zubu. Posléze se však s ním spojují. D) Těsně před vylíhnutím jsou zuby akrodonálně připojeny k čelisti. Báze sousedních zubů jsou spojeny prostřednictvím cementu. Černá čísla zobrazují postup zakládání zubů v čase. Bílá a zelená čísla popisují pořadí zubních pozic v mesio-distálním směru. Velikost měřítka je 1mm.



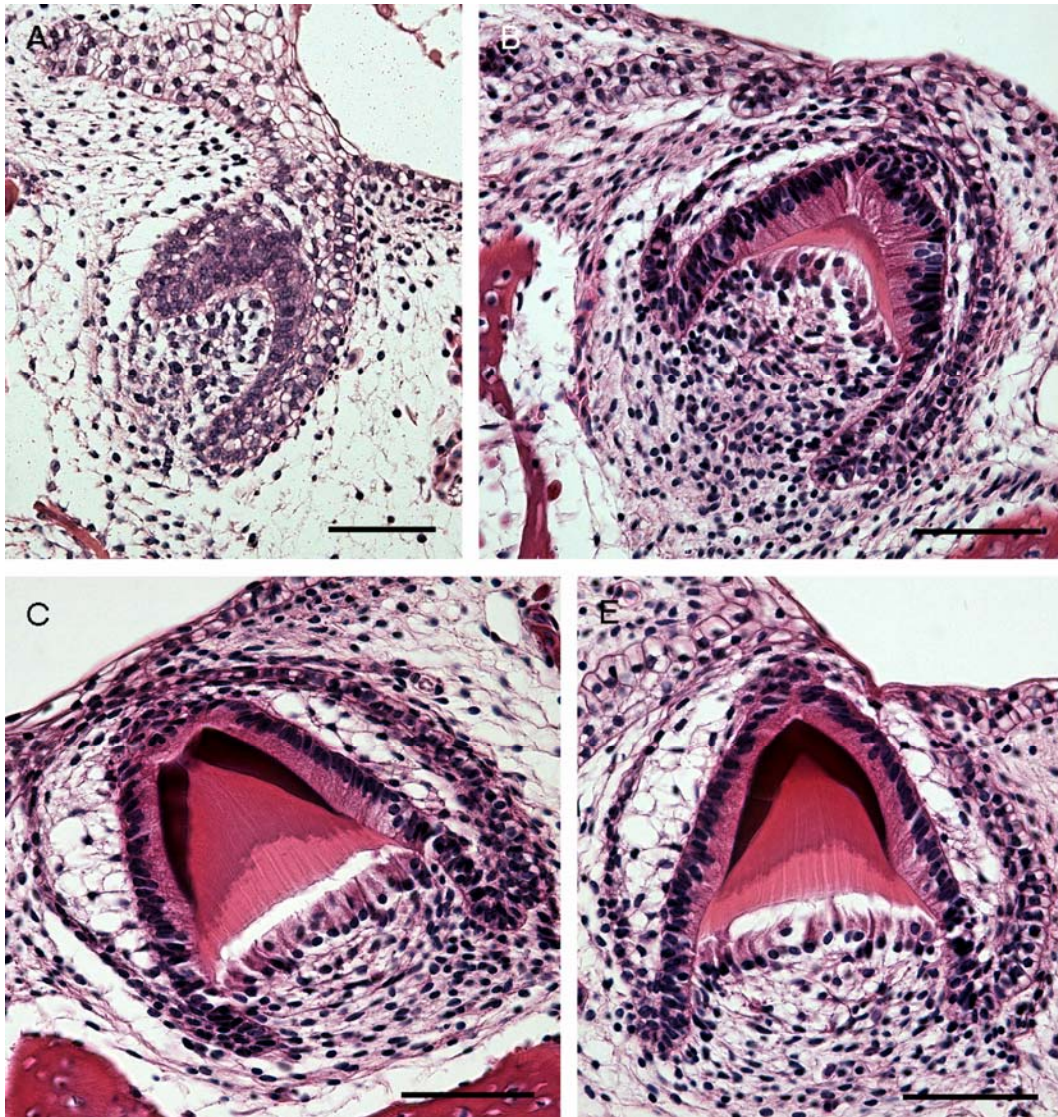
Obr. 2: Vývoj dentice po vylíhnutí jedince. A) Dentice dolní čelisti mladého jedince. B) Mesiální část dentice horní čelisti mladého jedince. C) Dentice dospělého jedince v horní čelisti a D) dentice v dolní čelisti je rozdělena na tři velikostně rozdílné skupiny zubů. V mesiální části dentice je patrný důsledek zubní abraze. Velikost měřítka je 1mm.



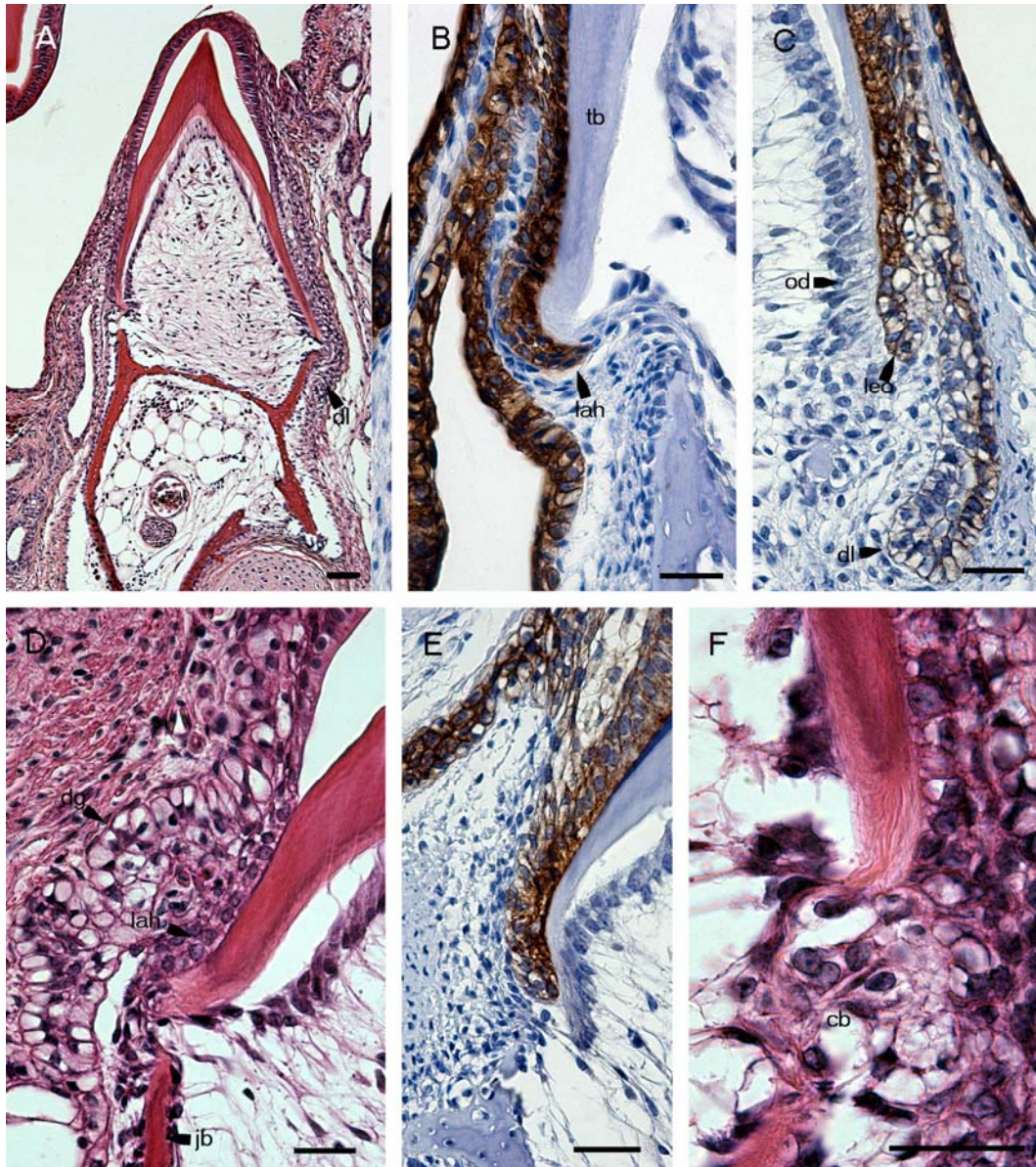
Obr. 3: Tvary zubů mineralizujících v průběhu embryogeneze. A) Premaxilární zuby jsou konické. Vaječný zub je poněkud zahnutý s bočními hranami. B-D) Všechny zuby v oblasti maxilly jsou labiolingválně zploštělé. Mohou být tvořeny centrálním hrotem rozšířeným na mesiální a distální straně, nebo centrálním hrotem a mesiálními a distálními bočními hrbolky. Velikost měřítka je 1mm.



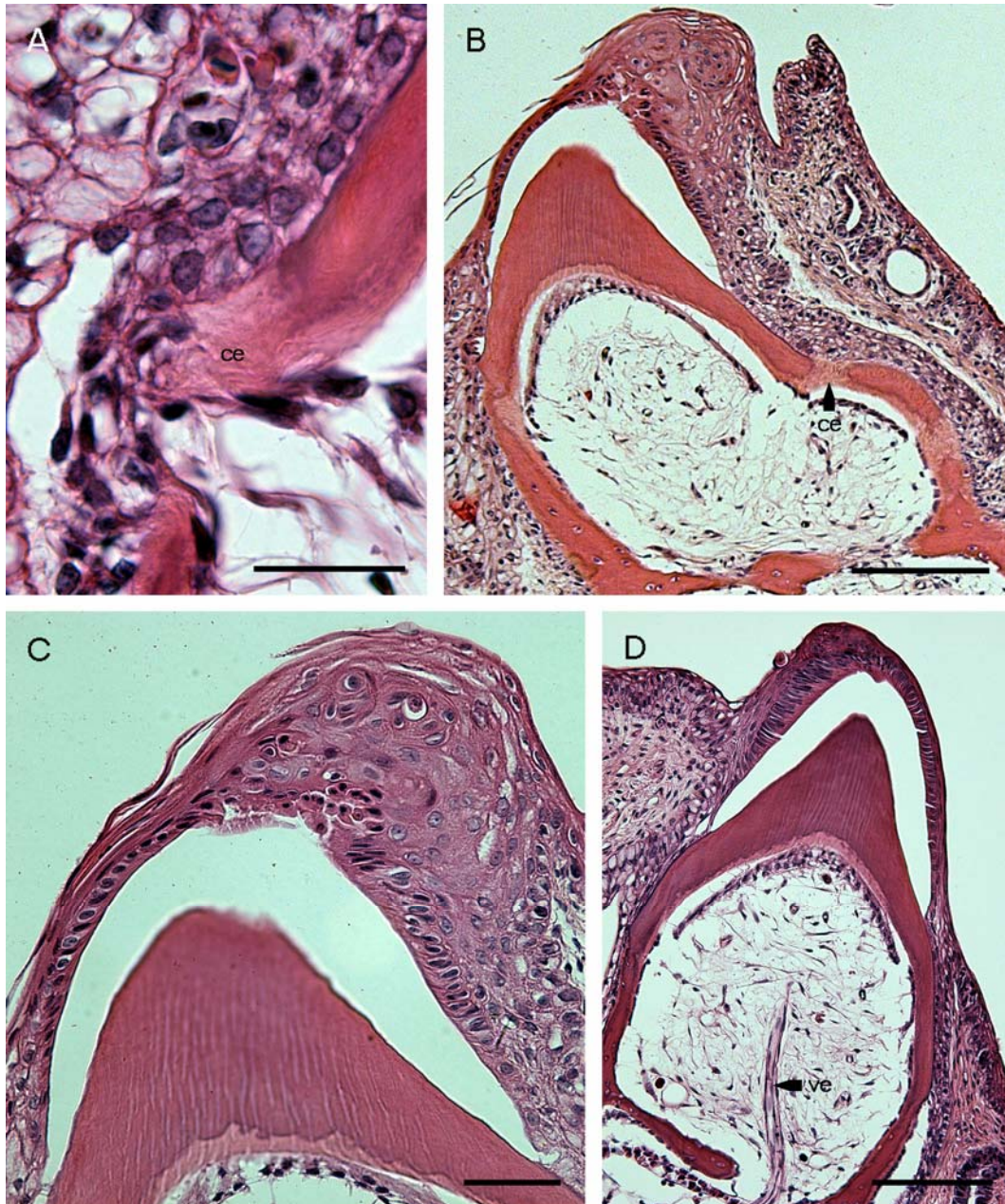
Obr. 4: Vývoj zubů: stádium před vznikem epiteliálního pupenu až stádium pohárku embryí stádií 37 a 39. A) Před vznikem epiteliálního pupenu je patrná ve stádiu 37 mezenchymatická kondenzace okolo zubní lišty v místě budoucího epiteliálního pupenu. V této době je diferencována zubní žláza vyrůstající ze stejného základu jako zubní lišta. Směr jejího růstu je labiálně. B) Ve stejné čelisti jsme také našli vytvořený epiteliální pupen. C) U stejného zubního zárodku ve stádiu 39 bylo patrné, že shluk buněk tvořený epiteliální pupen se rozrůstá centrifugálně a začíná se vytvářet sklovinný orgán. D-E) U stádia 37 jsme také našli vytvořené starší zubní zárodky ve D) velmi časném stádiu pohárku, v jehož centru sklovinného orgánu byl patrný shluk buněk, a E) v plně vyvinutém stádiu pohárku, kde jsme ve shluku buněk v centru sklovinného orgánu pozorovali první apoptotická tělíska. V tomto stádiu je patrný rozvoj středních vrstev sklovinného orgánu tvořených vrstvou buněk přilehlých k IDE a navazující vrstvou rozvíjejícího se hvězdicovitého retikula. Velikost měřítka je 0.5mm.



Obr. 5: Vývoj zubů: stádium zvonku a mineralizačního stádia. A) Ve stádiu 37 jsme pozorovali také zárodek zubu v mladším stádiu zvonku, kde byl patrný počátek diferenciace centrálních buněk IDE v ameloblasty. B) U staršího stádia 40 je patrné, že depozice dentinu začíná dříve než depozice skloviny. Hvězdčicovité retikulum bylo od tohoto stádia hypertrofované. Shluk buněk přilehlý k centrálním ameloblastům byl během mineralizace zubní korunky stále patrný. C) Tento shluk se nachází v prostoru mezi labiálním a linguálním hrbolkem. Zubní hrbolky jsou tvořeny odlišnou depozicí skloviny podobně jako u *P. picta*. D) Shluk buněk tvoří pruh, který přesahující oblast hrbolků a jde směrem mediálním i distálním. Velikost měřítka je 0,5mm.

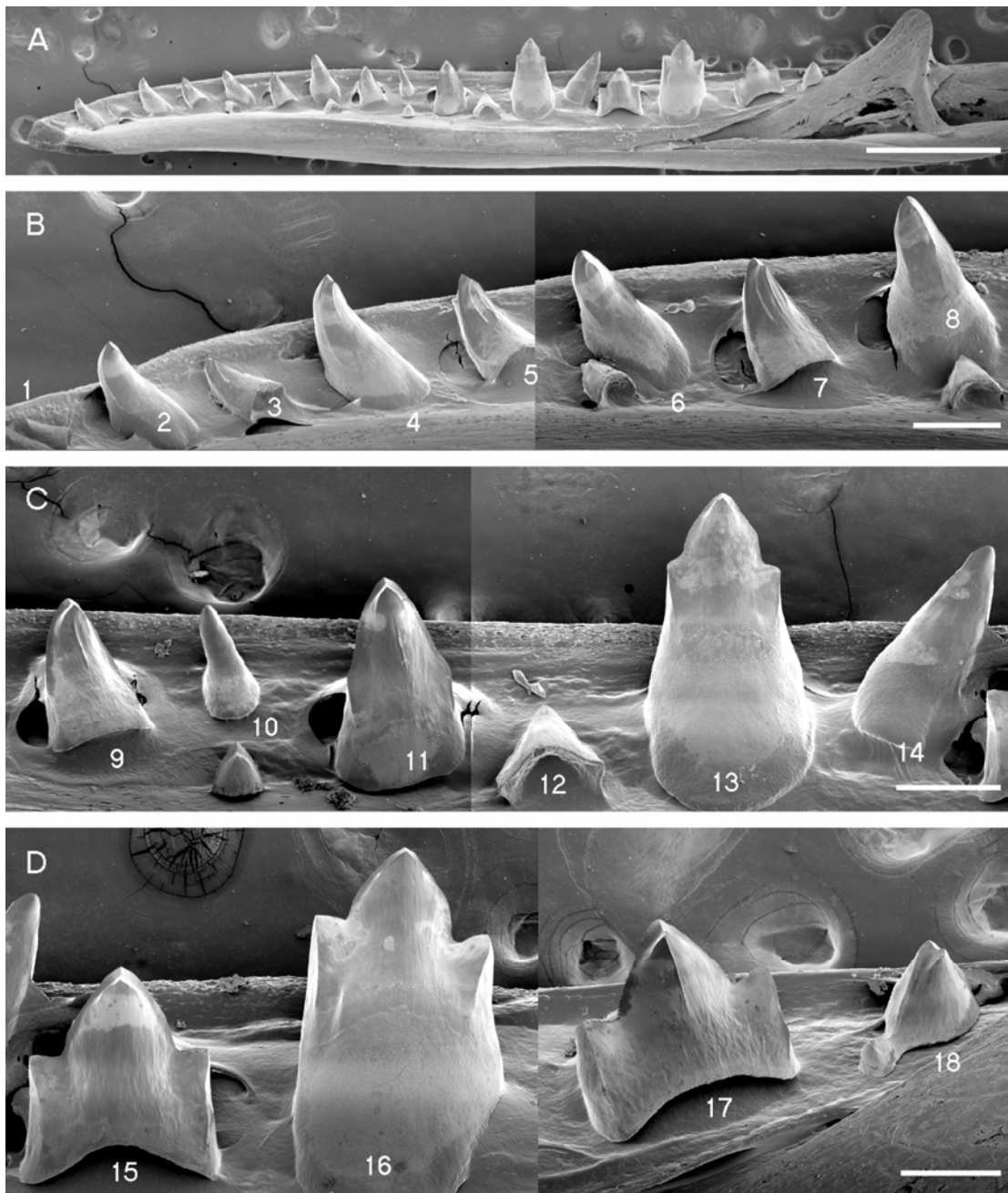


Obr. 6: Vývoj zubní báze a iniciace vzniku ankylózy. A-F) Zubní zárodky z dolní čelisti u embrya stádia 44. B-C, E) Přítomnost cytokeratinů zobrazených hnědou barvou označuje epiteliální část zubního zárodku, zubní lištu a zubní žlázu. A) V průběhu formování zubní báze prominuje proximální část sklovinného orgánu do dutiny ústní. Z linguální části ODE v oblasti zubní báze vyrůstá zubní lišta, která neprodukuje zubní zárodky nových generací. B) Na labiální straně sklovinného orgánu je patrná tvorba HERS (lah) v oblasti vyvíjející se zubní báze (tb). Ta může mít vyvinutou střední vrstvu složenou z jedné vrstvy buněk, nebo D) může být tvořena jen IDE a ODE. C) Linguální strana sklovinného orgánu (leo) v oblasti zubní báze je tvořena třemi vrstvami s rozvinutou střední vrstvou. Z této části sklovinného orgánu se vyvíjí zubní lišta (dl). E) Oblast distálního konce zubní báze, čelistní kosti a prostoru mezi nimi. Zubní báze není kryta sklovinou. K distálnímu okraji sklovinného orgánu přiléhá shluk diferencujících odontoblastů tvořících koncovou část zubní báze. F) Mezi zubní bází a čelistní kostí produkují cementoblasty (cb) cement. (dg) – zubní žláza, (jb) – čelistní kost, (od) – odontoblasty. Velikost měřítka je 0,05mm.

