

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Ekologie



Bc. Barbora Augstenová

Evoluce pohlavních chromozomů a karyotypů hadů
Evolution of sex chromosomes and karyotypes in snakes

Diplomová práce

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

Konzultanti: RNDr. Martina Johnson Pokorná, Ph.D.; Michail Rovatsos, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení:

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

V Praze, dne

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala zejména svému školiteli prof. Lukáši Kratochvílovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce, jeho vstřícnost a veškeré připomínky při sepisování mé diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala svému konzultantovi Michailu Rovatsosovi, Ph.D., a to především za veškerý čas, který mi věnoval při osvojování laboratorních postupů, jeho ochotu a trpělivost. Své konzultantce RNDr. Martině Johnson Pokorné za cenné připomínky a rady zejména při sepisování mé diplomové práce. Také bych ráda poděkovala Mgr. Marii Altmanové a MSc. Sofii Mazzoleni za pomoc při seznamování se s novými technikami. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat také prof. Ing. Petru Rábovi DrSc., dr. h. c. za možnost využití laboratoře genetiky ryb při Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR a všem chovatelům, kteří nám poskytli krevní vzorky, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout.

Tato diplomová práce vznikla za finanční podpory Grantové agentury UK (GA UK č. 1073416).

Abstrakt

Hadi (Serpentes) jsou skupinou šupinatých plazů (Squamata) čítající více než 3600 druhů. Většina hadů patří do skupiny Caenophidia, ta tvoří asi 90 % všech moderních hadů a je také nejstudovanější hadí skupinou. Přestože jsou šupinatí plazi v determinaci pohlaví a uspořádání genomu variabilní, přinejmenším hadi skupiny Caenophidia jsou v tomto ohledu skupinou velice stabilní. Typický – a zřejmě také ancestrální – karyotyp hadů obsahuje 36 chromozomů s 16 makro- a 20 mikrochromozomy. U všech druhů hadů se předpokládá genotypově určené pohlaví (GSD) a až do nedávna se mělo za to, že všichni hadi mají ZZ/ZW pohlavní determinační systém. Hlavní důvod této domněnky spočívá v tom, že byli studováni převážně hadi skupiny Caenophidia a u zbývajících linií se jen předpokládalo, že mají homologické pohlavní chromozomy, ačkoli se u těchto hadů – s jedinou výjimkou (*Acrantophis dumerili*) – pohlavní chromozomy popsat nepodařilo. Teprve současná studie ukázala, že minimálně u krajt a hroznýšů došlo k nezávislému vzniku pohlavních chromozomů XX/XY. Pohlavní chromozomy těchto hadů jsou však homomorfní a klasickými cytogenetickými metodami se je prozatím nepodařilo odhalit. Proto bylo jedním z cílů této práce zjistit, zda je možné identifikovat slabě diferencované pohlavní chromozomy u hadů mimo skupinu Caenophidia pomocí molekulárně cytogenetických metod. Dalším cílem této práce bylo zaměřit se především na pohlavní chromozom W hadů skupiny Caenophidia a jeho evoluční dynamiku v rozložení konstitutivního heterochromatinu a výskytu repetitivních sekvencí. Zatímco pohlavní chromozom Z těchto hadů vykazuje vysokou stabilitu napříč všemi hlavními liniemi hadů skupiny Caenophidia, heterochromatizovaný pohlavní chromozom W naopak vykazuje vysokou variabilitu v uspořádání repetitivních sekvencí a heterochromatinu napříč fylogenetickým spektrem skupiny Caenophidia, což dokládá, že nerekombinující oblasti alozomů jsou jednou z nejdynamičtějších částí genomu.

Klíčová slova:

Hadi, pohlavní chromozomy, karyotyp, evoluce, heterochromatin, FISH, *Bkm*, ITS

Abstract

Snakes (Serpentes) are a group of squamate reptiles (Squamata) including more than 3600 species. The vast majority of snakes are from the group Caenophidia, which includes approximately 90% of all extant snake species and represents the most studied lineage. Squamate reptiles are variable in sex determination and genome organisation, however, caenophidian snakes are quite stable in these respects. The typical – and probably ancestral – snake karyotype is composed of 36 chromosomes with 16 macro- and 20 microchromosomes. In all snake species, genotypic sex determination (GSD) is expected and it was assumed until recently that all snakes possessed ZZ/ZW sex chromosomes. The main reason for this is that most of the studied snakes were from the group Caenophidia and in the rest of the snake lineages it was believed that their sex chromosomes were homologous. In fact, the sex chromosomes of non-caenophidian snakes have not yet been identified – with the single exception of *Acrantophis dumerili*. Nevertheless, a recent study showed that there was an independent evolution of XX/XY sex chromosomes in pythons and boas. Sex chromosomes of these snakes are homomorphic and so far they have not been detected by classical cytogenetic methods. In this context, the aim of this study is to explore whether it is possible to identify poorly differentiated sex chromosomes in non-caenophidian snakes by molecular-cytogenetic methods. The other aim of the study is to focus on the W sex chromosome of the caenophidian snakes and its evolutionary dynamics, based on the topology and distribution of constitutive heterochromatin and repetitive sequences. While the Z chromosome of these snakes exhibits high stability across all main lineages of Caenophidia, the heterochromatic W chromosome shows a high variability in the arrangement of repetitive sequences and heterochromatin across the phylogenetic spectrum of the Caenophidia lineage, which supports the assumption that the non-recombining regions of the chromosomes are the most dynamic parts of the genome.