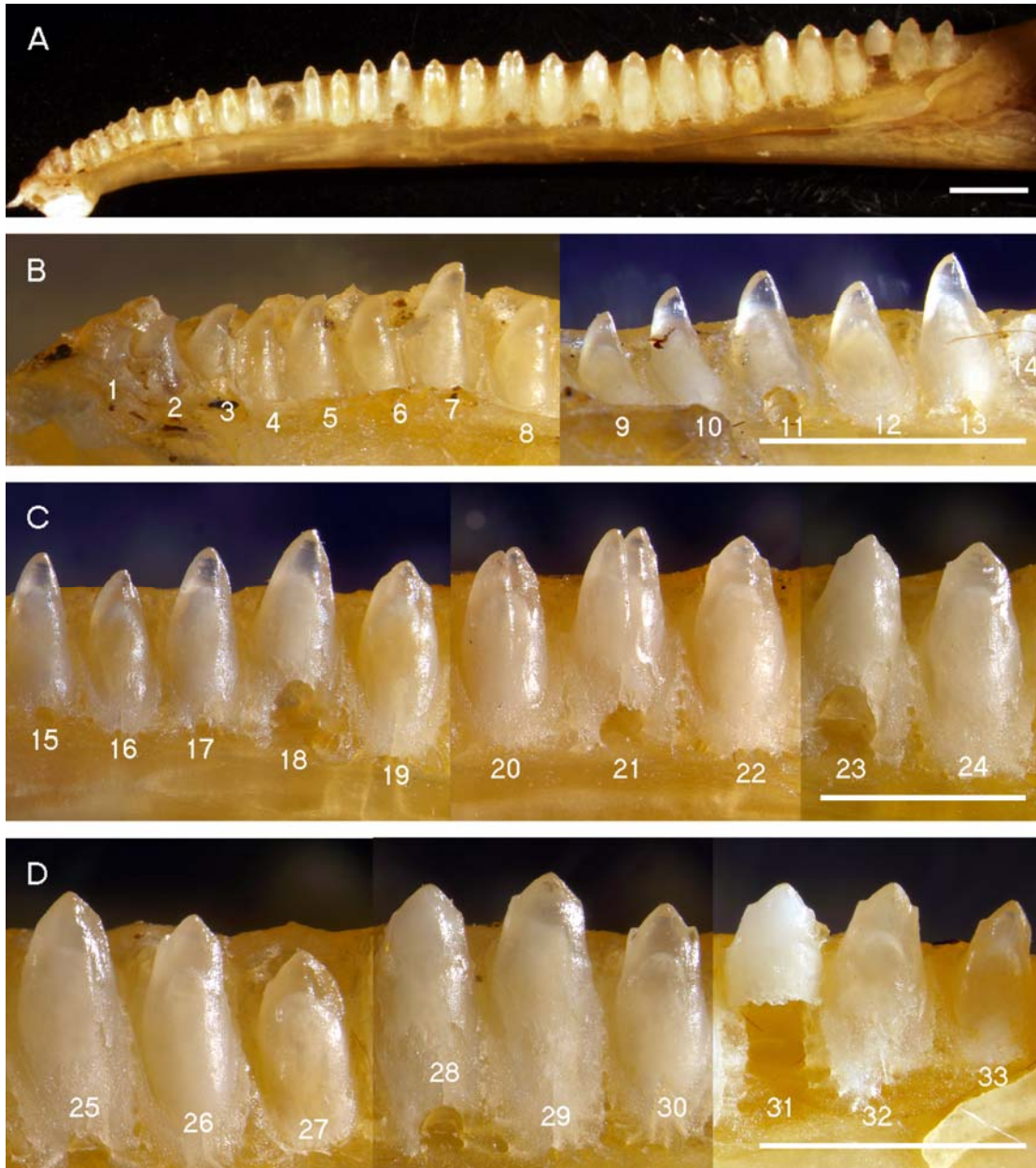


Obr. 7: Vývoj ankylózy a struktura sklovinného orgánu před zubní erupcí u embrya ve stádiu 43 a 44. A) Detail labiální strany HERS. B) Zubní bázi s čelistní kostí spojuje cement. Cement, který ještě není plně mineralizovaný je znázorněn světlejší lososovou barvou oproti růžovému dentinu a kosti. Rozhraní mezi dentinem, cementem a kostí je v tomto stádiu mineralizace tkání patrné. Cement také spojuje zubná báze sousedních zubů (ce) C-D) Od stádia 43 jsme pozorovali regresní vývoj sklovinného orgánu v oblasti zubní korunky. Buňky IDE se zmenšují, nejsou již polarizované. Další vrstvy sklovinného orgánu jsou tvořeny plochými buňkami. V linguální části sklovinného orgánu mesiálních zubů jsme pozorovali u těchto pozdních stádií velký shluk buněk. (ve) – cévy. Velikost měřítka je A,C) 0,05mm, B,D) 0,1mm.

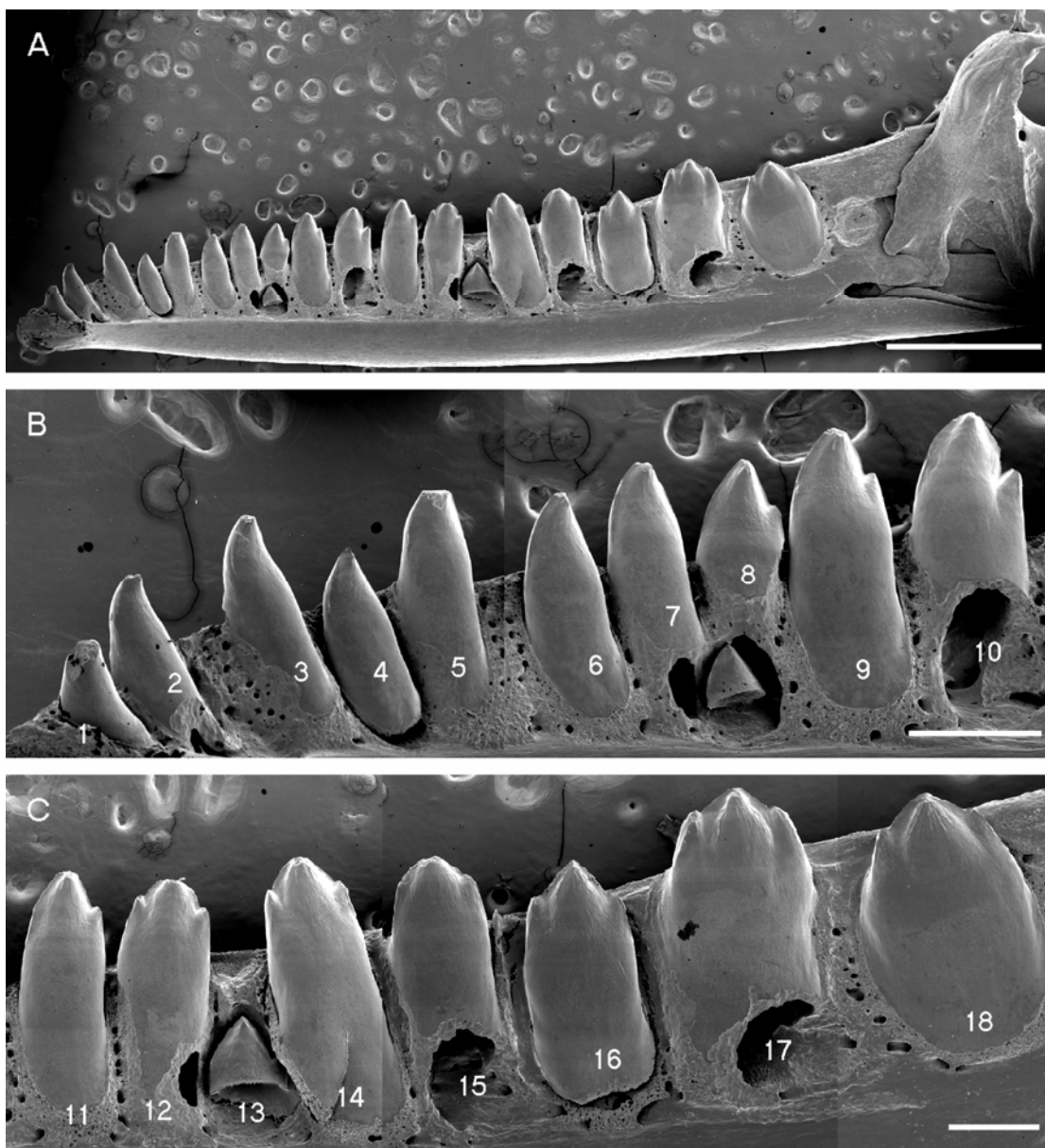
**Dentice chamaeleolisů: malakofágní adaptace, změny v dentici
v postnatálním vývoji**



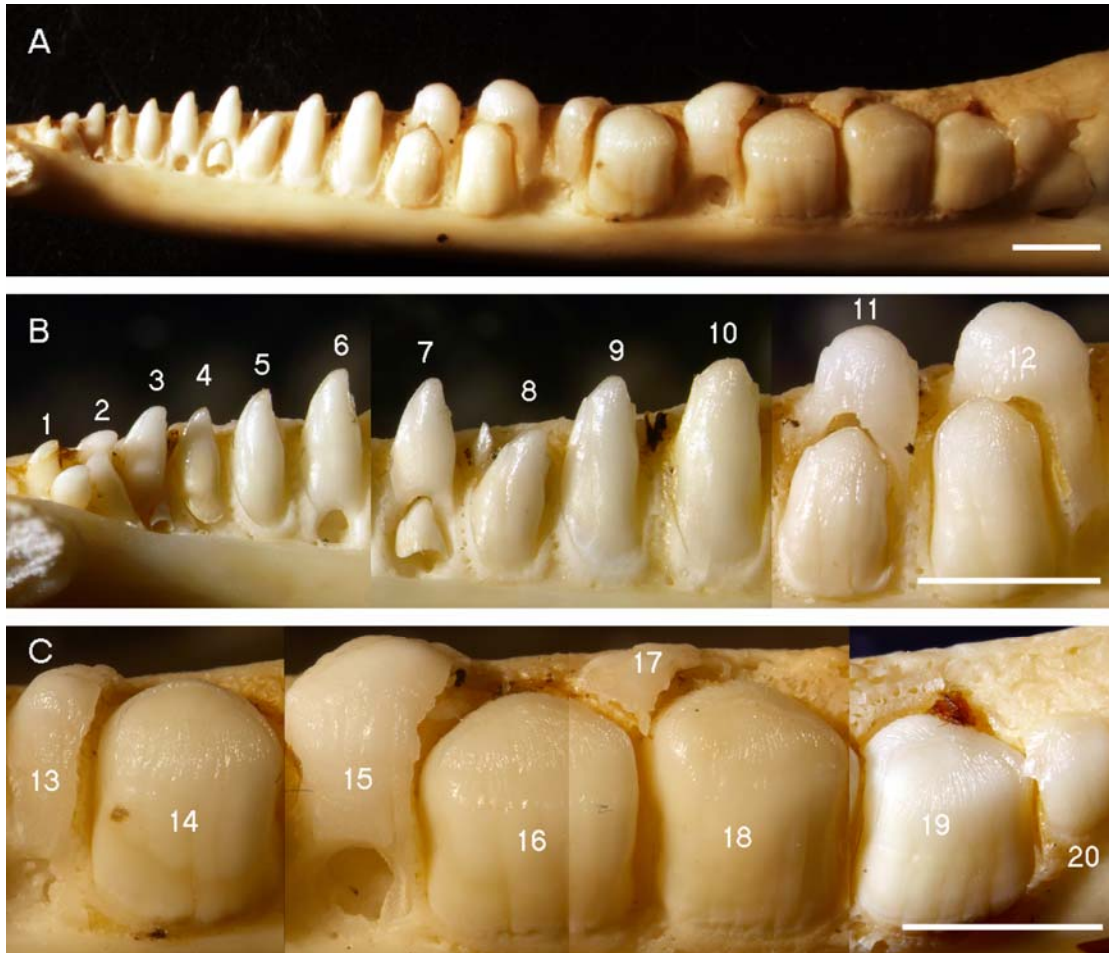
Obr. 1: Dentice v dolní čelisti embrya před vylíhnutím u *Anolis barahoea*. A) Zobrazuje celou dentici. B) V mesiální části se nachází konické zuby. C-D) V distální části čelisti jsou trikonodontní zuby. Čísla znázorňují zubní pozice v mesio-distálním směru. Velikost měřítka je A) 1mm, B-D) 0,2mm.



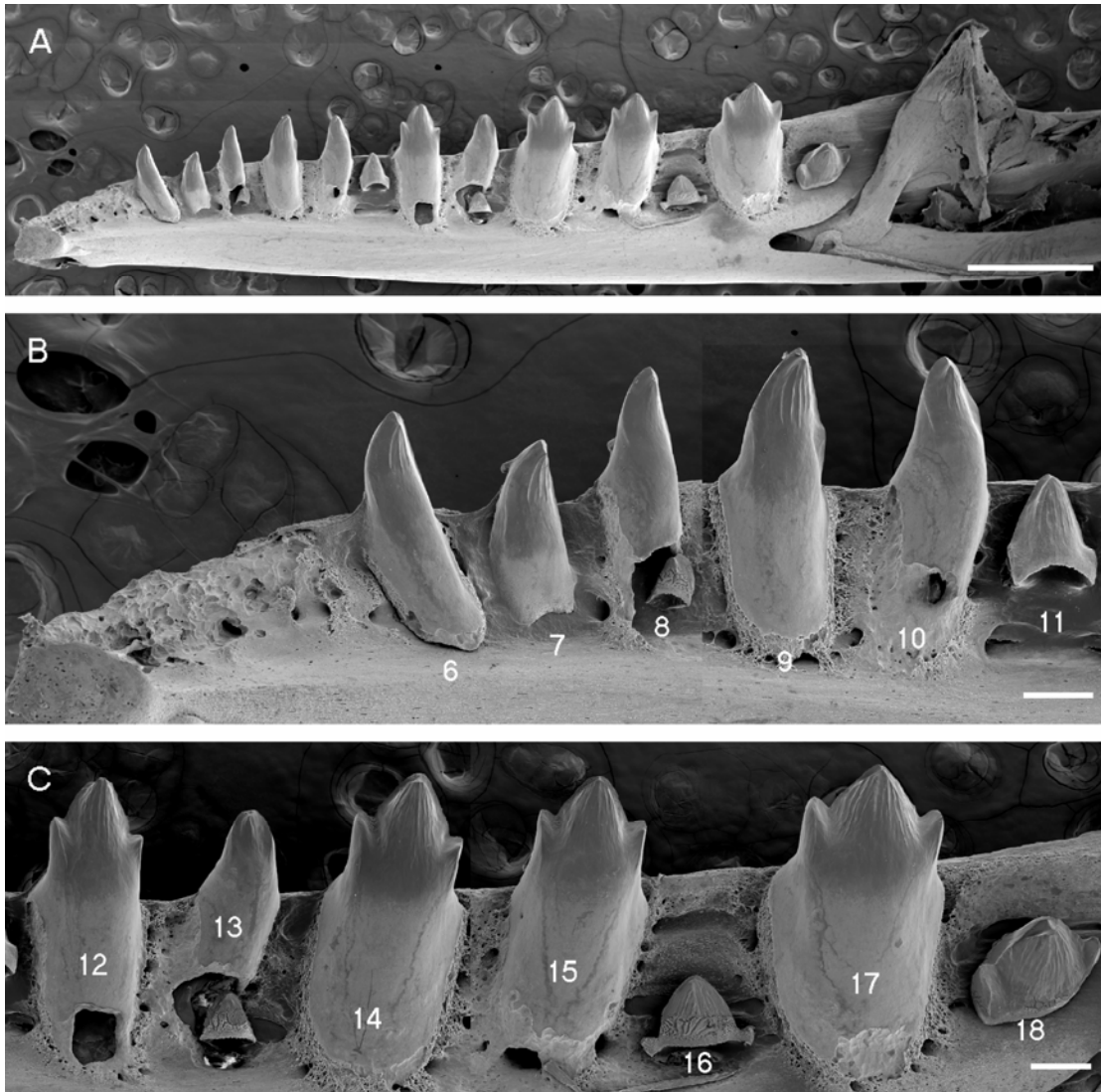
Obr. 2: Dentice v dolní čelisti dospělého jedince *Anolis barahoe*. A) Celkový pohled na dentici v dolní čelisti. B-C) V mesiální polovině dentice se nachází konické až cylindrokonické zuby. C) Ve střední části dentice jsou dva bikonodontní zuby s rovnocennými hroty. D) V distální části čelisti se nachází trikonodontní zuby. Čísla znázorňují zubní pozice v mesio-distálním směru. Velikost měřítka je 2mm.