Key words:

Snakes, sex chromosomes, karyotypes, evolution, heterochromatin, FISH, *Bkm*, ITS

Obsah

Abstrakt.....	5
Abstract.....	6
1. Úvod.....	9
1.1. Determinace pohlaví a vznik pohlavních chromozomů.....	9
1.2. Evoluce karyotypu plazů.....	12
1.3. Pohlavní chromozomy a karyotypy hadů.....	13
2. Cíle práce.....	20
3. Materiál a metodika.....	21
3.1. Výběr druhů.....	21
3.2. Odběr krevních vzorků.....	22
3.3. Izolace DNA.....	22
3.4. Charakterizace studovaných druhů pomocí DNA barcodingu.....	22
3.5. Příprava chromozomových suspenzí.....	23
3.6. Konvenční barvení Giemsou.....	24
3.7. C-pruhování.....	25
3.8. Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace.....	25
3.8.1. FISH s telomerickou sondou.....	26
3.8.2. FISH se sondou specifickou pro rDNA.....	28
3.8.3. FISH se sondami pro mikrosatelitové sekvence.....	28
3.8.4. Komparativní genomová hybridizace.....	29
3.9. Zpracování dat.....	31
4. Výsledky.....	32
4.1. DNA barcoding rodu <i>Boaedon</i>	32
4.2. Caenophidia.....	34

4.2.1.	Evoluční dynamika chromozomu W.....	34
4.2.2.	Popis karyotypů a pohlavních chromozomů u cytogeneticky nestudovaných druhů	36
4.3.	Hadi mimo skupinu Caenophidia	45
5.	Diskuse.....	58
5.1.	Popis karyotypů	58
5.2.	Evoluční dynamika W chromozomu	59
5.3.	Pohlavní chromozomy hadů mimo skupinu Caenophidia.....	61
6.	Závěr	63
7.	Použitá literatura	64

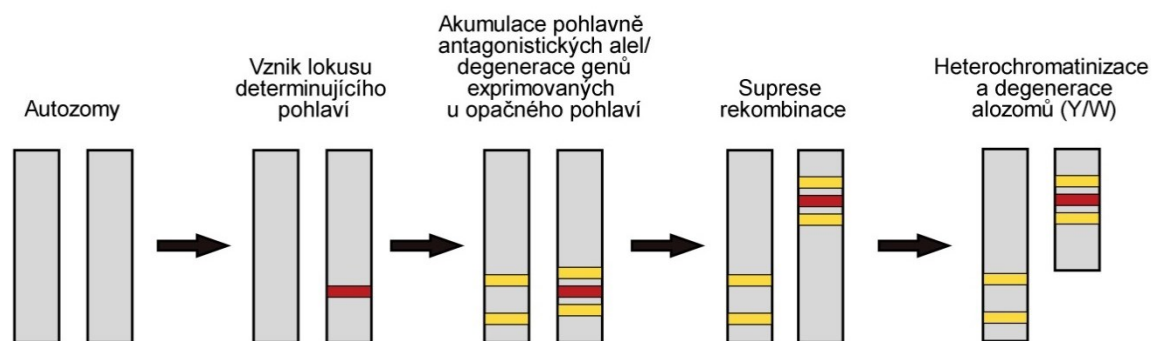
1. Úvod

1.1. Determinace pohlaví a vznik pohlavních chromozomů

V případě obratlovců rozlišujeme dva základní způsoby determinace pohlaví. Prvním z nich je environmentálně určené pohlaví (*environmental sex determination – ESD*), kdy je pohlaví potomků určeno postzygoticky v závislosti na faktorech vnějšího prostředí a poměr pohlaví potomků tak může být často vychýlený ve prospěch jen jednoho pohlaví (např. Charnov & Bull 1977; Head *et al.* 1987). Nejčastější formou ESD u obratlovců je teplotně určené pohlaví (*temperature sex determination – TSD*), kdy o pohlaví mládřat rozhoduje teplota prostředí, ve které se nachází embryo v kritické fázi svého vývoje označované jako teplotně senzitivní perioda (Mrosovsky & Pieau 1991). Pohlaví mládřat může být dáno ale i pH vody, ve které dochází k vývoji embrya. Příkladem může být druh západoafrické cichlidy *Pelvicachromis pulcher* (Reddon & Hurd 2013). U některých čeledí ryb (např. Pomacentridae či Labridae) nebývá výjimkou ani sociálně určené pohlaví (Fishelson 1998; Kazancioğlu & Alonzo 2010).

Druhým způsobem je pak genotypově určené pohlaví (*genotypic sex determination – GSD*). Rozlišujeme dva základní typy GSD, a to samčí (XX/XY) a samičí (ZZ/ZW) heterogamii. V tomto případě je pohlaví mládřat určeno v okamžiku vzniku zygoty kombinací pohlavních chromozomů (např. Ohno 1967). Poměr pohlaví je u druhů s GSD víceméně vyrovnaný (Nur 1974), avšak přítomnost pohlavních chromozomů nutně neznamená, že poměr pohlaví potomků bude 1:1. To může být dáno například pohlavně specifickou mortalitou embryí v průběhu inkubace (např. Li *et al.* 2008) nebo meiotickým tahem (např. Rutkowska & Badyaev 2008). Ancestrálním způsobem determinace pohlaví pro amniotické obratlovce je zřejmě ESD a přechod od environmentálně ke genotypově určenému pohlaví je v evoluci pravděpodobně spíše jednosměrný (Pokorná & Kratochvíl 2009; Johnson Pokorná & Kratochvíl 2016).

Ke vzniku pohlavních chromozomů – gonozomů – došlo v evoluci mnohokrát nezávisle na sobě (Ezaz *et al.* 2006; Matsubara *et al.* 2006). Obecně uznávanou hypotézou o vzniku pohlavních chromozomů je hypotéza postulovaná Susumo Ohnem, k její formulaci mu posloužilo právě studium hadů. Podle této hypotézy pohlavní chromozomy vznikají z páru autozomů (obr. 1). K tomu může dojít v okamžiku, kdy jeden z tohoto páru získá klíčový gen pro determinaci pohlaví (Ohno 1967).



Obr. 1: Vznik pohlavních chromozomů

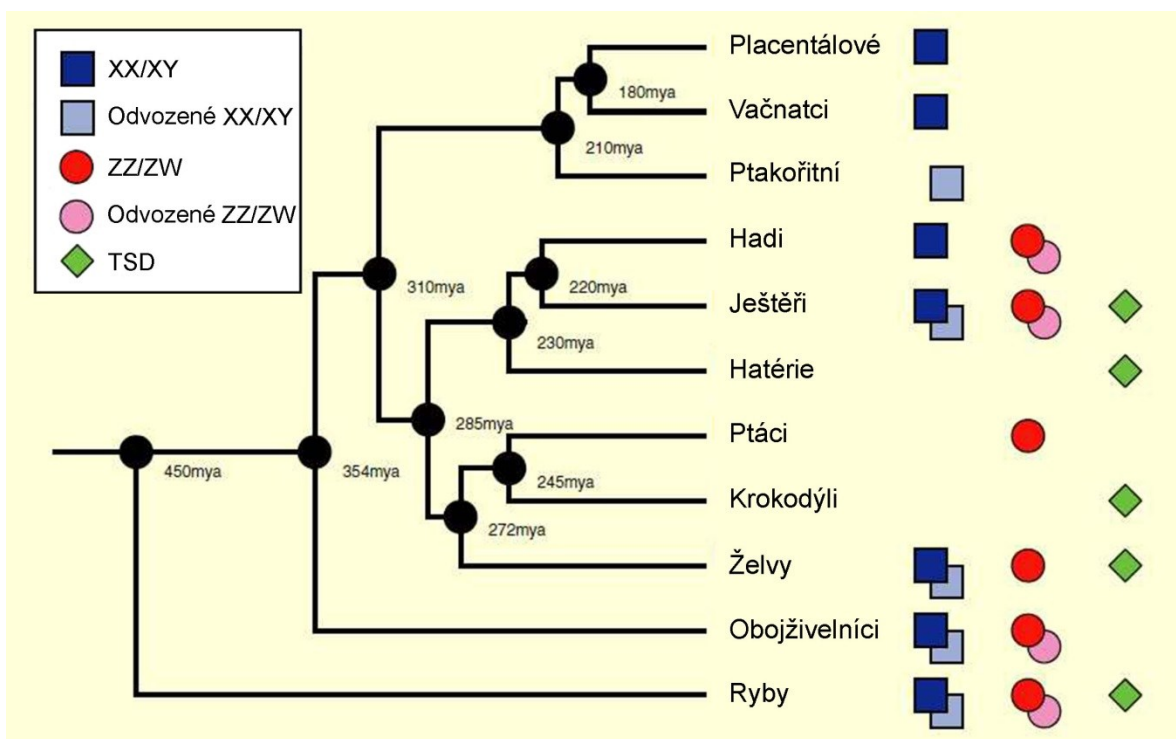
Vznik pohlavních chromozomů za vzniku lokusu determinujícího pohlaví na jednom z párů autozomů. Upraveno podle Johnson Pokorná & Kratochvíl (2016).

Další diferenciaci pohlavních chromozomů pak má dvě důležité fáze (obr. 1). Nejprve dochází k supresi rekombinace mezi vznikajícími pohlavními chromozomy (Ohno 1967). K potlačení rekombinace dochází, zejména tehdy, pokud jsou alely genů, které jsou ve vazbě s genem determinujícím pohlaví, výhodné pro jedno pohlaví a nevýhodné pro pohlaví opačné (Rice 1987; Charlesworth 1996). Zabránění rekombinace může být způsobeno například různými strukturálními přestavbami chromozomů, jako jsou translokace, inverze či delece nebo akumulace heterochromatinu (Ayling & Griffin 2002). Následkem zabránění rekombinace mezi pohlavními chromozomy dochází k degeneraci nepárového pohlavního chromozomu – alozomu (Y, W). Postupně na něm dochází ke ztrátě genů a k akumulaci repetitivních sekvencí (Charlesworth & Charlesworth 2000; Charlesworth *et al.* 2005; Herpin & Schartl 2009), včetně transpozibilních elementů (Steinemann & Steinemann 2005).

Právě akumulace repetitivních sekvencí na alozomech může hrát zásadní roli v jejich diferenciaci (O'Meally *et al.* 2010; Matsubara *et al.* 2016a). Extenzivní akumulace repetitivních sekvencí byla detekována na alozomech například u řady druhů plazů (např. Pokorná *et al.* 2011; Matsubara *et al.* 2014), neognátních ptáků (O'Meally *et al.* 2010), ryb (Nanda *et al.* 1990), na pohlavním chromozomu Y u savců (Epplen *et al.* 1982), ale i u rostlin (Kejnovsky *et al.* 2009), přičemž asi nejčastěji se jedná o akumulaci sekvence mikrosatelitů. Přestože řada skupin organismů vykazuje akumulaci stejných

či obdobných repetitivních sekvencí, vše nasvědčuje tomu, že k akumulaci došlo u jednotlivých skupin s nehomologickými pohlavními chromozomy nezávisle na sobě (Pokorná *et al.* 2011).

Stabilita v determinaci pohlaví v rámci jednotlivých linií obratlovců se, zejména pak u plazů, značně liší (obr. 2). Zatímco pro některé linie je typické právě GSD, jako je tomu například u ptáků (Ellegren 2000), jiné linie mají výlučně ESD. Takovým příkladem mohou být krokodýli (Lang & Andrews 1994). Řada linií je ale co do způsobu určení pohlaví variabilní, například želvy (Ewert & Nelson 1991), gekoni nebo agamy (Viets *et al.* 1994, Gamble 2010). U hadů závislost poměru pohlaví potomků na inkubační teplotě prokázána nebyla a podle všeho mají všichni hadi GSD (Viets *et al.* 1994; Pokorná & Kratochvíl 2009; Johnson Pokorná & Kratochvíl 2016). Právě určení pohlaví hadů a jejich pohlavní chromozomy jsou hlavním předmětem studia této práce.