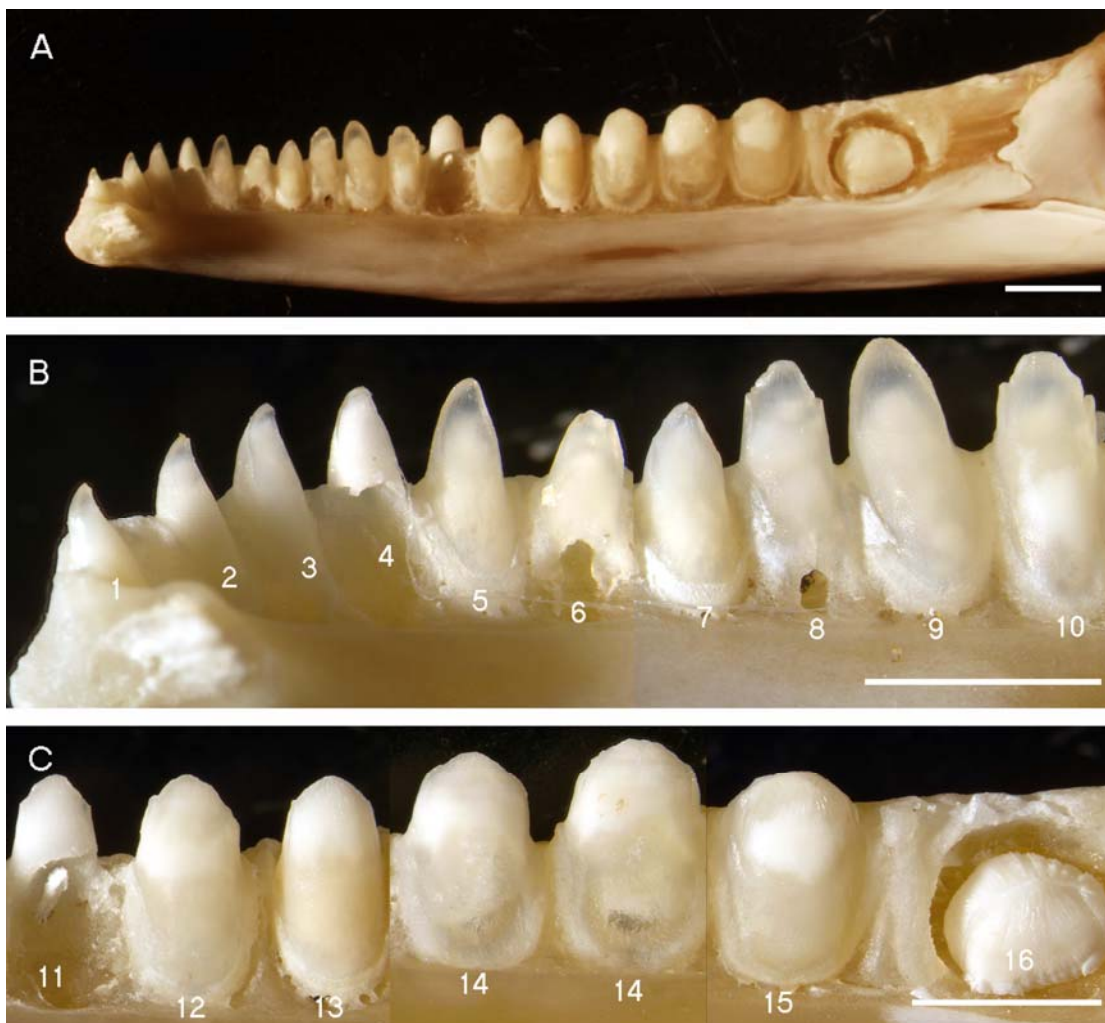
Obr. 3: Dentice dolní čelisti u embrya *Chamaeleolis barbatus*. A) Celkový pohled na dentici dolní čelisti, která jeví zřetelné známky adaptace k malakofagii. B) V mesiální části dentice se nachází cylindrické až cylindrokonické zuby následované bikonodontními zuby s menším distálním hrbolkem. C) V distální části dentice jsou mohutné trikonodontní zuby. Čísla znázorňují zubní pozice v mesio-distálním směru. Velikost měřítka je A) 2mm a B-C) 0,5mm.



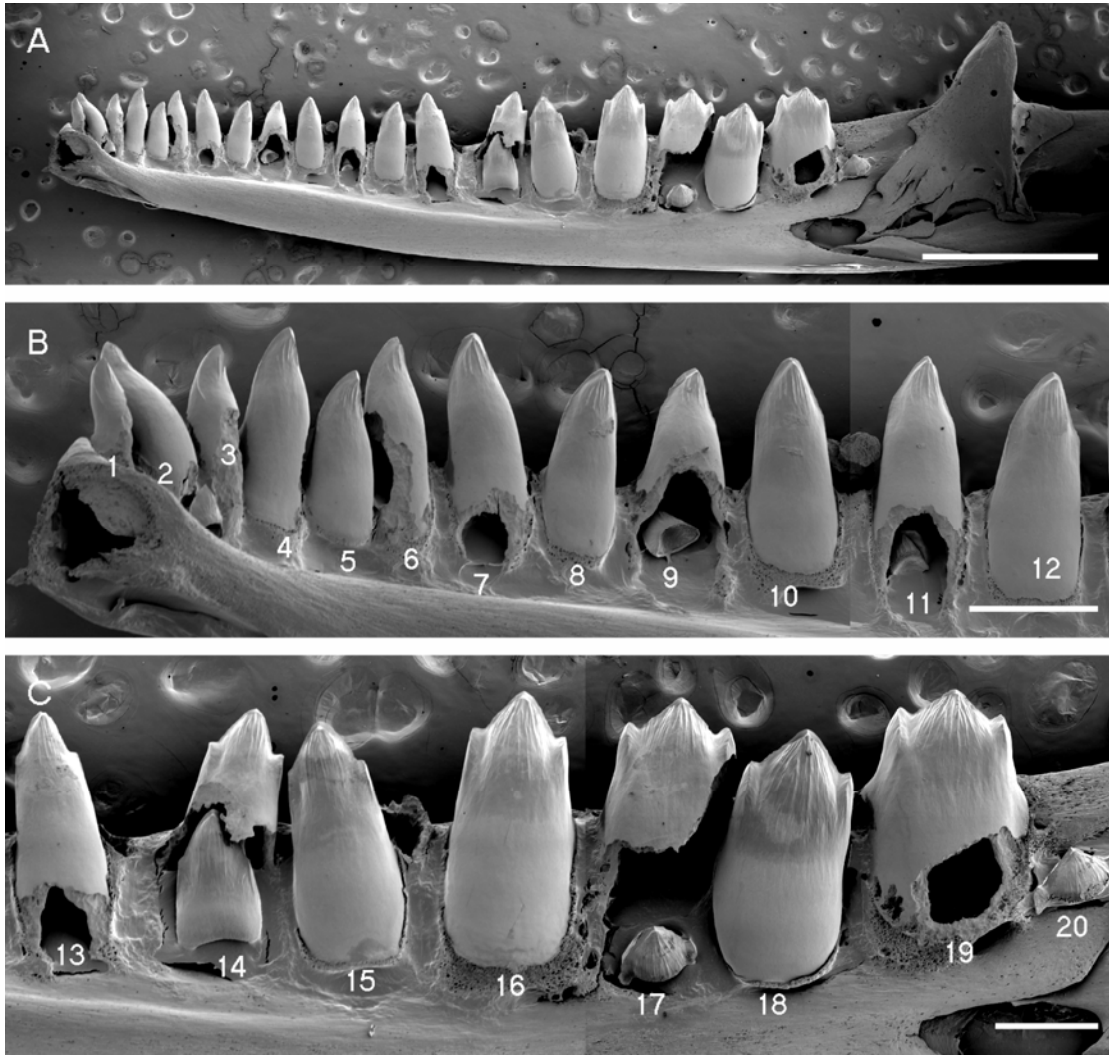
Obr. 4: Dentice v dolní čelisti dospělého jedince *Chamaeleolis barbatus*. A) Dentice vykazuje malakofágní přizpůsobení. B) V mesiální třetině čelisti se nacházejí konické až cylindro-konické zuby. B-C) Ve střední až distální části dentice jsou mohutné molariformní zuby se zaoblenou korunkou. Čísla znázorňují zubní pozice v mesio-distálním směru. Velikost měřítka je 2mm.



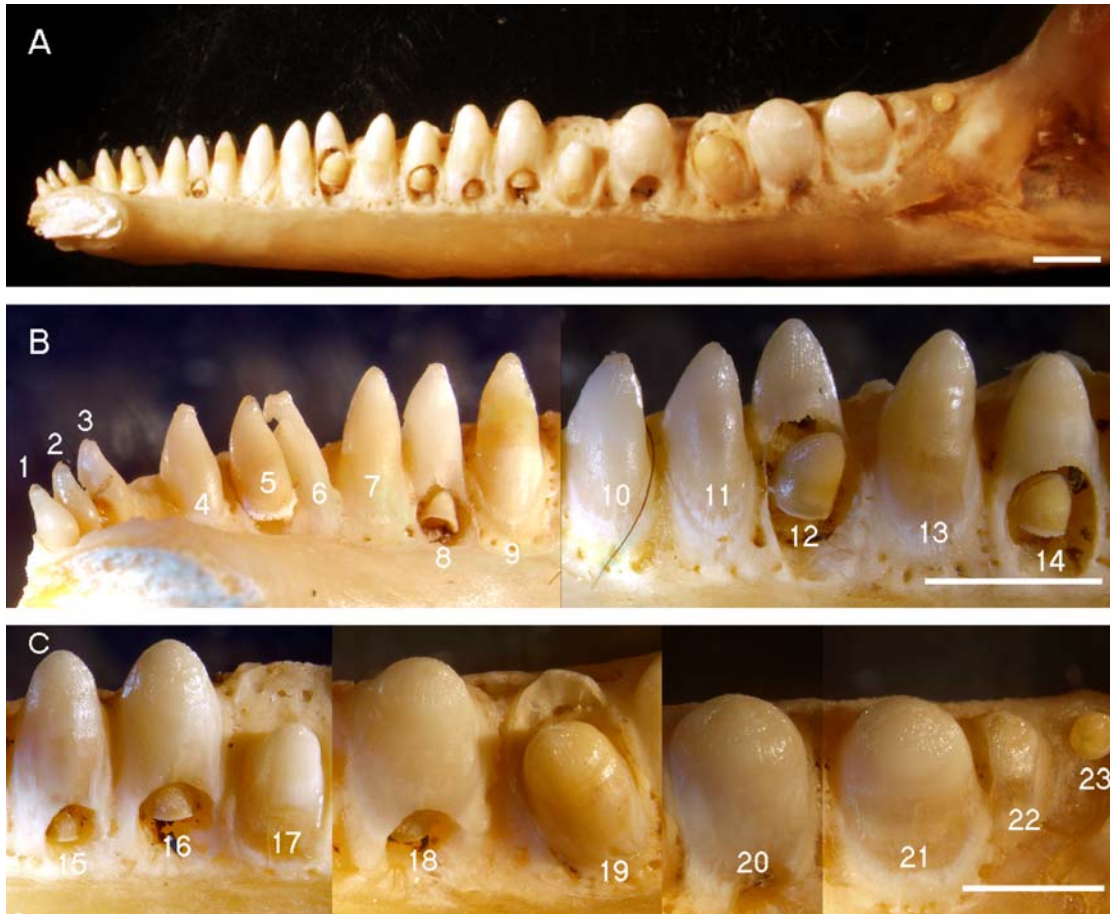
Obr. 5: Dentice v dolní čelisti *Chamaeleolis porcus* u embrya před vylíhnutím. A) Celkový pohled na dentice v dolní čelisti. B) V mesiální polovině dentice se nachází konické až cylindro-konické zuby. C) V distální části čelisti se nachází trikonodontní zuby. Čísla znázorňují zubní pozice v mesio-distálním směru. Velikost měřítka je A) 1mm a B-C) 0,2mm.



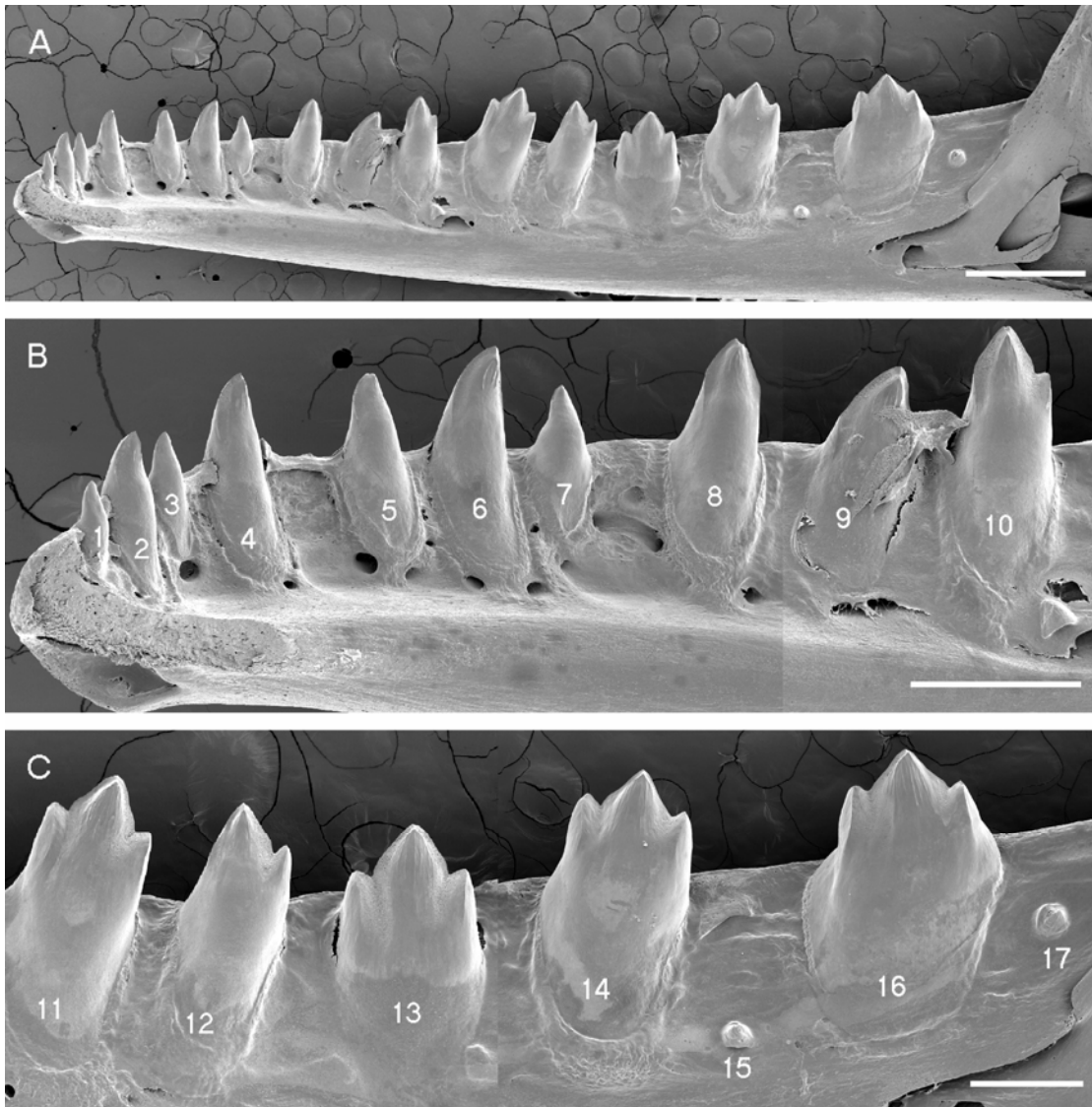
Obr. 6: Dentice v dolní čelisti dospělého jedince *Chamaeleolis porcus*. A) Celkový pohled na dentici dolní čelisti. B) V mesiální části dentice jsou konické až cylindro-konické zuby. C) V distální části dentice jsou molariformní zuby se zaoblenou zubní korunkou. Čísla znázorňují zubní pozice v mesio-distálním směru. Velikost měřítka je 2mm.



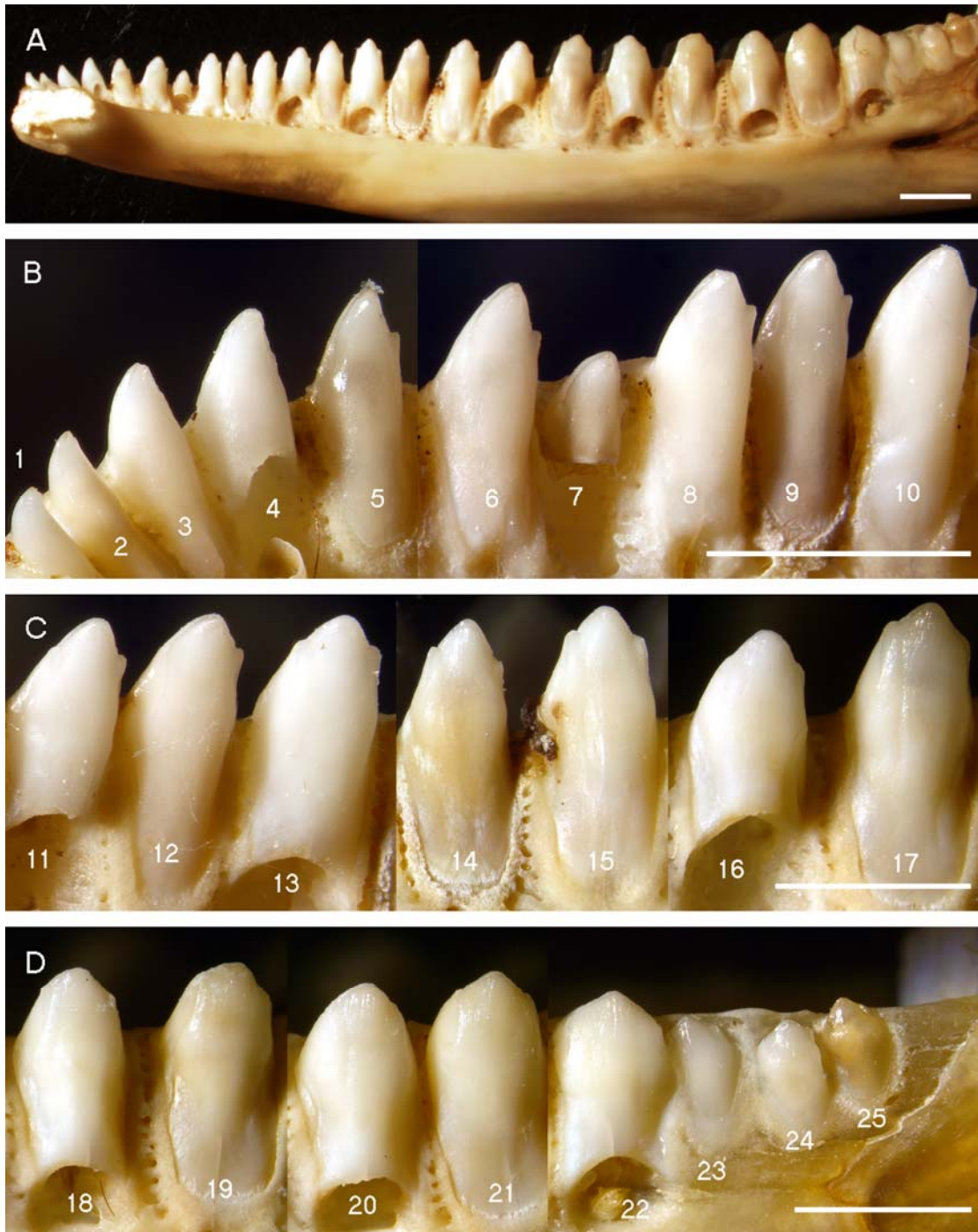
Obr. 7: Dentice v dolní čelisti *Chamaeleolis chamaeleonides* u embrya před vylíhnutím. A) Celkový pohled na dentici. B) V mesiální polovině čelisti jsou zuby cylindro-konické. C) V distální části čelisti jsou mohutné trikonodontní zuby, malakofágně přizpůsobené. Čísla znázorňují zubní pozice v mesio-distálním směru. Velikost měřítka je A) 2mm, B-C) 0,5mm.