Obr. 2: Pohlavní determinační systémy obratlovců

Rozložení pohlavních determinačních systémů u hlavních linií obratlovců. Upraveno podle Ezaz (2006); obrázek byl doplněn o informace získané ze studií Singh *et al.* (1970), Singh (1972a) a Gamble *et al.* (2017, v tisku).

1.2. Evoluce karyotypu plazů

Plazi obecně jsou co do uspořádání karyotypů poměrně různorodou skupinou. Přesto jsou zde rozdíly mezi jednotlivými skupinami. Želvy a krokodýli vykazují v porovnání s šupinatými plazi poměrně stabilní počet chromozomů v karyotypu (Olmo 2008). Typický a patrně také ancestrální karyotyp plazů se skládá z makrochromozomových a mikrochromozomových párů chromozomů (Norris *et al.* 2004; Olmo 2008). U řady skupin však došlo k redukci počtu mikrochromozomů nebo k jejich úplné ztrátě, tj. vzájemné fúzi ancestrálních mikrochromozomů nebo jejich fúzi s makrochromosomy. K úplné ztrátě mikrochromozomů došlo zřejmě u všech krokodýlů (Cohen & Gans 1970). K výraznému snížení počtu mikrochromozomů však došlo i u řady čeledi šupinatých plazů. Příkladem mohou být zástupci čeledi Lacertidae (Gorman 1969); nebo někteří chameleoni (Matthey & Brink 1960). U některých druhů gekonů (např. King 1987; Aprea *et al.* 1996) či scinků (např. Dallai & Talluri 1969) došlo stejně jako u krokodýlů k úplné ztrátě mikrochromozomů.

Vzhledem k variabilitě v uspořádání karyotypů napříč všemi plazími skupinami se dá předpokládat, že zejména v případě šupinatých plazů jsou za tyto rozdíly zodpovědné značné chromozomální přestavby. Na vznik chromozomálních přestaveb v průběhu vývoje karyotypů může poukazovat například přítomnost intersticiálních telomerických sekvencí (ITS). Ty se asi nejčastěji nacházejí v pericentrické oblasti chromozomů, ale k akumulaci ITS může docházet i na raménkách chromozomů (Meyne *et al.* 1990; Ventura *et al.* 2006). Akumulace telomerických sekvencí byla detekována i na nepárových pohlavních chromozomech, u plazů byly ITS pozorovány například na pohlavním chromozomu W u druhu *Pogona vitticeps* (Young *et al.* 2013) nebo u gekona *Underwoodisaurus milii* (Pokorná *et al.* 2014). U šupinatých plazů byla přítomnost ITS potvrzena u více než 30 druhů ze všech hlavních linií. Přestože některé linie mají větší tendenci k akumulaci ITS (např. Teiidae či Gymnophthalmidae), jejich výskyt je ale víceméně náhodný (Rovatsos *et al.* 2015a). V poslední době se však ukazuje, že přítomnost ITS nemusí být nutně dána chromozomálními přestavbami, ale za jejich přítomnost může být zodpovědná telomerázová aktivita (Nergadze *et al.* 2007; Ruiz-Herrera *et al.* 2008).

Kromě telomerických sekvencí bývají v genomech akumulovány i například geny pro ribozomální DNA (rDNA), jejich umístění může také indikovat možné chromozomální přestavby (např. Leaché & Sites 2010). Stejně jako v případě ITS může dojít i v případě

rDNA k akumulaci na alozomech. U plazů byla rDNA detekována na W chromozomu želvy *Pelodiscus sinensis* (Kawai *et al.* 2007).

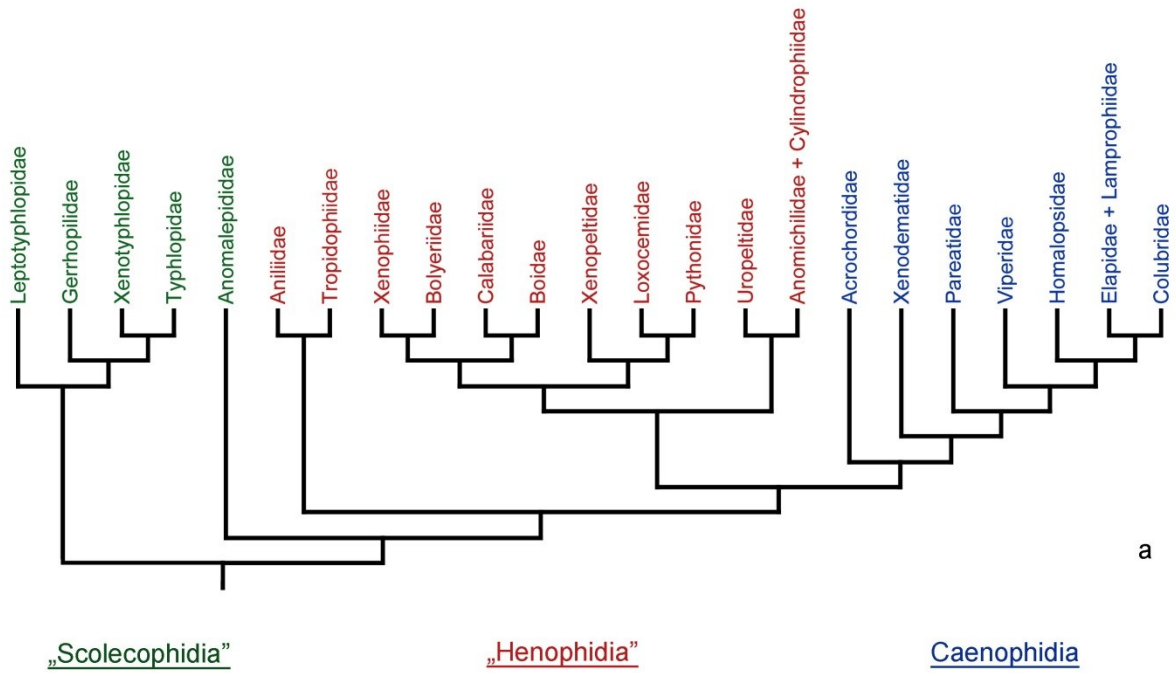
Kromě toho může na chromozomech docházet také k akumulaci mikrosatelitových sekvencí. Ty jsou typické zejména pro alozomy (O'Meally *et al.* 2010; Matsubara *et al.* 2016a), nicméně k jejich akumulaci může dojít i na autozomech, a to nejčastěji v terminální oblasti chromozomů (u plazů Pokorná *et al.* 2011; např. u ryb Cioffi *et al.* 2012; Poltronieri *et al.* 2013).

1.3. Pohlavní chromozomy a karyotypy hadů

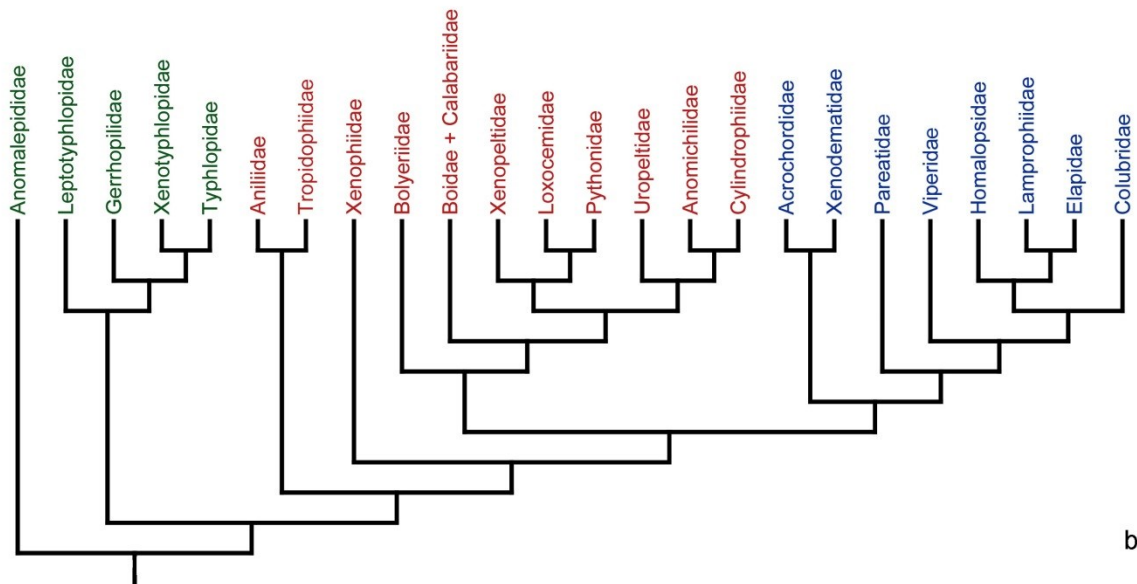
Moderní hadi čítají více než 3600 druhů (Uetz *et al.* 2017). Karyotyp byl popsán u více než 400 druhů (Olmo & Signorino 2005). Typický karyotyp obsahuje v diploidním stavu 36 chromozomů s 16 makrochromozomy a 20 mikrochromozomy, vyskytuje se u naprosté většiny studovaných druhů napříč fylogenetickým spektrem a pravděpodobně se jedná o ancestrální stav (Oguiura *et al.* 2009).

Hadi (Serpentes) jsou vnitřní skupinou šupinatých plazů (Squamata) starou asi 120 milionů let (Harrington & Reeder 2017). Jejich nejbližšími příbuznými jsou ještěři ze skupin Anguimorpha a Iguania, se kterými jsou řazeni do skupiny Toxicofera (Wiens *et al.* 2012; Pyron *et al.* 2013; Zheng & Wiens 2016).

Ve starších pracích byli hadi tradičně rozdělováni do tří vývojových linií: Scolecophidia, Henophidia a Caenophidia (např. Heise *et al.* 1995). S rozvojem molekulárních metod došlo ke změně pohledu na hadí fylogenezi, a přestože se jednotlivé práce mezi sebou odlišují, ukazuje se, že skupina „Scolecophidia“ podle všeho není monofyletická (Pyron *et al.* 2013; Zheng & Wiens 2016; Harrington & Reeder 2017). Vztahy mezi liniemi uvnitř monofyla ostatních hadů (Alethinophidia), také nejsou zcela rozřešeny. Původně byli Alethinophidia rozdělováni na dvě skupiny: „Henophidia“ a Caenophidia (Heise *et al.* 1995). V současnosti se však ukazuje, že skupina „Henophidia“ je – stejně jako skupina „Scolecophidia“ – parafyletická (Pyron *et al.* 2013; Zheng & Wiens 2016; Harrington & Reeder 2017) a vztahy mezi čeleděmi uvnitř této skupiny nejsou ustálené (obr. 3a,b). Vzhledem k tomu, že fylogenetické vztahy uvnitř skupin „Scolecophidia“ a „Henophidia“ jsou stále nerozřešené (viz obr. 3), bývají tyto termíny pro zjednodušení stále používány (např. Hsiang *et al.* 2015; Matsubara *et al.* 2016).



a



b

Obr. 3: Fylogenetické vztahy uvnitř skupiny Serpentes

(a) fylogeneze hadích čeledí podle Zheng & Wiens (2016); (b) fylogeneze hadů podle Pyron *et al.* (2013).