Obr. 8: Dentice v dolní čelisti dospělého jedince *Chamaeleolis chamaeleonides*. A) Celkový pohled na dentici. B) V mesiální části dentice se nachází konické a cylindro-konické zuby. C) V distální části čelisti se nachází mohutné molariformní zuby. Číslo znázorňuje zubní pozice v mesio-distálním směru. Velikost měřítka je 0,2mm.

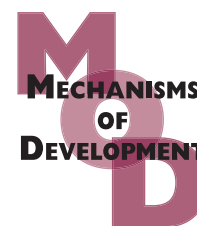


Obr. 9: Dentice v dolní čelisti embrya před vylíhnutím u *Chamaeleolis guamuhaya*. A) Celkový pohled na dentice. B) V mesiální polovině dentice se nachází převážně konické zuby. C) V distální části se nachází převážně trikonodontní zuby. Čísla znázorňují zubní pozice v mesio-distálním směru. Velikost měřítka je A) 1mm a B-C) 0,5mm.



Obr. 10: Dentice v dolní čelisti dospělého jedince *Chamaeleolis guamuhaya*. A) Celkový pohled na dentici. B) Zuby v mesiální části jsou konické až cylindrokonické. B-C) Ve střední části dentice jsou patrné malé mesiální a distální boční hrbolky. D) v distální části dentice jsou zuby rozšířené do stran bez bočních hrbolků. Čísla znázorňují zubní pozice v mesio-distálním směru. Velikost měřítka je 2mm.

**Vývoj jedových zubů a kanálku pro vedení jedu u
chřestýšovce *Cryptelytrops albolabris*: role *Shh*, apoptózy a
buněčné proliferace**

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/modo

Viperous fangs: Development and evolution of the venom canal

Oldrich Zahradnicek^b, Ivan Horacek^b, Abigail S Tucker^{a,*}

^aDepartment of Craniofacial Development and Orthodontics, Floor 27 Guy's Tower, Guy's Hospital, King's College London, London Bridge, London SE1 9RT, UK

^bDepartment of Zoology, Faculty of Science, Charles University, Prague, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 March 2008

Received in revised form

3 June 2008

Accepted 17 June 2008

Available online 24 June 2008

Keywords:

Snake

Shh

Venom canal

Infolding

Apoptosis

Proliferation

ABSTRACT

Fangs are specialised long teeth that contain either a superficial groove (Gila monster, Beaded lizard, some colubrid snakes), along which the venom runs, or an enclosed canal (viperid, elapid and atractaspid), down which the venom flows inside the tooth. The fangs of viperid snakes are the most effective venom-delivery structures among vertebrates and have been the focus of scientific interests for more than 200 years. Despite this interest the questions of how the canal at the centre of the fang forms remains unresolved. Two different hypotheses have been suggested. The mainstream hypothesis claims that the venom-conducting canal develops by the invagination of the epithelial wall of the developing tooth germ. The sides of this invagination make contact and finally fuse to form the enclosed canal. The second hypothesis, known as the “brick chimney”, claims the venom-conducting canal develops directly by successive dentine deposition as the tooth develops. The fang is thus built up from the tip to the base, without any folding of the tooth surface. In an attempt to cast further light on this subject the early development of the fangs was followed in a pit viper, *Trimeresurus albolabris*, using the expression of *Sonic hedgehog* (*Shh*). We demonstrate that the canal is indeed formed by an early folding event, resulting from an invagination of epithelial cells into the dental mesenchyme. The epithelial cells proliferate to enlarge the canal and then the cells die by apoptosis, forming an empty tube through which the poison runs. The entrance and discharge orifices at either end of the canal develop by a similar invagination but the initial width of the invagination is very different from that in the middle of the tooth, and is associated with higher proliferation. The two sides of the invaginating epithelium never come into contact, leaving the orifice open. The mechanism by which the orifices form can be likened to that observed in reptiles with an open groove along their fangs, such as the boomslang. It is thus tempting to speculate that the process of orifice formation in viperids represents the ancestral pleisomorphic state, and that enclosed canals developed by a change in the shape and size of the initial invagination.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The venom-delivery system, based on the production of toxic proteins by oral glands, is thought to have evolved only

once during reptile evolution, in the clade Toxicofera, consisting of snakes, anguimorph lizards and iguanians (Fry et al., 2006). Snake venom is produced by specialised venom glands located in the upper jaw and is associated with fangs. Fangs

* Corresponding author. Tel.: +44 2071887384/9; fax: +44 2071881764.

E-mail address: Abigail.tucker@kcl.ac.uk (A.S Tucker).

0925-4773/\$ - see front matter © 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.mod.2008.06.008

are specialised long teeth that contain either a superficial groove, along which the venom runs, or an enclosed canal, down which the venom flows inside the tooth, and are located on the maxilla (Edmund, 1969). In extant Toxicofera, teeth with a groove are present in helodermatids (anguimorpha) such as the Gila monster and Beaded lizard, and in some colubrid snakes. Such grooves can be associated with both front and rear fanged snakes (Boulenger, 1896, 1915; Kardong, 1980). Fangs with internal canals are present in viperid, elapid and atractaspid snakes and represent the pinnacle of venom injection (Kochva, 1978; Bogert, 1943; Kochva and Meier, 1986). In venomous colubrids and elapids the poison fang is attached to a fixed maxillary bone, so that it is always erect. In viperid snakes (Viperinae and Crotalinae), where the poison fangs are the only teeth attached to the maxilla, the maxilla is capable of rotating. This allows the fang to be erected in the event of an attack, or laid parallel to the jaw when in the relaxed state (Tomes, 1876; Kardong, 1974). A similar complex of rotating maxilla with firmly attached fang is also present in atractaspids (Kochva, 1987; Underwood and Kochva, 1993; Deufel and Cundall 2003).

We have focused our study on viperids in which the complex of movable maxilla and elongated fangs have no match in sophistication and efficiency among poisonous snakes. The viperid front fang was described in detail by Klauber (1939, 1956) using *Crotalus* sp. and *Sistrurus* sp. (rattlesnakes). The fang contains a central canal for venom conduction. This canal communicates with the outside through two orifices that are situated on the ventral tooth side. The entrance orifice develops at the fang's base and is connected with the venom duct of the venom gland. The discharge orifice is situated at the apex of the fang and its function is to inject venom into prey. In viperids, the surface of the fang on the anterior side, in between the entrance and discharge orifice, is smooth. In contrast, in elapids and atractaspids an anterior suture line connects the two orifices, although the venom canal is still enclosed (Bogert, 1943; Kochva and Meier, 1986; Jackson, 2002, 2007).

The fangs of poisonous snakes have fascinated scientists since the 19th century and it is, therefore, surprising that questions about their evolution and development still remain unresolved. So far all research on fangs has been limited to histology or SEM microscopy, with no molecular data available. From such data two hypotheses have arisen to explain the formation of the venom-conducting canal. The first theory, and the one that appears in most text-books on the subject, claims the venom-conducting canal forms through the infolding of the epithelial part of the fang surface (Tomes, 1876; Kochva, 1963; Edmund, 1969; Haas, 1980; Lake and Trevor-Jones, 1987, 1995). According to this theory, the first sign of canal development is the formation of a groove along the developing fang. This groove is successively deepened and finally the lateral sides of the groove fuse, creating a central canal. The suture line present on the fangs of Elapids and Atractaspidids was thought to provide evidence for such a process. This theory briefly explains the transition from fangs with simple grooves to enclosed fangs with suture line, to the smooth surface between orifices observed in viperids. The second hypothesis is known as the "brick chimney" (Bogert, 1943). This theory claims that the venom-conducting canal

is formed directly, in a similar manner to building a chimney, by the deposition of dentine to the end of the developing fang, as it forms from the tip to the base (Klauber, 1939, 1956; Bogert, 1943).

These two hypotheses were recently tested by a comparison of fang development in viperids and elapids (Jackson, 2002). This study, based on SEM, measured the discharge orifice in *Bitis arietans* (Viperidae) and *Naja melanoleuca* (Elapidae) in the adult and during embryonic development. In all specimens examined, and in both species, the fangs developed by the addition of material to their base, with no folding inwards of an ungrooved tooth (Jackson, 2002). This data therefore support the "brick chimney" hypothesis. Previous papers supporting the infolding theory were predicted to be based on a misinterpretation of histology sections, due to sectioning through the orifices, rather than the main fang (Jackson, 2002). As pointed out by Jackson, however, evidence for the brick chimney hypothesis is restricted to visualising mineralised tissue and infolding might occur at an earlier stage.

To further address this question, we have turned to molecular biology and investigated the expression of *Sonic hedgehog* (*Shh*) in developing fangs of the asian pit viper, *Trimeresurus albolabris*. The presence of multiple sets of replacement fangs allows for a temporal sequence of fang development to be viewed in one specimen. The dynamics expression pattern of *Shh* can therefore be viewed as the fangs develop. We have focused on the venom-conducting canal of viperids due to their basal phylogenetic position relative to other snakes with venom-delivering teeth (Vidal et al., 2007).

Sonic hedgehog plays a crucial role during development of a number of parts of the embryo, including the tooth (reviewed in Chuong et al., 2000). In the mouse tooth, its expression is highly restricted to epithelial cells of the developing tooth germ, from thickening of the dental epithelium to expression in the developing ameloblasts (Bitgood and McMahon, 1995; Koyama et al., 1996). *In vitro* evidence has indicated that *Shh* has a mitogenic function and may be responsible for the localised proliferation observed at sites of dental development (Cobourne et al., 2001). In keeping with this, addition of *Shh* protein at early stages of development, can lead to the formation of ectopic tooth buds (Hardcastle et al., 1998), and loss of *Shh* leads to an arrest of tooth bud development at the thickening stage (Cobourne et al., 2001). *Shh* also plays a later role in epithelial cell survival, and is one of the signalling factors, expressed in the enamel knot (Vaahtokari et al., 1996; Cobourne et al., 2001). Conditional loss of *Shh* signalling in the developing tooth leads to loss of polarity and organisation of the ameloblasts, and underlying odontoblasts, indicating a central later role in development of the inner enamel epithelium and its neighbouring tissue (Dassule et al., 2000). This knowledge thus provides a strong background for the examination of developing dental structures in a non-model vertebrate species. The expression of *Shh* has been recently described in a non-venomous snake, the python, and closely matches the expression of *Shh* in the mouse, with expression restricted to the epithelial tissues of the tooth at all stages investigated (Buchtova et al., 2008). At the cap and bell stage *Shh* is expressed in the python inner enamel epithelium and stellate reticulum-like cells of the tooth. We have therefore used this detailed expression pattern to compare the expres-

sion of *Shh* in normal snake teeth of the lower jaw with its expression in developing fangs, and have uncovered evidence supporting the infolding theory of canal formation.

2. Results

2.1. The morphology of the fully formed fang

The fully formed front fangs of *T. albolabris* are long and conical with a curved shape and when relaxed are found tucked into the upper jaw (Fig. 1A). The outer tooth encapsulates the mineralised venom-conducting canal that passes through the fang from its base and terminates slightly before the fang's tip. The ends of the venom-conducting canal are in contact with the outside through two orifices that are situated on the ventral side of the fang. The entrance orifice, which connects with the poison gland duct, is situated at the tooth base and the discharge orifice, which injects poison into the prey, is situated under the tooth tip. The fang surface in between these orifices is smooth, without any evidence of a connecting suture line, which might indicate that infolding

of the tooth had occurred (Fig. 1B–D). Eight calcified fangs are visible in one half of the upper jaw each at a different stage of development (Fig. 1E). Only one tooth is functional and ankylosed firmly to the maxilla (Fig. 1E and F). The seven remaining form a replacement series. As has been previously reported by SEMs, mineralization occurs from tip to base, with the discharge orifice emerging already formed as the mineralised layer is laid down (Fig. 1E) (Jackson, 2002, 2007). In sections, it is clear that the venom-conducting canal does not sit freely within the fang papilla, but is found towards the ventral side of the fang, anchored to the outer layer by a line of dentine (Fig. 2A and B). This connection has a lamellar-like character and is composed of two fused dentine layers. This fusion is clearly visible in section as a suture that runs perpendicular to the fang wall (Fig. 2C). The depth and width of this lamella is not constant along the length of the tooth. In the area immediately bordering the orifices it reduces in size, ultimately leaving the canal abutting the fang wall (Fig. 2D). In the oldest fang in the series the canal is empty (Fig. 2A and B), but in the replacement fangs the central canal is full of cells (Fig. 2D).

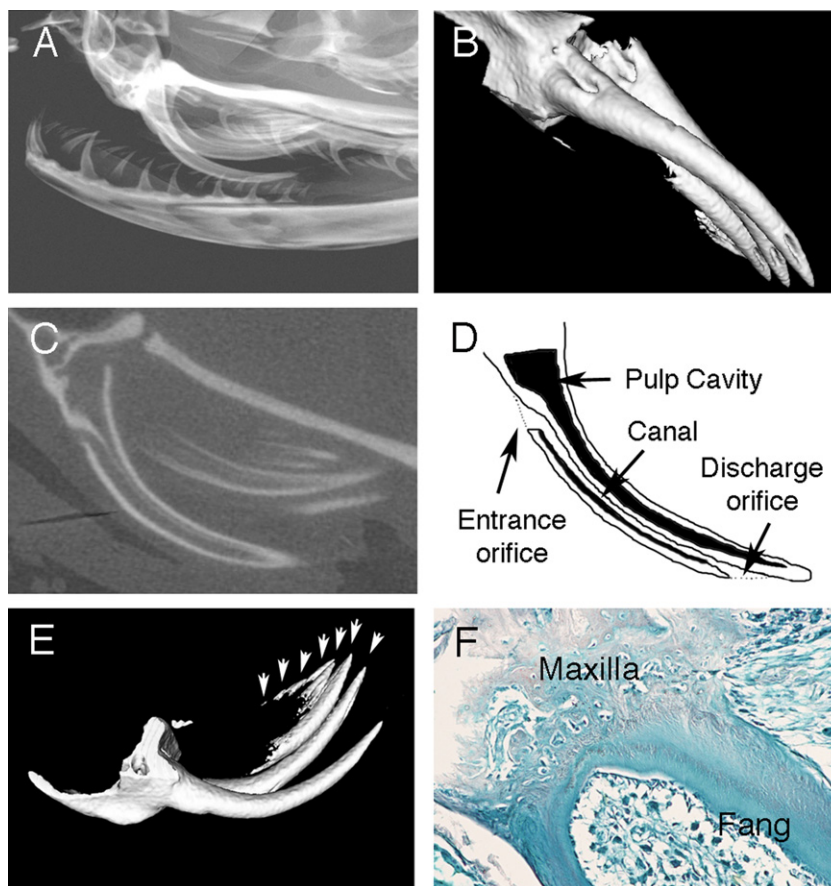


Fig. 1 – Morphology of the fully formed fang. (A) Faxitron X-ray image of half snake head showing the functional fang and replacement series tucked into the upper jaw. (B) MicroCT image. The fangs contain an entrance and discharge orifice into which the venom enters and leaves the fang. Between these two sites the fang surface is smooth with no evidence of a suture line. (C) MicroCT section through the fang highlights the walls of the central canal connected to the entrance orifice (the discharge orifice is out of the plane of section). (D) Schematic of fang section indicating pulp cavity, canal and orifices. (E) MicroCT image showing the functional fang ankylosed to the maxillary bone, and series of replacement fangs (indicated by arrows). The fangs emerge from the tip to the base. (F) Histology section through the base of the functional fang. The fang is firmly ankylosed to the bone.