Skupina Caenophidia zahrnuje téměř 90 % všech druhů moderních hadů (Uetz *et al.* 2017), podle studie Pyron *et al.* 2013 zahrnuje osm čeledí (Acrochordidae, Colubridae, Elapidae, Homalopsidae, Lamprophiidae, Pareasidae, Viperidae a Xenodermatidae), přičemž největší druhová bohatost náleží čeledi Colubridae, která je tvořena bezmála jednou polovinou všech recentních druhů hadů (Uetz *et al.* 2017). U hadů skupiny Caenophidia je asi nejvíce diskutována pozice čeledi Acrochordidae, tj. bradavičníků. Některé práce staví čeleď Acrochordidae jako sesterskou čeledi Xenodermatidae (obr. 3b) (Kelly *et al.* 2003; Pyron *et al.* 2013), v jiných pracích je však čeleď Acrochordidae sesterskou všem zbývajícím čledím skupiny Caenophidia (obr. 3a) (Slowinski & Lawson 2002; Pyron *et al.* 2011, 2014; Zheng & Wiens 2016).

Naprostá většina cytogeneticky studovaných druhů patří do skupiny Caenophidia (Olmo & Signorino 2005). Obecně se hadi vyznačují poměrně velkou stabilitou v uspořádání genomu (Olmo 2008). Příkladem skupiny hadů s velmi konzervativním karyotypem může být podčeleď Crotalinae (Viperidae), všechny studované druhy této podčeledi mají v diploidním stavu 36 chromozomů, vždy s 16 makro- a 20 mikrochromozomy, jejich chromozomy jsou si navíc morfologicky velmi podobné (Olmo & Signorino 2005). Na druhou stranu, i přes morfologickou podobnost chromozomů mezi jednotlivými druhy, není vyloučena možnost vzniku kryptických chromozomálních přestaveb, jako jsou translokace, inverze, duplikace či delece.

Přestože je pro většinu doposud studovaných druhů skutečně typický karyotyp obsahující 36 chromozomů s 16 makro- a 20 mikrochromozomy (Oguiura *et al.* 2009), změny v počtu chromozomů v karyotypu se vyskytují u řady hadích skupin, zejména pak u druhů čeledí Colubridae a Elapidae (Olmo 2005). U mnohých druhů došlo ke snížení počtu chromozomů. Příkladem může být druh z čeledi Typhlopidae, *Typhlops brongersmianus*, který má v diploidním stavu 34 s 16 makro- a 18 mikrochromozomy (Ruiz García & Hernando 2007) nebo *Micrurus elegans* z čeledi Elapidae, který má v diploidním stavu jen 30 chromozomů s 16 makro- a 14 mikrochromozomy (Gutiérrez *et al.* 1988). Dalším příkladem druhu, u kterého došlo ke snížení počtu chromozomů je *Xenodermus javanicus* (Xenodermatidae), který má v diploidním stavu 32 chromozomů s 14 makro- a 18 mikrochromozomy. Zde zřejmě došlo k fúzi dvou párů makrochromozomů a k fúzi jednoho páru makrochromozomů s párem mikrochromozomů (Rovatsos *et al.* 2015b). Karyotyp s nejnižším počtem chromozomů ($2n = 24$) byl popsán

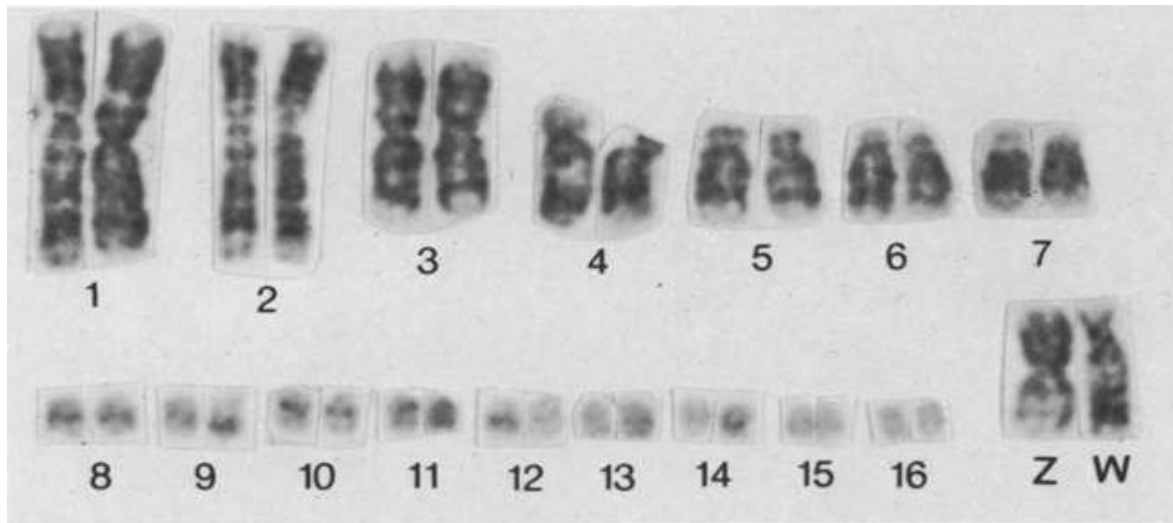
u tří druhů čeledi Colubridae. Konkrétně se jedná o druhy *Achalinus spinalis* (Xenodermatidae) (Ota *et al.* 1991), *Hydrodynastes bicinctus* a *Hydrodynastes gigas* (Colubridae) (Beçak & Beçak 1969). U všech tří zmíněných druhů karyotyp obsahoval 16 makro- a 8 mikrochromozomů. Ke snížení počtu chromozomů mohlo dojít fúzí mikrochromozomových párů s některými páry makrochromozomovými. Naopak k navýšení počtu chromozomů došlo například u druhu *Hydromorphus concolor*, rovněž z čeledi Colubridae, který má v diploidním stavu 46 chromozomů s 16 makro- a 30 mikrochromozomy (Solórzano *et al.* 1989). Nejvyšší počet chromozomů v diploidním stavu byl dokumentován u druhu *Sordellina punctata* ($2n = 52$) (Becak *et al.* 1990 ex Olmo & Signorino 2005), nicméně Oguiura *et al.* (2009) uvádí, že u některých druhů rodu *Apostolepis* byl zaznamenán počet chromozomů v diploidním stavu dokonce 56 a vyšší (Oguiura *et al.* 2009, nepublikovaná data Batistic & Ferrarezzi).

Jak již bylo zmíněno dříve, vzhledem k tomu, že u hadů nebyla prokázána závislost poměru pohlaví potomků na inkubační teplotě, mají zřejmě všichni hadi genotypově určené pohlaví (Viets *et al.* 1994; Pokorná & Kratochvíl 2009; Johnson Pokorná & Kratochvíl 2016). Přestože se některé skupiny šupinatých plazů vyznačují poměrně velkou variabilitou v determinaci pohlaví (shrnutu v Sarre *et al.* 2004), hadi jsou zřejmě v tomto ohledu skupinou poměrně stabilní. U všech hadů se tradičně předpokládá samičí heterogamie, tedy ZW pohlavní determinační systém (Oguiura *et al.* 2009). Nejvíce diferencované pohlavní chromozomy se podle všeho nacházejí u druhů z čeledi Viperidae (Matsubara *et al.* 2006). U některých druhů čeledi Elapidae byly dokonce popsány i karyotypy s odvozeným systémem pohlavních chromozomů (např. Singh *et al.* 1970; Singh 1972a). Konkrétním příkladem mohou být druhy *Enhydrina schistosa* ($2n$ samice = 33, $2n$ samce = 32) (Ray-Chaudhuri *et al.* 1971, Singh 1972b), *Hydrophis cyanocinctus* ($2n$ samice = 33, $2n$ samce = 32) či *Hydrophis fasciatus* ($2n$ samice = 35, $2n$ samce = 34), u kterých byly popsány pohlavní chromozomy ZW_1W_2 (Singh 1972a). Kromě odvozeného systému pohlavních chromozomů ZW_1W_2 byly popsány pohlavní chromozomy Z_1Z_2W , a to například u bungara *Bungarus caeruleus* ($2n$ samice = 43, $2n$ samce = 44) (Singh *et al.* 1970).

Diferencované pohlavní chromozomy však byly dosud pozorovány pouze u hadů ze skupiny Caenophidia (Matsubara *et al.* 2006, Oguiura *et al.* 2009, Vicoso *et al.* 2013). U druhů mimo tuto skupiny pohlavní chromozomy ZW nebyly pozorovány (Oguiura *et al.*

2009, Viana *et al.* 2016). Jedinou výjimkou je madagaskarský hroznýš *Acrantophis dumerili*, u kterého na počátku 80. let minulého století diferencované pohlavní chromozomy popsány byly (obr. 4). Karyotyp samice tohoto druhu obsahuje poměrně výrazný subtelocentrický W chromozom a podobně velký metacentrický chromozom Z. Tento rozdíl je zřejmě zapříčiněn pericentrickou inverzí (Mengden & Stock 1980). U zbývajících hadích druhů se až do nedávna pouze předpokládalo, že jejich pohlavní chromozomy jsou homologické s pohlavními chromozomy skupiny Caenophidia, jen nejsou dostatečně diferencovány (Matsubara *et al.* 2006, Vicoso *et al.* 2013; Gamble *et al.* 2017, v tisku), přestože slabě diferencované pohlavní chromozomy mohou být značně nestabilní (Perrin 2009). Teprve v současné době však bylo prokázáno, že minimálně u čeledí Boidae (*Boa imperator*) a Pythonidae (*Python bivittatus*) se vyskytují pohlavní chromozomy XY/XX (Gamble *et al.* 2017, v tisku), což potvrzuje některé dřívější práce, které naznačovaly, že by se právě tyto skupiny mohly v pohlavních chromozomech od skupiny Caenophidia odlišovat (viz např. Booth *et al.* 2011; Mallery & Carrillo 2016). Navíc bylo zjištěno, že pohlavní chromozomy Y kraitů a hroznýšů podle všeho nejsou homologické a jejich vznik je tak nezávislý (Gamble *et al.* 2017, v tisku). Pohlavní chromozomy zbývajících hadů mimo skupinu Caenophidia tak zůstávají stále dosti nerozřešenou hádankou. Na skutečnost, že pohlavní chromozomy těchto hadích linií nejsou homologické s pohlavními chromozomy hadů skupiny Caenophidia, poukazuje i nedávná studie zabývající se homologií Z chromozomu napříč celým fylogenetickým spektrem moderních hadů (Rovatsos *et al.* 2015c). Hadí pohlavní chromozom Z je syntenní s šestým chromozomovým párem modelového druhu ještěra *Anolis carolinensis* a většina genů přítomných na Z chromozomu chybí na chromozomu W (Vicoso *et al.* 2013). Toho bylo využito k testování stability hadích pohlavních chromozomů pomocí metody qPCR (Rovatsos *et al.* 2015c). Na základě výsledků této studie bylo ukázáno, že u hadů skupiny Caenophidia je Z chromozom skutečně homologický a to u všech jejích čeledí: Acrochordidae, Colubridae, Elapidae, Homalopsidae, Lamprophiidae, Preatidae, Viperidae a Xenodermatidae. Oproti tomu u studovaných hadů mimo skupinu Caenophidia (testováni byli zástupci čeledí Boidae, Erycidae, Pythonidae, Sanziniidae a Xenopeltidae) se Z-specifické geny hadů skupiny Caenophidia nacházejí v pseudoautosomální či autosomální oblasti (Rovatsos *et al.* 2015c). Totéž platí i pro nejbližší studované příbuzné skupiny s diferencovanými pohlavními chromozomy, konkrétně pro varany (King

& King 1975; Matsubara *et al.* 2014), chameleony (Rovatsos *et al.* 2015d) a leguány (Viets *et al.* 1994). Zatím tedy s určitostí víme, že ZW pohlavní chromozomy hadů jsou homologické v rámci skupiny Caenophidia, kde byly diferencovány už u společného předka této skupiny (Rovatsos *et al.* 2015c), tedy někdy před 60 miliony lety (Hsiang *et al.* 2015).