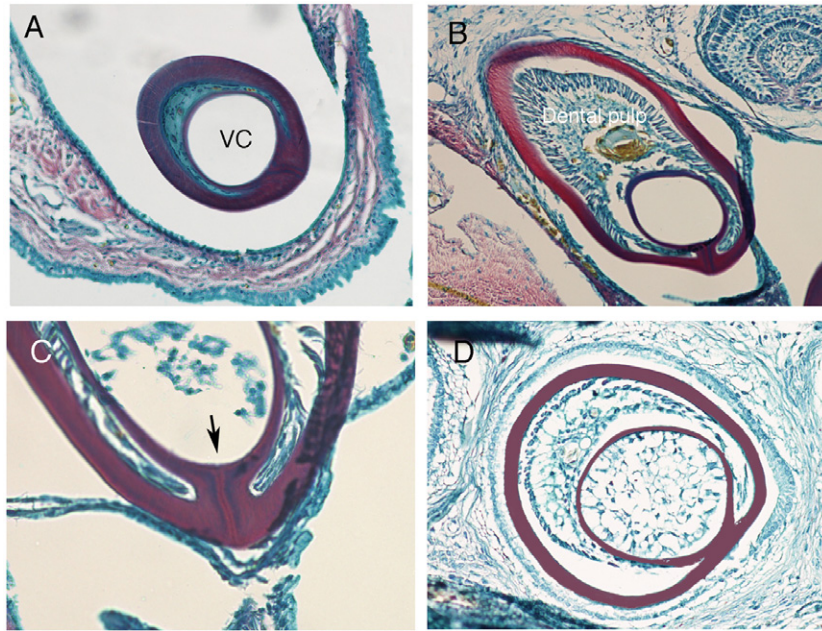


Fig. 2 – Histology of the fully formed canal. (A–D) Trichrome stained frontal sections. Dentine stains as red/purple. (A) The venom canal (VC) is attached to the outer fang by a double layer of dentine. The canal itself is hollow. Section shown is taken near the tip of the fang. (B) Closer to the base of the fang the canal is positioned near to the ventral side of the tooth, and the dental pulp is more obvious. (C) At high power a suture line is visible running between two layers of dentine. (D) Replacement fang near to the orifice. The canal lies right up against the wall of the fang.

2.2. From cap to late bell: the pattern of *Shh* expression

The first stages of fang development are very similar to that of the rest of the dentition, following the progression of thickening, bud, cap and bell stage (as described in the python (Buchtova et al., 2007). During the cap stage three morphologically and functionally different layers are visible in the oral epithelium (enamel organ): the inner enamel epithelium (IEE), the outer enamel epithelium (OEE) and an intermediate layer in between which has been likened to the stellate reticulum (Buchtova et al., 2007, 2008). The IEE and OEE connect at the developing cervical loops that grow down around and enclose the dental papilla. The cells of the IEE express *Shh* at the late cap stage. This *Shh* expression is initially weak and observed only in the top of the tooth germ, which will form the tip of the developing fang (Fig. 3A). During the early bell stage the IEE cells start to differentiate into ameloblasts in a tip to base direction. The expression of *Shh* follows this wave of differentiation, with high levels of *Shh* associated with the differentiating cells (Fig. 3B). *Shh* expression thus spreads from the tip of the tooth, progressing towards the base as the cells start differentiating. During the bell stage the layer in between the IEE and OEE becomes more prominent and has a more obvious reticular structure. As the cells start to terminally differentiate and produce mineralised tissue, *Shh* expression is lost, with *Shh* seen to retreat from the tip as it extends laterally along the growing tooth (Fig. 3C and D). The cells of the cervical loop at the base of the tooth, however, remain in an undifferentiated state and do not express *Shh*. A similar dynamic pattern of *Shh* as the IEE starts to differentiate and produce enamel is observed in the developing mandibular and palatal teeth (Fig. 3E–H). At this point, however,

the two tooth types diverge, the mandibular and palatal teeth become ankylosed to their respective bones, while in the fangs canal formation starts.

2.3. Infolding of the inner enamel epithelium (IEE)

The first sign of venom-conducting canal formation is the invagination of the IEE into the mesenchyme of the dental papilla, viewed in sagittal (Fig. 4A and B) and frontal section (Fig. 4C). This invagination starts on the ventral side of the fang near the cervical loop area and stops at the point when the fang IEE starts differentiating into ameloblasts. This invagination is observed at different positions along the fang and is therefore not an artefact of sectioning only through the orifices. The invaginating IEE cells move deeper into the dental mesenchyme and form a loop of cells (Fig. 4D). Hand in hand with this looping of the IEE the reticulate intermediate layer of epithelial cells also invaginates into the fang papilla and fills the space inside the IEE loop. As the loop forms the mesenchymal papilla cells adjacent to the invaginating IEE cells and the outer IEE cells start to line up around the loop and take on the rod-like morphology of odontoblasts (Fig. 4E). This is first visible on the ventral side of the fang, the dental mesenchyme remaining undifferentiated on the dorsal side. As the tooth develops the two sides of the IEE come into contact at the base of the invagination and form a bilayer of IEE cells on the ventral side. The reticulate cells disappear where the IEE layers contact. The reticulate cells, infilling the IEE loop, are therefore isolated from the reticular layer of the enamel organ by this bilayer (Fig. 4E). The cells of the invaginating IEE are free of *Shh* at this initial stage of canal development, with just a few *Shh* positive cells found in the surrounding IEE on the ventral side

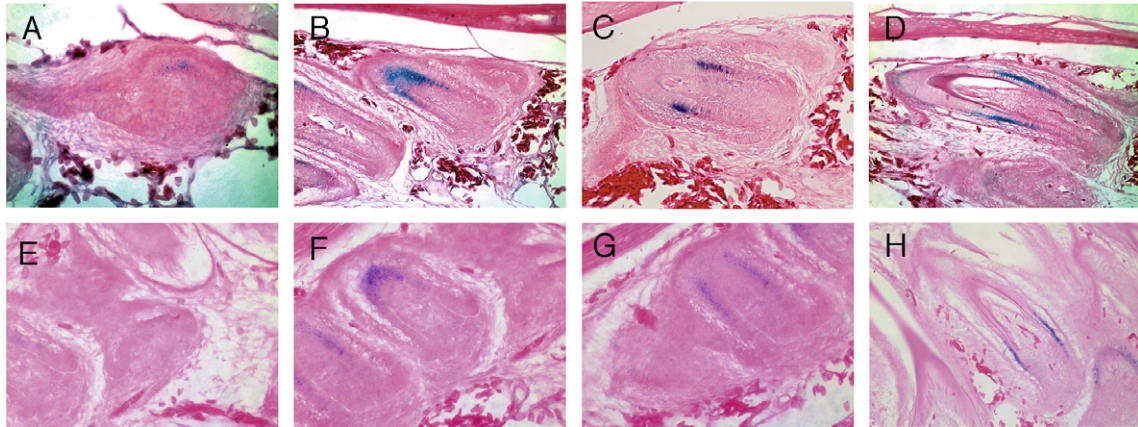


Fig. 3 – *Shh* expression in the developing fang from cap to late bell. (A–D) Sagittal sections through developing fang. (A) Cap stage fang with small patch of *Shh* expression in the dental epithelial cells at the tip. (B) Early bell stage fang with *Shh* expression associated with the tip of the tooth. (C) Mid bell stage fang with *Shh* expression spreading along the lateral arms of the differentiating IEE (inner enamel epithelium) and turning off at the tip of the tooth. (D) Late bell stage fang with *Shh* turned off in the fully differentiated ameloblasts. Expression does not spread to the ends of the cervical loops. (E–H) Sagittal sections through developing mandibular teeth. (E) Early cap stage. No *Shh* is expressed yet in the IEE. (F–H) Early and late bell stage mimics the *Shh* expression pattern in the fangs.

(Fig. 4F). The invagination process and induction of odontoblasts differentiation by the IEE would therefore appear to be independent of *Shh* signalling. The level of proliferation in the fangs can be visualised using PCNA staining (Fig. 4G). The early developing fang tooth germs contain a high number of proliferating cells in the mesenchyme and epithelium, with no obvious higher level of proliferation on the ventral invaginating side at this stage (Fig. 4H).

2.4. Expression of *Shh* in the forming canal

The loss of reticular cells from the bilayer area is followed by the disappearance of IEE cells from this region. By this process the canal's IEE cells are isolated from the outer fang's IEE cells, causing the shift from a deep epithelial groove to an epithelium filled canal. It is at this point that *Shh* is first seen in the developing fang canal, concentrated on the ventral side of the canal, in both the IEE cells and the reticulate cells (Fig. 5A). At the same time, *Shh* expression is observed around the ventral side of the outer IEE. This *Shh* expression in the IEE spreads from ventral to dorsal, with strong upregulation of *Shh* in the reticular cells (Fig. 5B). This increase in *Shh* signalling coincides with an expansion of the canal, and an increase in the number of proliferating cells within the canal (Fig. 5D–F). *Shh* is also observed in a ring of IEE cells around the outside of the tooth, which again correlate with high levels of proliferation (Fig. 5B and E). As the canal forms the level of proliferation in the fang epithelium is markedly higher than that in the mesenchyme. Loss of the IEE cells in the bilayer region results in the coming together of the two layers of odontoblasts. As these two odontoblasts layers secrete dentine, a band of predentine is deposited which forms the lamella anchoring the canal to the fang (Fig. 5C). As dentine is laid down on both sides this produces the bilayer of dentine observed in the functional fang (Fig. 2C). The IEE *Shh* positive cells in the epithelial canal and outer walls of the fang differentiate into the polarized ameloblasts with cuboidal shape and turn off *Shh*

expression. At the same time, the expression is lost in the reticular cells within the canal (Fig. 5G). Loss of *Shh* is again observed in a ventral to dorsal wave, with the dorsal cells being the last to lose *Shh* expression. Loss of *Shh* in the reticular cells within the canal is matched by a downregulation of proliferating cells in this region (Fig. 5J). Once the ameloblasts have formed *Shh* turns off completely in both the canal and outer epithelial layer (Fig. 5H). The synchronised nature of *Shh* expression in the outer IEE and canal IEE and the connection between the outer fang and inner canal can be clearly visualised in sagittal section (Fig. 5K).

2.5. Role of apoptosis in canal formation

Once the venom canal forms, the cells at its centre need to be removed to create an empty tube along which the venom can travel (Fig. 2A). Apoptosis has been shown to play an important role in shaping tooth development in mammals (Matalova et al., 2004), and has been shown to occur in the developing snake tooth in the stellate reticulum-like cells underlying the inner enamel epithelium (IEE) at the cap and bell stage (Buchtova et al., 2007). We therefore wished to investigate the role of apoptosis during venom canal formation. Apoptotic cells were found early on during cap stage development, in a similar position to those already described in the snake (data not shown) (Buchtova et al., 2007). No apoptosis was observed, however, during the early stages of invagination of the canal, and significantly apoptosis appeared not to be responsible for loss of IEE cells in the shaft region of the developing canal (Fig. 6A) (data not shown). High levels of apoptosis, however, were associated with later stages of canal development, after *Shh* expression has turned off in the canal. Apoptotic cells were observed to fill the central canal, clearing it of cells (Fig. 6B and C). Apoptotic cells were also observed around the tip of the fangs, perhaps involved with clearing a space to allow the fang to later emerge out from the oral mucosa (Fig. 6D).

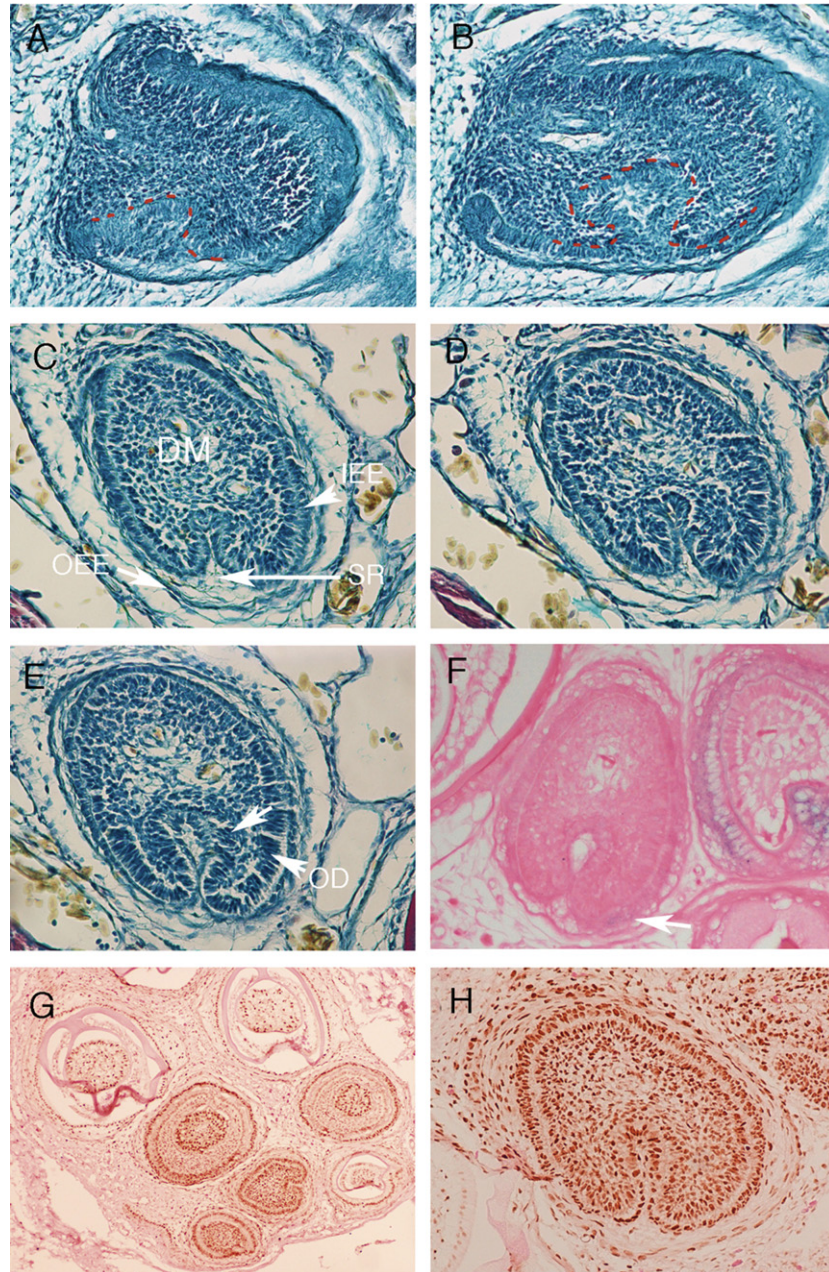


Fig. 4 – Infolding of the developing fang. (A and B) Sagittal sections through developing fangs. (C–H) Frontal sections. (A and B) The epithelium on the ventral side can be observed invaginating into the dental mesenchyme. Epithelium on the ventral side is outlined in red. (C) Frontal view of similar stage through invaginating region. IEE, inner enamel epithelium; OEE, Outer enamel epithelium; DM, dental mesenchyme; SR, stellate reticulum-like cells. (D) A loop of IEE forms. (E) The loop fills with stellate reticulum-like cells from the intermediate layer of the enamel organ. The odontoblasts can be observed lining up along side the invaginating IEE and around the outer IEE layer (arrows) OD, odontoblast. (F) *Shh* in situ hybridisation shows no sonic hedgehog expressing cells associated with the invaginating IEE, although a few *Shh* positive cells are visible in the outer IEE (arrow). An adjacent fang tooth germ at a later stage of development shows clear *Shh* expression in the IEE. (G) PCNA staining of developing fangs. Seven fangs are visible at different stages of development, showing different staining for PCNA (brown). (H) PCNA staining in an early fang as the IEE start to invaginate into the dental mesenchyme. High proliferation (brown) is observed in the mesenchyme and epithelium of the tooth germ.

2.6. The entrance and discharge orifice and the pattern of *Shh* expression

The entrance and discharge orifices form in a similar manner to the venom-conducting canal, but the initial invagina-

tion site is much wider. This produces the classic crescent moon shape, often used to depict formation of the venom canal in text-books. The wide nature of the invagination means that the two sides of the infolding never come into contact and a separate canal is therefore not created. The depth and

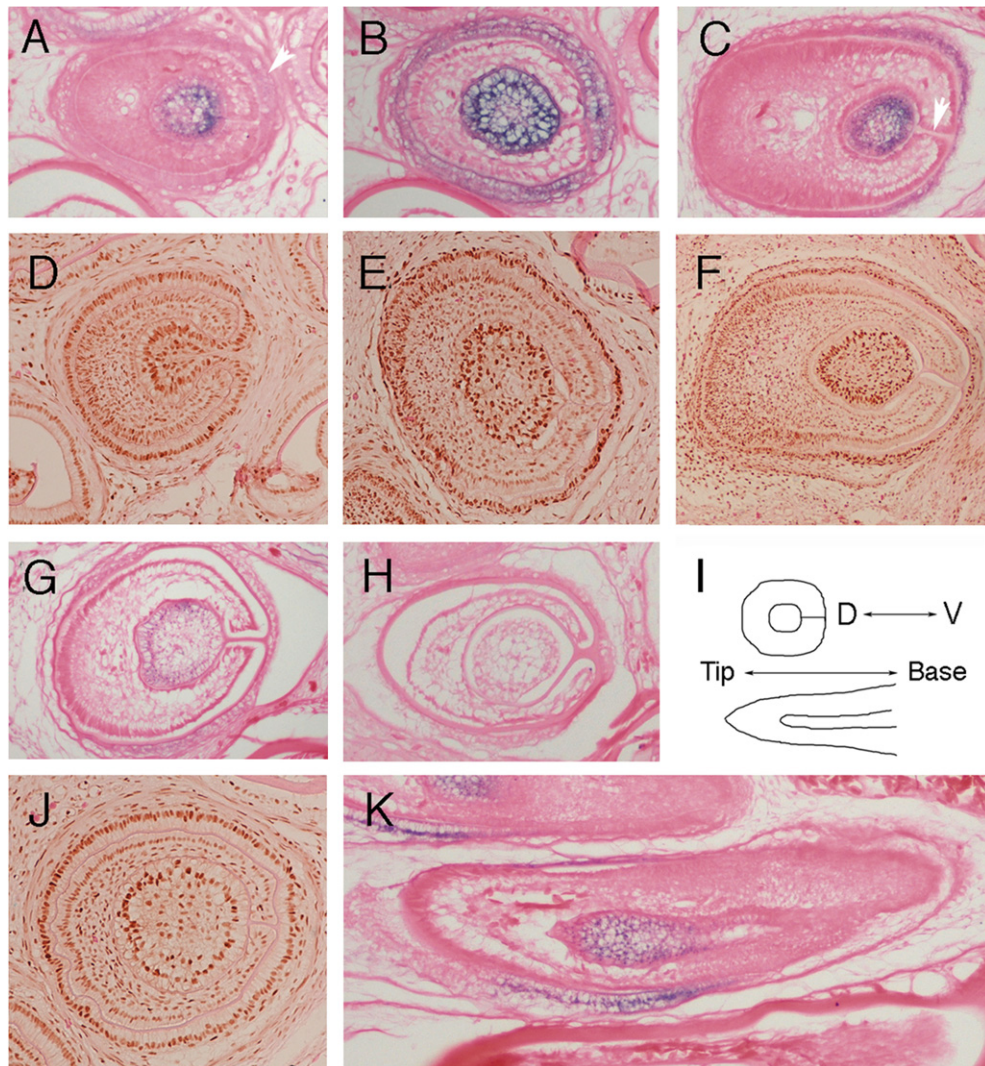


Fig. 5 – Expansion of the venom canal is associated with expression of *Shh*. (A–C, G, H, K) *In situ* hybridisation of *Shh*. (A–H, J) frontal sections showing the developing canal. (A) *Shh* is highly expressed in the ventral part of the canal in both IEE and central cells. Arrow indicates expression in the outer layer of IEE on ventral side. (B) *Shh* is expressed throughout the canal, and in the outer layer of IEE. (C) *Shh* turns off at the centre of the canal. The odontoblasts on either side of the canal and outer fang lamina region start producing predentine (arrow). (D) Proliferating cells (brown) are observed in the IEE of the canal and outer fang. (E and F) Proliferation is high in the expanding venom canal. (G) *Shh* is downregulated in the IEE and canal. Expression remains on the dorsal side of the canal. The predentine lamina connecting the canal to the outer fang is clear. (H) *Shh* is no longer expressed in the canal or surrounding IEE. (I) Schematic depicting axes. (J) Proliferating cells are no longer observed in the reticular cells at the centre of the canal. (K) Sagittal section showing canal formation. Expression of *Shh* in the outer IEE and inner IEE and stellate reticulum-like cells occurs at the same level within the tooth.

width of the IEE invagination is not constant in the orifices and there is a gradual reduction in width and increase in depth of the infolding, in the case of the discharge orifice, as the tooth moves from orifice to fang and a gradual increase in width and reduction in depth, in the case of the entrance orifice as the fang terminates. This can be followed in a series of sections (Fig. 7A–F). As with the venom canal, the IEE cells express *Shh*, which is expressed in a wave from ventral to dorsal, with the *Shh* expressing cells of the epithelial folding continuous with the *Shh* expressing cells of the outer fang IEE (Fig. 7G and H). PCNA staining is observed at a high level at the tip of the invaginating epithelial cells (Fig. 7I). Such a dis-

crete patch of proliferating cells was not evident in the main canal invagination (see Fig. 4G). It is possible that proliferation in this region accounts for the wider shape of the initial invagination at the orifices.

3. Discussion

The development of the venom-conducting canal has several steps based on the process of invagination, cell differentiation and cell disappearance. Fangs are often lost during attack, which may explain why so many fangs are visible in a replacements series (Fig. 1), when compared to the rest of

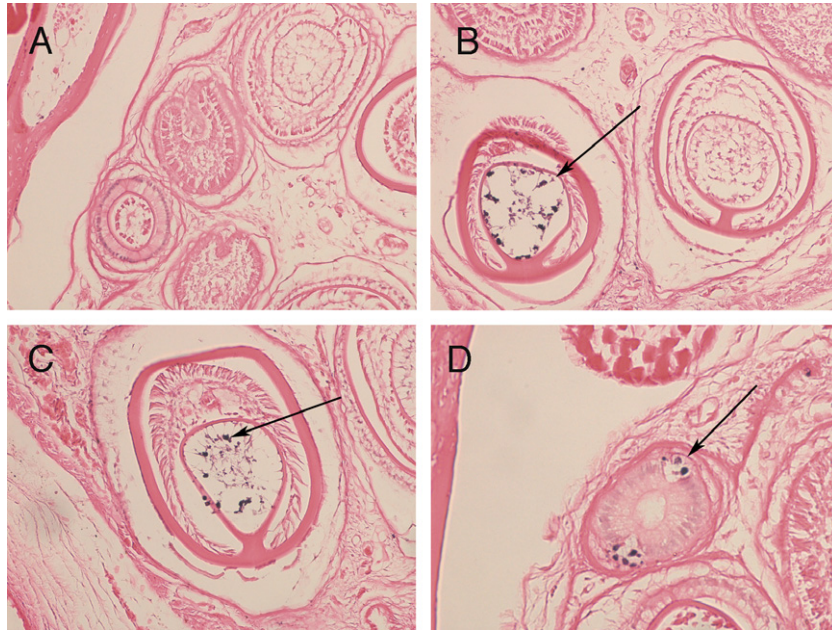


Fig. 6 – Apoptosis clears cells from the central canal. (A–D) TUNEL staining of frontal sections through fangs. Positive cells stain up as black, see arrows. (A) No TUNEL positive cells are associated with the early invagination and separation of the canal IEE. (B) Apoptosis occurs at high levels in the canal of the first developing fang. Neighbouring replacement fangs show no apoptosis and the canal remains full of cells. (C) Apoptosis occurs throughout the fang. Section shown is near the base of the tooth, compared to the section in (B) which is nearer the tip. (D) Apoptotic cells are also found at the extreme tip of the tooth.

the dentition, where around four generations can be viewed in section in the python (Buchtova et al., 2007).

Fangs initially develop in a very similar fashion to the rest of the dentition going through the bud, cap and bell stages of development. It is at the bell stage, however, that an invagination is observed on the ventral side of the tooth. The IEE cells, and accompanying stellate reticulum-like cells of the intermediate layer of the enamel organ, fold into the dental mesenchyme of the tooth and after inducing odontoblast differentiation become isolated as a canal. How the canal IEE becomes separated from the outer IEE is unclear. The IEE cells in the bilayer region of the developing canal do not appear to undergo apoptosis, and may instead be pinched off into the canal. The odontoblasts surrounding the bilayer may play a role in this theoretical pinching off process by applying pressure on the bilayer as they differentiate. The odontoblasts around the disappearing bilayer, produce dentine, which forms a lamella connecting the canal to the outer fang. The canal is therefore anchored to the side of the tooth. This may act to stabilise the hollow canal by providing additional support during a strike.

The completely epithelial nature of the cells in the developing canal is demonstrated by the expression of *Shh*, which is only expressed within the epithelial tissues of the tooth (Dassule et al., 2000). The presence of *Shh* thus provides molecular confirmation of the histological data, that infolding has occurred. The early stages of invagination, however, do not express *Shh*, indicating that *Shh* has no role in directing the first phase of canal development. No obvious difference between the levels of proliferation on the ventral and dorsal sides of the fang were observed, indicating that increased

proliferation is not the driving force for the invagination. At later stages, however, *Shh* is expressed at high levels during the phase of canal expansion. *Shh* has been shown to act as a potent mitogen, increasing proliferation (Cobourne et al., 2001), and thus it appears likely that it is performing a similar role in the stellate reticulum-like cells of the central canal. This is supported by the correlated increase and then loss of PCNA staining in the reticular cells in the canal. *Shh* also appears to play a role in controlling differentiation of the IEE, in both the outer layer of IEE and in the canal IEE, a similar role for *Shh* having been shown in mouse IEE cells (Gritl-Linde et al., 2002).

Shh has also been shown to act as a survival factor during tooth development (Cobourne et al., 2001) and it is perhaps loss of *Shh* in the cells of the central canal which triggers their cell death through apoptosis. The apoptosis then clears the canal of cells, creating the hollow tube necessary for venom conduction. Whether the IEE cells of the canal fully differentiate and produce enamel is unclear. In our histology specimens enamel would have been removed during the decalcification process, and so cannot be accurately visualised. No canal enamel however, was observed using SEM (data not shown). Tomes reported that in viperids, although a thin band of enamel was produced around the poison fang, no enamel was produced within the canal itself (Tomes, 1876). This would thus imply that the IEE cells of the canal fail to fully differentiate before being removed by apoptosis. In contrast, in elapids, such as *Hydrophis* the sea snake, enamel was observed lining the canal (Tomes, 1914). Enamel formation in the canal of a viperid has also been indicated in the puff adder (Lake and Trevor-Jones, 1987). The presence of enamel may

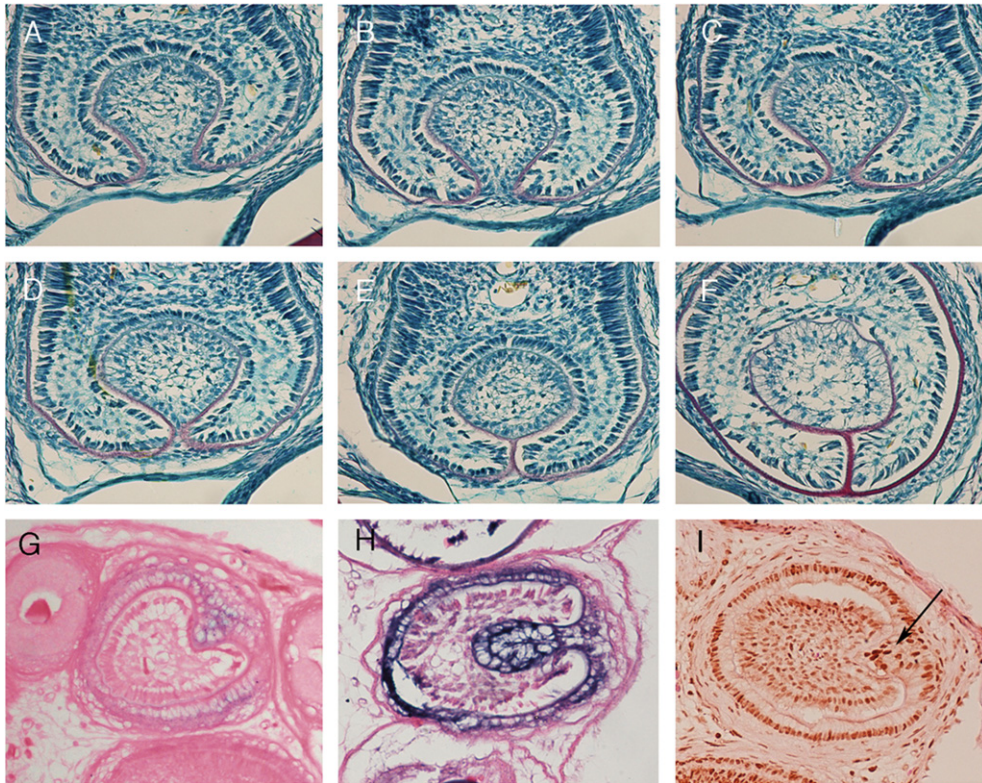


Fig. 7 – Orifice development (A-F) Serial frontal sections moving from the forming entrance orifice (A) to the venom canal (F) stained with trichrome. In the orifice the two arms of IEE do not come together leaving the invagination open to the outside. Pre dentine/dentine shown in red. (G and H) Expression of *Shh* in the forming discharge orifice. The discharge orifice forms a classic crescent shape. (G) As in the rest of the tooth, development and *Shh* expression proceeds in a ventral to dorsal direction. (H) In the orifice the *Shh* expressing cells in the folded epithelium are continuous with those of the outer fang IEE. (I) PCNA staining of the discharge orifice. High levels of proliferation are associated with the tip of the invagination (arrow).

therefore vary between species and be linked to the timing of the onset of apoptosis.

The dynamics expression of *Shh* shows a wave of differentiation within the tooth from the tip of the tooth towards the base, with mineralization following in the same pattern. The tooth thus appears built up from the tip, as has been previously described using SEMs (Jackson, 2002, 2007). Once the infolding process occurs, therefore, the hard tissue is laid down as described using the brick chimney hypothesis. Our sections also show that in addition to the tip to base wave of differentiation, there is also a wave of differentiation from ventral to dorsal. This has not previously been remarked upon but is evident in micro CT (Fig. 1E).

The orifices develop by a similar invagination but the initial width of the invagination is very different from that in the middle of the tooth. The different shape of the invagination means that the two sides of the invaginating IEE never come into contact, leaving the orifice open. What is responsible for the difference in invagination between the orifice and canal is an interesting question. We have shown here that *Shh* signalling is not involved but many other signalling pathways play essential roles during tooth development and are potential candidates. A different pattern of proliferation was observed in the invaginating IEE cells at the orifices compared to the rest of the fang, this change in proliferation dynamic perhaps shaping the size of the forming invagination. The

mechanism by which the orifices form can be likened to that observed in reptiles with an open groove along their fangs. Sections through the fangs of the boomslang, a back-fanged snake with grooved fangs, look highly similar to sections through the orifices of *Trimeresurus* (Lake and Trevor-Jones, 1995). It is thus tempting to speculate that the process of orifice formation in viperids represents the ancestral pleisomorphic state, and that enclosed canals developed by a change in the shape and size of the initial invagination, which as such is an apomorphy. It would be therefore interesting to investigate the level of proliferation during initial invagination in a variety of species of fanged snakes. Canal and orifice development in the viper are summarised in Fig. 8.

This paper represents a first step in our understanding of the molecular signals involved in fang development and shows that venom fang formation uses a combination of the infolding theory and brick chimney theory to create the final functional fang.

4. Experimental procedure

4.1. Specimens

Six specimens of one month old *T. albolabris* were analysed during the investigation. The specimen were anaesthetised

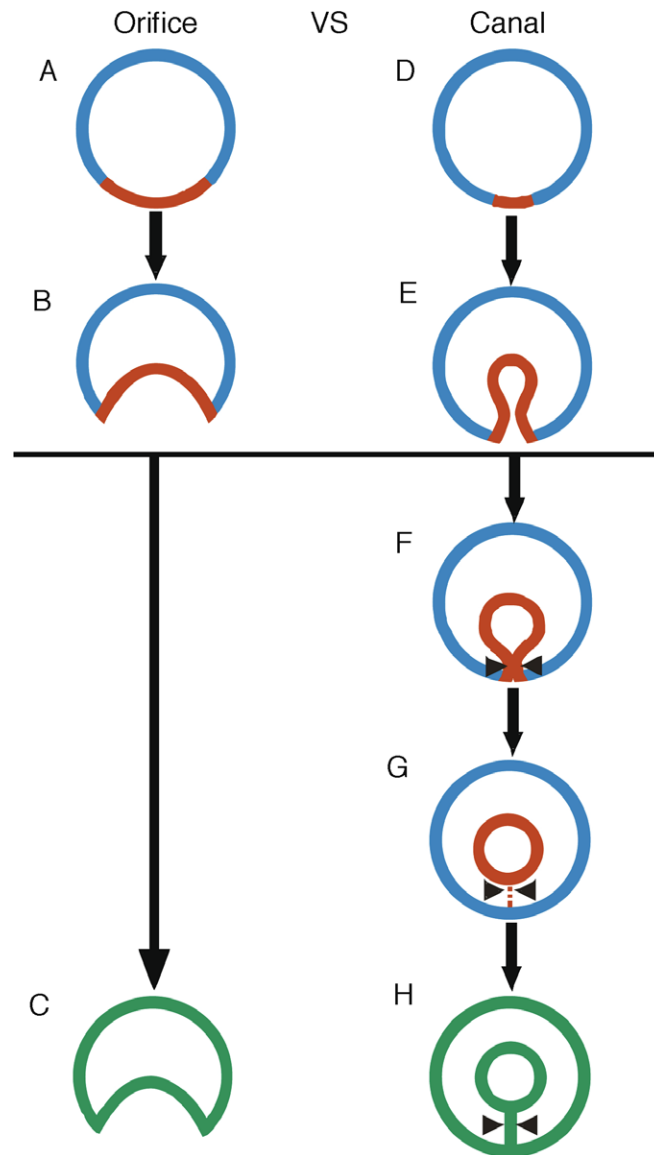


Fig. 8 – Schematic representation of canal and orifice development in the viper. (A–C) Orifice development. Blue indicated the non-invaginating IEE. Red indicates the invaginating IEE. Green represents the layout of dentine in the final fang. (D–H) Canal development. The initial invagination involves a smaller population of cells than orifice development. These cells form a loop and then become pinched off to form an isolated circle of IEE.

before the head was removed. All specimens originated from private breeders.

4.2. Micro CT and faxitron X-ray imaging

Micro Computerised Tomography (Micro CT) and faxitron X-ray imaging was used for the 3D description of tubular fang structure.

4.3. Histology

The heads of specimen were decalcified in 5% EDTA in 10% formaldehyde for several weeks at 4 °C. Decalcification was checked using faxitron imaging. Specimens were subsequently dehydrated through an ethanol series, embedded in wax and sectioned as frontal or sagittal sections of 8–10 µm. Sections

were stained with a trichrome stain (alcian blue, sirrus red and hemotoxylin) or eosin.

4.4. In situ hybridization

Nonradioactive *in situ* hybridization was performed and the UTP were labelled by digoxigenin. A *Python saebe Shh* probe was used, which had been previously shown to hybridise to *Shh* in other snake species (Buchtova et al., 2008). This was linearised with HindIII and transcribed with T7. Tissue sections were treated with 10 µg/ml proteinase K for 15 min and the hybridization was carried out at 60 °C.

4.5. TUNEL

Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling was used to detect apoptosis DNA breaks

in individual cells (In situ Cell death detection kit, Chemicon). The procedure was carried out as described in the producer's directions and converted using a vectastain DAB substrate kit (Vectalabs). Eosin was used to counterstain the sections.

4.6. PCNA

A Zymed PCNA (proliferating cell nuclear antigen) staining kit (Invitrogen) was used following manufacturer's instructions with the following additional modifications. After rehydration slides were treated for antigen-retrieval in 0.01 M citric acid in a microwave for 10 minutes, followed by 0.05% Trypsin in PBS for 2 min, 0.1% Triton for 10 min and 50 mM NH₄Cl for 5 min. Products of the reaction were visualised with diaminobenzidine (DAB) and counterstained with Eosin. Sections used were cut at 4–8 µm.

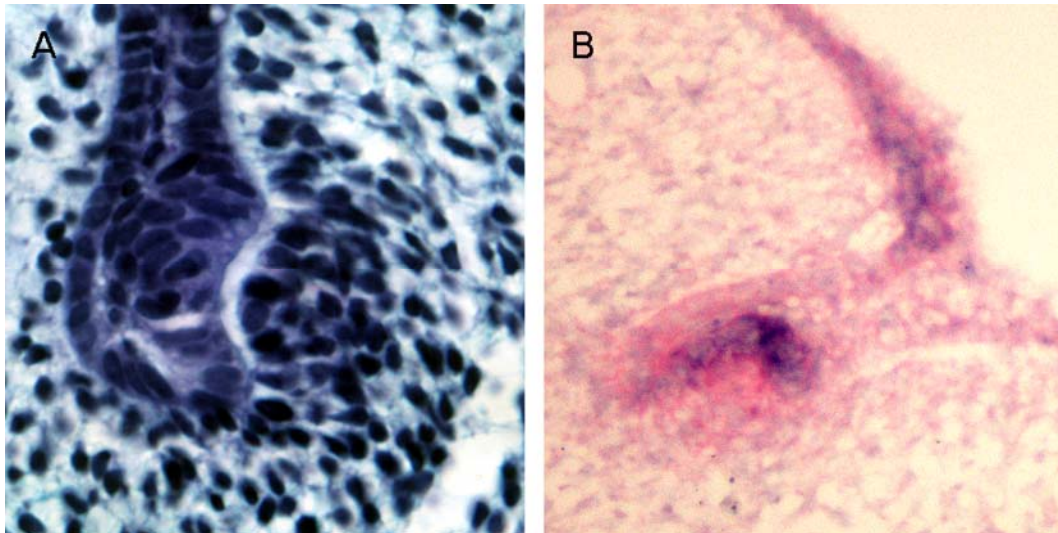
Acknowledgements

Thanks to Chris Healy for the microCT scans of the developing fangs. Thanks to Gregory Hangrigan and Joy Richman for the python *Shh* probe. Thanks to COST action B23 for funding of a Short Term Scientific Mission (STSM) during which much of this work was carried out.

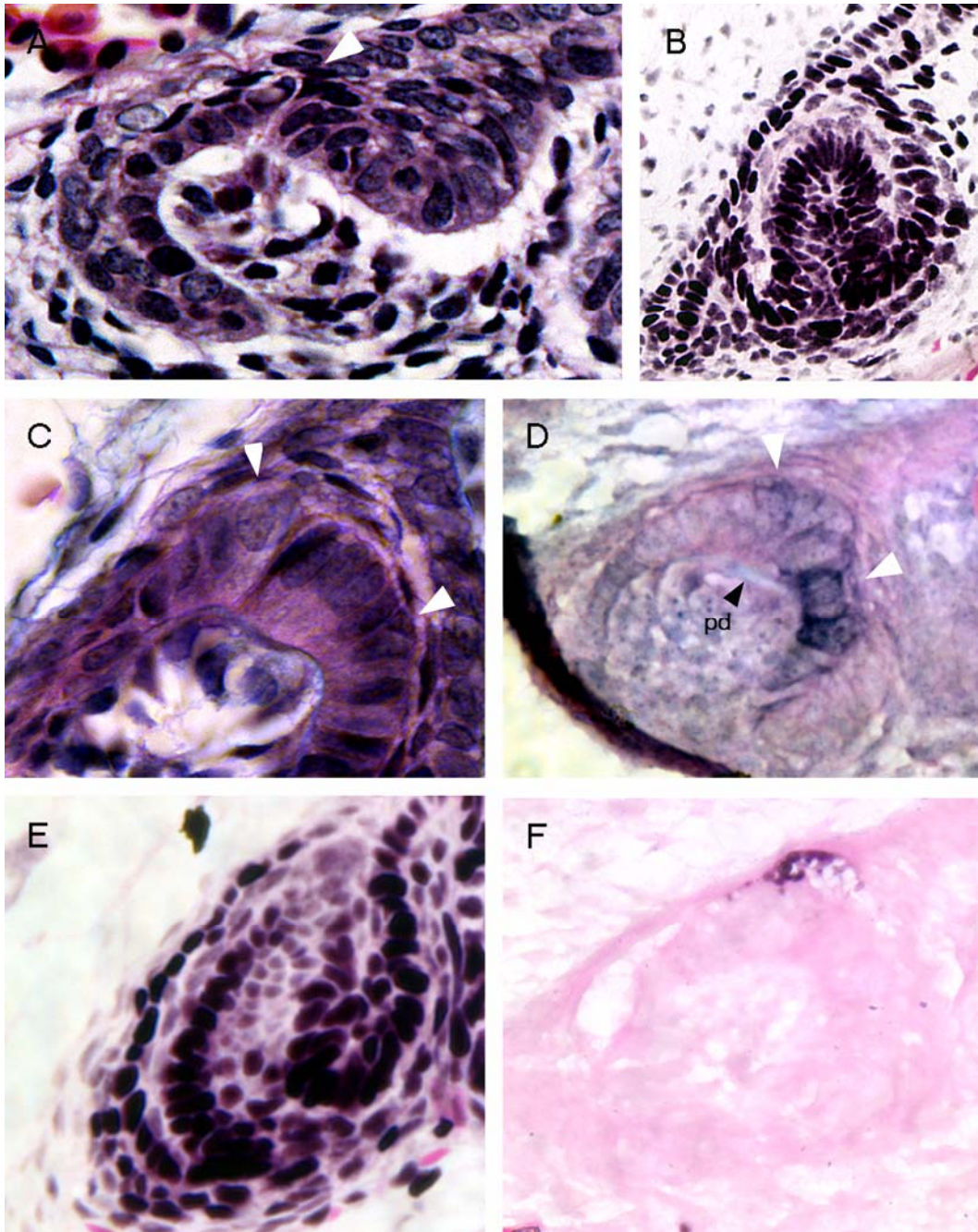
REFERENCES

- Bitgood, M.J., McMahon, A.P., 1995. Hedgehog and Bmp genes are coexpressed at many diverse sites of cell–cell interaction in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 172, 126–138.
- Bogert, C.M., 1943. Dentitional phenomena in cobras and other elapids with notes on adaptive modifications of the fangs. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 131, 285–360.
- Boulenger, G.A., 1896. Remarks on the dentition of snakes and on the evolution of the poison-fangs. *Proc. Zool. Soc. Lond.* 40, 614–616.
- Boulenger, G.A., 1915. On a colubrid snake (*Xenodon* with a vertically moveable maxillary bone. *Proc. Zool. Soc. Lond.*, 83–85.
- Buchtova, M., Boughner, J.C., Fu, K., Diewert, V.M., Richman, J.M., 2007. Embryonic development of *Python sebae*-II: craniofacial microscopic anatomy, cell proliferation and apoptosis. *Zoology* 110, 231–251.
- Buchtova, M., Handrigan, G.R., Tucker, A.S., Lozanoff, S., Town, L., Fu, K., Diewert, V.M., Wickling, C., Richman, J., 2008. Initiation and patterning of the snake dental lamina are dependent on Sonic hedgehog signalling. *Dev. Biol.* 319, 132–145.
- Chuong, C.M., Patel, N., Lin, J., Jung, H.S., Widelitz, R.B., 2000. Sonic hedgehog signaling pathway in vertebrate epithelial appendage morphogenesis: Perspectives in development and evolution. *Cell. Mol. Life Sci.* 57, 1672–1681.
- Cobourne, M.T., Hardcastle, Z., Sharpe, P.T., 2001. Sonic hedgehog regulates epithelial proliferation and cell survival in the developing tooth germ. *J. Dent. Res.* 80, 1974–1979.
- Dassule, H.R., Lewis, P., Bei, M., Maas, R., McMahon, A.P., 2000. Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development* 127, 4775–4785.
- Deufel, A., Cundall, D., 2003. Feeding in *Atractaspis* (Serpentes: Atractaspididae): a study in conflicting functional constraints. *Zoology* 106, 43–61.
- Edmund, A.G., 1969. Dentition. In: Gans, C., d'A Bellairs, A., Parsons, T.S. (Eds.), *Biology of the Reptilia: Morphology A*. Academic Press, New York.
- Fry, B.G., Vidal, N., Norman, J.A., Vonk, F.J., Scheib, H., Ramjan, S.F.R., Kuruppu, S., Fung, K., Hedges, S.B., Richardson, M.K., Hodgson, W.C., Ignjatovic, V., Summerhayes, R., Kochva, E., 2006. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. *Nature* 439, 584–588.
- Gritl-Linde, A., Bei, M., Maas, R., Zhang, X.M., Linde, A., 2002. Shh signalling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation growth and polarization. *Development* 129, 5323–5337.
- Haas, G., 1980. *Pachyrachis problematicus* Haas, snakelike Reptile from the lower Cenomanian: ventral view of the skull. *Bull. Mus. Natl. Hist. Nat. Paris* 4, 87–104.
- Hardcastle, Z., Mo, R., Hui, C.C., Sharpe, P.T., 1998. The Shh signalling pathway in tooth development: defects in *Gli2* and *Gli3* mutants. *Development* 125, 2803–2811.
- Jackson, K., 2002. How tubular venom conducting fangs are formed. *J. Morphol.* 252, 291–297.
- Jackson, K., 2007. The evolution of venom-conducting fangs: insights from developmental biology. *Toxicon* 49, 975–981.
- Kardong, K.V., 1974. Kinesis of the jaw apparatus during the strike of the cottonmouth snake, *Agkistrodon piscivorus*. *Forma Funct.* 7, 327–354.
- Kardong, K.V., 1980. Evolutionary patterns in advanced snakes. *Am. Zool.* 20, 269–282.
- Klauber, L.M., 1939. A statistical study of the rattlesnakes. VI. Fangs. *San Diego: Society of Natural History Occasional Papers* 5, 3–61.
- Klauber, L.M., 1956. *Rattlesnakes: Their Habits, Life Histories, and Influence on Mankind*, vol. 2. University of California Press, Berkeley.
- Kochva, E., 1963. Development of the venom gland and trigeminal muscles in *Vipera palaestinae*. *Acta Anat.* 52, 49–89.
- Kochva, E., 1978. In: Gans, S.K., Gans, C. (Eds.), *Biology of the Reptilia*, Vol. 8. Academic Press, London, pp. 43–162.
- Kochva, E., 1987. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. *Toxicon* 25, 65–106.
- Kochva, E., Meier, J., 1986. The fangs of *Atractaspis engaddensis* Haas (Serpentes: Atractaspididae). *Rev. Suisse Zool.* 93, 749–754.
- Koyama, E., Yamaai, T., Iseki, S., Ohuchi, H., Nohno, T., Yoshioka, H., Hayashi, Y., Leatherman, J.L., Golden, E.B., Noji, S., Pacifici, M., 1996. Polarizing activity, Sonic Hedgehog, and tooth development in embryonic and postnatal mouse. *Dev. Dyn.* 206, 59–72.
- Lake, A.R., Trevor-Jones, T.R., 1987. Formation of the poison fang canal of the puff adder *Bitis arietans*. *S. Afr. J. Sci.* 83, 668–669.
- Lake, A.R., Trevor-Jones, T.R., 1995. The formation of the poison fang of the boomslang *Dispholidus typus*. *S. Afr. J. Sci.* 91, 329–330.
- Matalova, E., Tucker, A.S., Sharpe, P.T., 2004. Death in the life of a tooth. *J. Dent. Res.* 83, 11–16.
- Tomes, C.S., 1876. On the development and succession of the poison fangs of snakes. *Proc. R. Soc. Lond.* 24, 259–261.
- Tomes, C.S., 1914. A manual of dental anatomy human and comparative. In: Mearns, H.W., Hopewell-Smith, A. (Eds.), *The Teeth of Amphibia Reptiles and Birds*, seventh ed. J & A Churchill, London (Chapter 11).
- Underwood, G., Kochva, E., 1993. On the affinities of the burrowing asps *Atractaspis* (Serpentes: Atractaspididae). *Zool. J. Linn. Soc.* 107, 3–64.
- Vaahokari, A., Åberg, T., Jernvall, J., Thesleff, I., 1996. The enamel knot as a signalling centre in the developing mouse tooth. *Mech. Dev.* 54, 39–43.
- Vidal, N., Delmas, A.S., David, P., Cruaud, C., Couloux, A., Hedges, S.B., 2007. The phylogeny and classification of caenophidian snakes inferred from seven nuclear protein-coding genes. *C. R. Biol.* 330, 182–187.

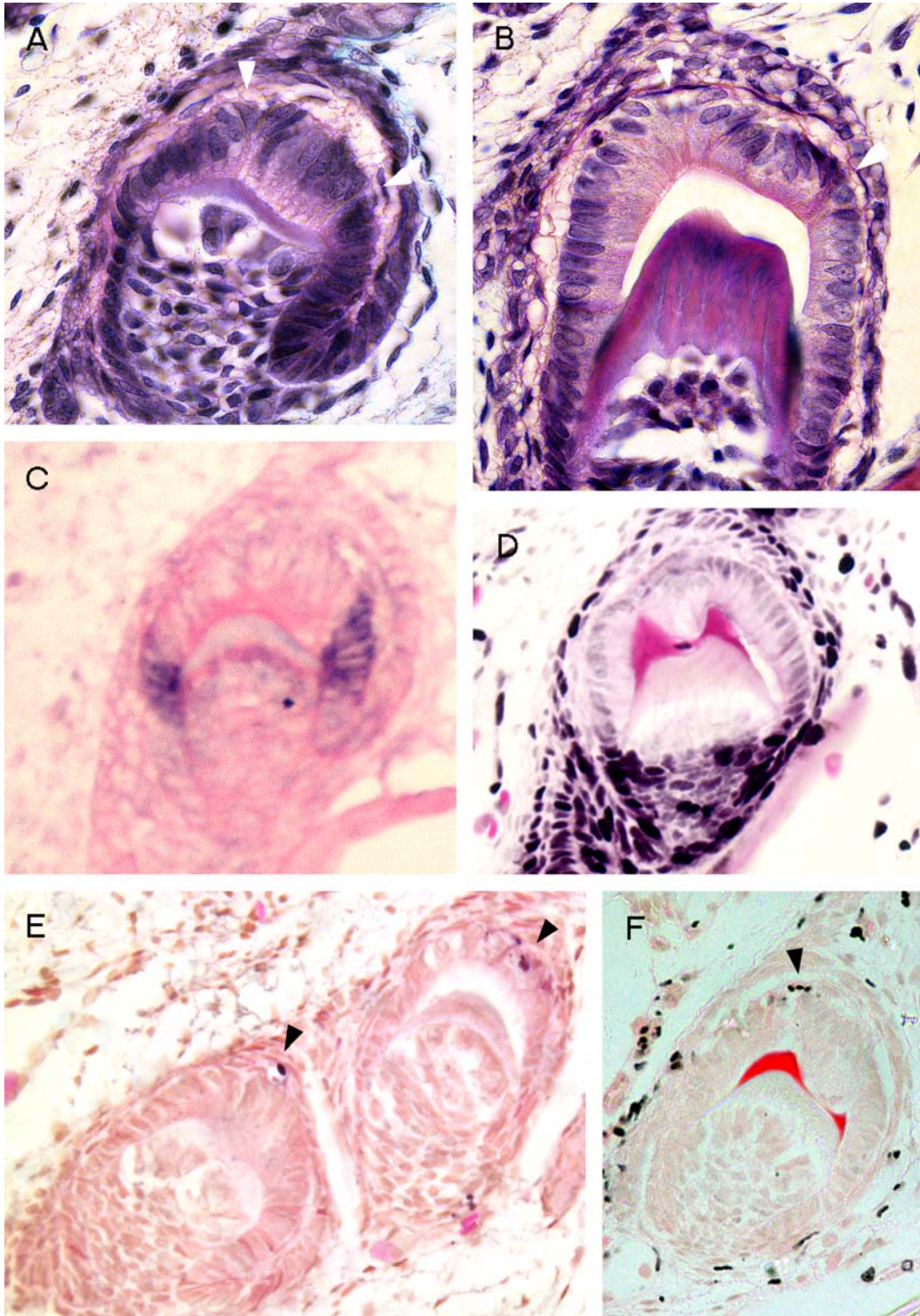
**Diferenciace sklovinného orgánu a vývoj zubních hrbolků
u šupinatých plazů: role *Shh*, apoptózy a buněčné proliferace**



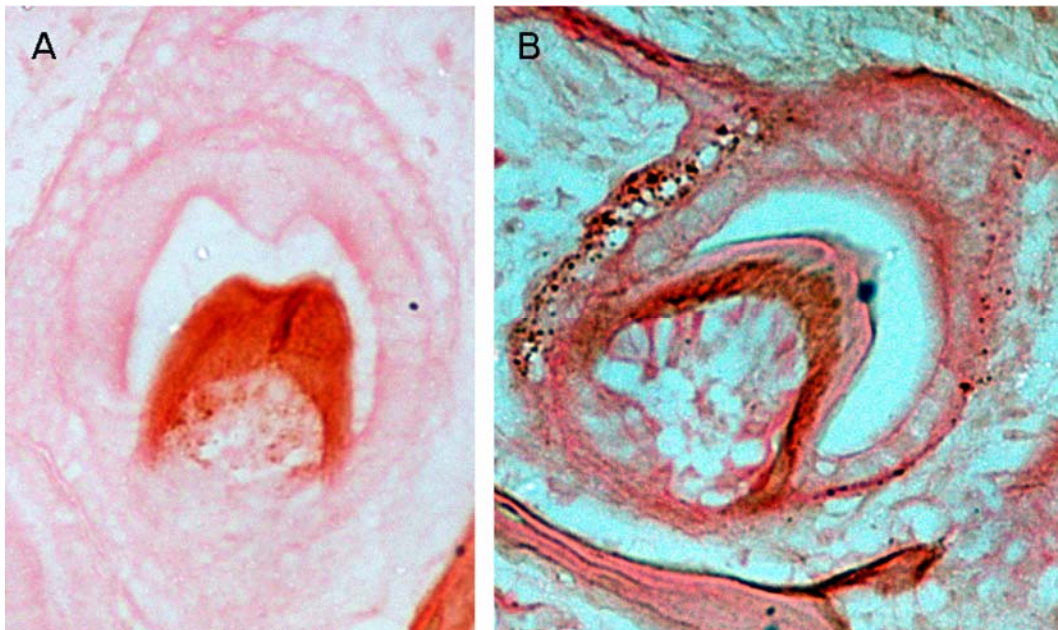
Obr. 1: *P. picta*, časně stádium pohárku. A) V labiální části sklovinného orgánu se nachází shluk buněk. B) Tento shluk buněk vykazuje největší expresi *Shh*, která je patrná v menší míře i v okolních buňkách IDE a buňkách sklovinného orgánu přilehlých k IDE.



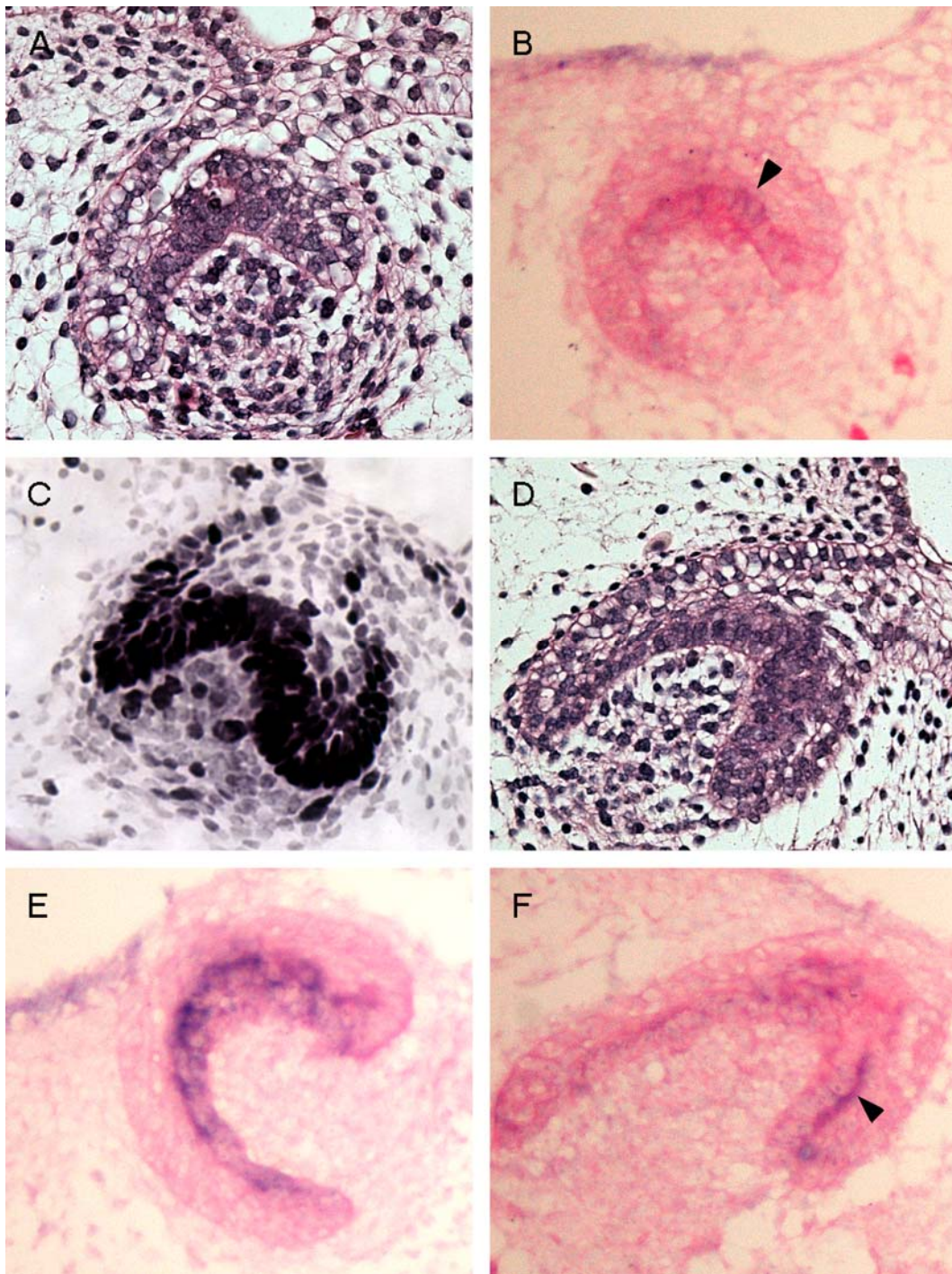
Obr. 2: Pozdní stádium pohárku, stádium zvonku a časné sekreční stádium u *P. picta*. A) Zobrazuje přechod stádia pohárku ve stádium zvonku. Šipka na labiální straně IDE ukazuje na vmezeřené buňky tvořící rozhraní v IDE v oblasti budoucích hrbolků. B) Na konci stádia pohárku je proliferačně aktivní celá vrstva IDE a ODE. C) Ve stádiu zvonku dochází v centru IDE invaginaci diferencujících ameloblastů do zubní papily. Zubní papila má tak přítomny náznak dvou hrbolků. Šipky ukazují na rozhraní v IDE po stranách centrálního shluku ameloblastů. Tato rozhraní, kde se nachází vmezeřené buňky, jsou pozičně na místech budoucích zubních hrbolků. D) Expres *Shh* je na konci diferenciace centrálních buněk IDE v hraniční oblasti IDE. Slabý signál je patrný i v okolních právě diferencujících buňkách. Signál není přítomen v cervikální kličce. E) Na počátku stádia zvonku se vytrácí z oblasti centrálního shluku ameloblastů buněčná proliferace. F) V tomto stádiu dochází ve vrstvě buněk tvořících čepičku k masivní apoptóze.



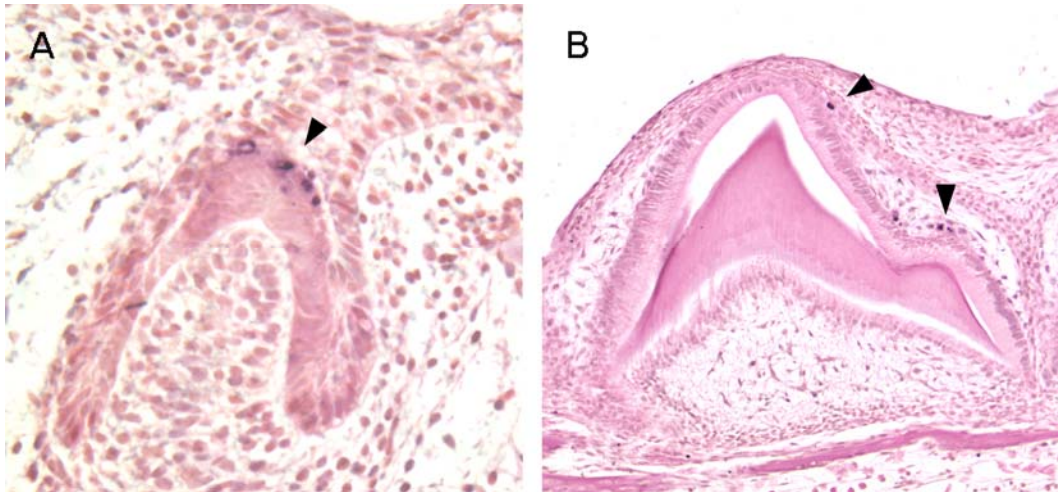
Obr. 3: Mineralizace zubů u gekona *P. picta*. A) Na počátku mineralizace je základní bikuspidní tvar zubní papily fixován dentinem. Šipky ukazují na vmezežené buňky. B) Rozhraní mezi centrálním shlukem ameloblastů je patrný i v pozdním stádiu mineralizace korunky, kdy je již přítomná sklovina. C) Expres *Shh* mizí z oblasti zralých ameloblastů a je patrná po stranách IDE, kde buňky teprve diferencují. Buněčná proliferace je soustředěna do distální oblasti IDE včetně cervikálních klíčků. Oblast IDE s diferencovanými ameloblasty buněčnou proliferací nevykazuje. E-F) Apoptóza, znázorněná jako černé body, je patrná v proximální části sklovinného orgánu v buňkách přiléhajících k vrstvě ameloblastů a později i ve vrstvě meloblastů.



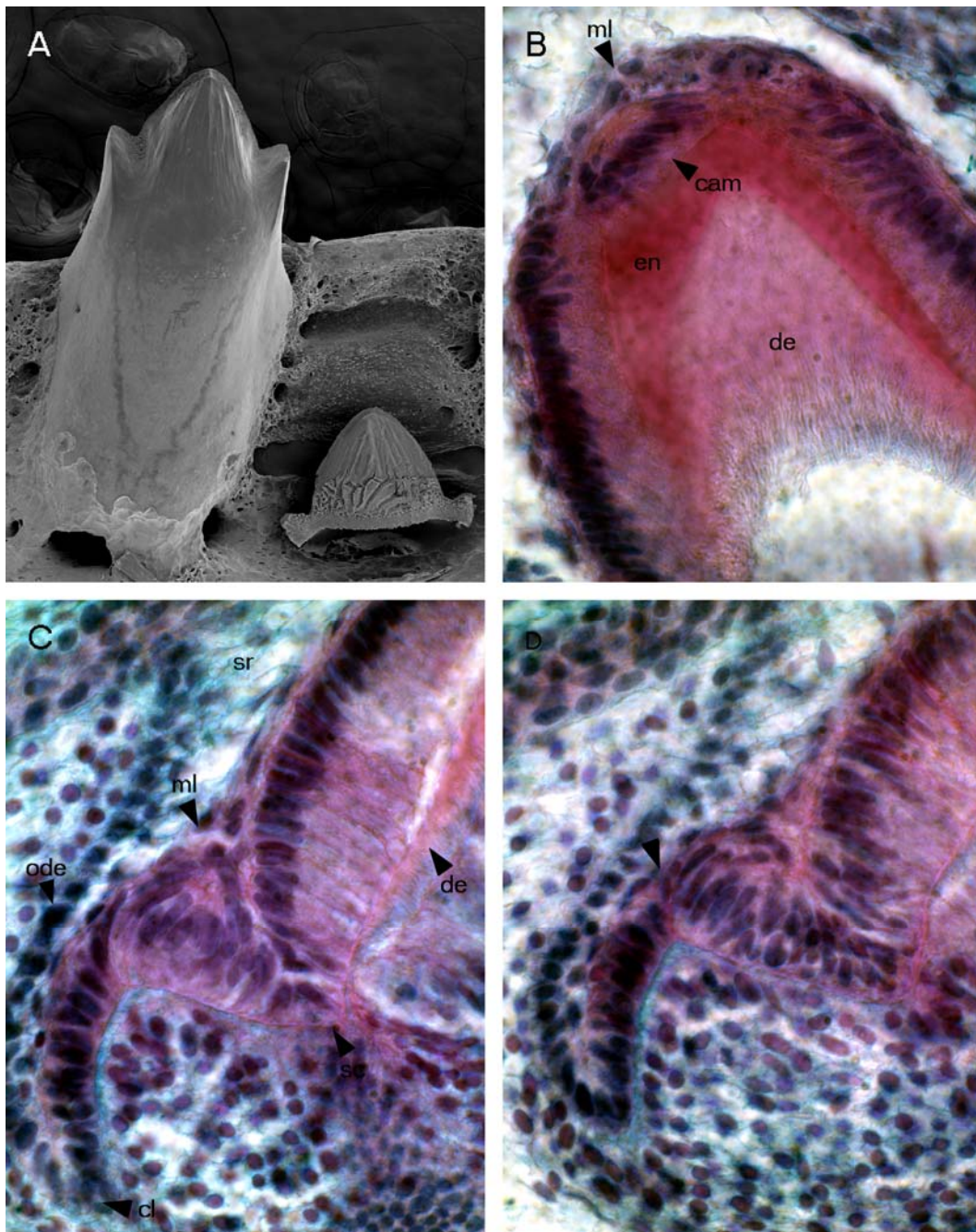
Obr. 4: Hvězdicovité retikulum v mineralizačním stádiu *P. picta*. A) Kolagen I, který je přítomný u savců v hvězdicovitém retikulu, jsme u plazů v této vrstvě sklovinného orgánu nedetekovali, byl ale přítomen podobně jako u savců v dentinu a predentinu (hnědá barva). B) Fibronektin, který je také přítomný v hvězdicovitém retikulu savců, byl u gekona v této vrstvě přítomný. Krom toho byl také v predentinu (hnědá barva).



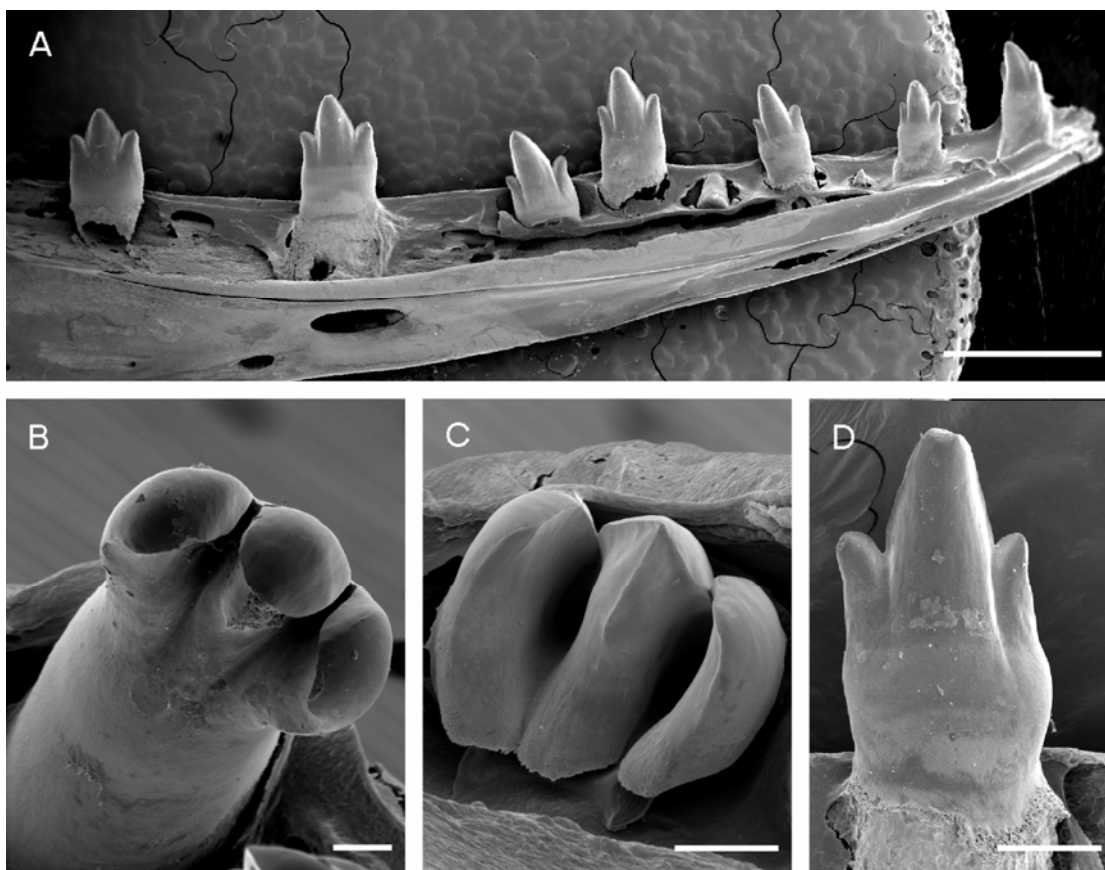
Obr. 5: Expres *Shh* a buněčná proliferace ve vývoji předmineralizačních stádií zubů chameleona *Ch. calyptratus*. A) Zobrazuje morfologii zubního zárodku ve stádiu pohárku, kde je centrální část sklovinného orgánu tvořena shlukem buněk. B) Ve stádiu pohárku jsme detekovali expresi *Shh* v IDE. Její největší intenzita byla labiálně od centra IDE. C) Na konci stádia pohárku klesá proliferační aktivita v centru IDE a přilehlé vrstvy. Ostatní části IDE a přilehlé vrstvy sklovinného orgánu jsou proliferačně aktivní. D) Zobrazuje stádium v přechodu do stádia zvonku. Z široké vrstvy, která v sobě zahrnuje i centrální shluk buněk, se diferencuje zřetelná vrstva IDE, jejíž centrální buňky diferencují v ameloblasty. E) Na konci stádia pohárku vykazuje vrstva IDE a k ní přilehlé buňky silnou expresi *Shh*. F) Ve stádiu zvonku je exprese *Shh* v diferencujících ameloblastech a přilehlých buňkách sklovinného orgánu.



Obr. 6: Apoptóza v průběhu vývoje zubů u *Chamaeleo calytratus*. A) Ve stádiu zvonku jsme pozorovali masivní apoptózu ve vrstvě buněk přilehlé k centrální části IDE. B) V pokročilé fázi mineralizace zubu jsme apoptózu nacházeli v buňkách přilehlé vrstvy k IDE a to zejména v oblasti špičky centrálního hrotu a bočních hrbolků. Apoptotické buňky, na které ukazují šipky jsou znázorněny černě.



Obr. 7: Vývoj zubních hrbolků u chamaeleolise *Ch. porcus*. A) Zuby s centrálním rozdělením na malý labiální a linguální hrbolček a po stranách s velkým mesiálním a distálním bočním hrbolkem. Vlevo je funkční zub v ankylóze, vpravo je patrný vyvíjející se zub v pokročilé fázi mineralizace, jehož spodní část, v úrovni připojení bočních hrbolků (rozpraskaný povrch dentinu po vysušení preparátu), ještě není kryta sklovinou. B) K oblasti centrálního shluku ameloblastů (cam) přiléhá poměrně rozvinutá vrstva buněk (ml) v které jsou patrná apoptotická tělíčka. C-D) Zobrazují strukturu sklovinného orgánu v místě bočních hrbolků. Na rozhraní mezi centrálním hrotem korunky a bočním hrbolkem je patrná mohutná vrstva buněk sousedící na jedné straně s Ide a na druhé s hvězdicovitým retikulem. D) Šipka ukazuje na místo špičky budoucího bočního hrbolku. Je zde patrné rozhraní mezi shlukem velkých ameloblastů na straně přilehlé k centrálnímu hrotu a teprve diferencujícímí ameloblasty na straně druhé.



Obr. 8: Trikonodontní zuby u mláděte varana *Varanus niloticus*. A) celkový pohled na dentici v dolní čelisti. B) V premaxille se nachází zuby s třemi oddíly mající podobu kočičí packy. C) Tyto oddíly mineralizují ve svých horních částech nezávisle a později se spojují. D). Ostatní zuby jsou tvořeny centrálním hrotem s poměrně velkým mesiálním a distálním hrbolek. Velikost měřítka je A) 2mm, B-C) 0,1mm, D) 0,5mm.