Obr. 4: Karyogram samice madagaskarského hroznýše *Acrantophis dumerili*
Převzato z Mengden & Stock (1980).

V porovnání s chromozomem Z hadů skupiny Caenophidia nebyla věnována degenerovanému chromosomu W taková pozornost. U jednotlivých druhů se W chromozom liší v relativní velikosti vůči zbývajícím chromozomům v karyotypu. Je vždy heterochromatizovaný a jednotlivé druhy se liší ve velikosti heterochromatické oblasti (Bečak & Bečak 1969, Vicoso *et al.* 2013). Na degenerovaném hadím W chromozomu dochází ke ztrátám funkčních genů a akumulují se zde repetitivní sekvence, případně i transpozony (Vicoso *et al.* 2013). Asi nejznámější repetitivní element vyskytující se nejen na W chromozomu hadů je tandem mikrosatelitových motivů $(GATA)_n$ a $(GACA)_n$, který byl poprvé izolován z druhu *Bungarus fasciatus* (Elapidae) a podle kterého také získal svůj název - banded krait minor-satellite (*Bkm*) (Singh *et al.* 1980; Epplen *et al.* 1982). Tyto repetitivní sekvence se vyskytují na nepárových degenerovaných pohlavních chromozomech mnohých obratlovců včetně člověka (Jones & Singh 1981;

Eppelen *et al.* 1982; Arnemann *et al.* 1986). U hadů byly tyto motivy pozorovány na W chromozomu u druhů čeledí Viperidae, Elapidae, Colubridae (Singh *et al.* 1980) a Xenodermatidae (Rovatsos *et al.* 2015b). U hadů mimo skupinu Caenophidia akumulace motivu *Bkm* na pohlavních chromozomech pozorována nebyla (Singh *et al.* 1980). Je možné, že právě akumulace repetitivních *Bkm* na pohlavních chromozomech hraje zásadní roli při jejich diferenciaci (Subramanian *et al.* 2003, O'Meally *et al.* 2010) a množství akumulovaných repetitivních *Bkm* podle všeho pozitivně koreluje s mírou degenerace W chromozomu (O'Meally *et al.* 2010).

2. Cíle práce

Jedním z hlavních cílů této práce bylo otestovat evoluční dynamiku repetitivních sekvencí na chromozomu W u hadů skupiny Caenophidia. U těchto hadů byla potvrzena vysoká stabilita chromozomu Z napříč celým fylogenetickým spektrem (Rovatsos *et al.* 2015c), dynamika obsahu chromozomu W této skupiny však nebyla dosud testována.

Druhým hlavním cílem bylo pokusit se pomocí molekulárně cytogenetických metod detekovat pohlavně specifické rozdíly mezi samčím a samičím karyotypem u hadů mimo skupinu Caenophidia a pokusit se tak odhalit možné pohlavní chromozomy. Tito hadi mají homomorfní pohlavní chromozomy, a proto je není možné odhalit klasickými cytogenetickými metodami (Mengden & Stock 1980; Oguiura *et al.* 2009, Viana *et al.* 2016)

Vedlejším cílem bylo popsat karyotypy a pohlavní chromozomy u doposud cytogeneticky nestudovaných druhů.

3. Materiál a metodika

3.1. Výběr druhů

V práci je zahrnuto celkem 17 druhů hadů (tab. 1). Jednotlivé druhy byly vybrány z hlediska jejich dostupnosti a fylogenetického postavení. V rámci skupiny Caenophidia bylo celkem zkoumáno 11 druhů a to z čeledí Acrochordidae, Colubridae, Homalopsidae, Lamprophiidae a Xenodermatidae. U hadů mimo skupinu Caenophidia bylo zkoumáno celkem šest druhů, přičemž pět druhů patří do čeledi Boidae. Jediný zkoumaný druh mimo tuto skupinu je *Calabaria reinhardtii* (Calabariidae).

Pro práci bylo potřeba odebrat zkoumaným jedincům dostatečné množství čerstvé krve. Vzorky byly získány zejména díky spolupráci se Zoologickou zahradou v Plzni, Stanicí chovatelů Domu dětí a mládeže hl. m. Prahy na Smíchově a se soukromými chovateli.

Tab. 1: Seznam studovaných druhů a použitých cytogenetických a molekulárně cytogenetických technik

C-pruhování (C), FISH s telomerickou sondou (TELO), FISH se sondou pro rDNA (rDNA), FISH s mikrosatelitovými motivy (GATA)_n, (GACA)_n a (AC)_n (GATA, GACA, AC), komparativní genomová hybridizace (CGH).

Druh	Čeleď	Počet sameců	Počet samic	Použité techniky
Caenophidia				
<i>Lampropeltis ruthveni</i>	Colubridae	0	1	C, TELO, GATA, GACA, AC
<i>Lampropeltis triangulum</i>		0	1	C, TELO, GATA, GACA, AC
<i>Pantherophis guttatus</i>		0	2	C, TELO, GATA, GACA, AC
<i>Elaphe bimaculata</i>		0	3	C, TELO, GATA, GACA, AC
<i>Zamenis situla</i>		0	1	C, TELO, GATA, GACA, AC
<i>Homalopsis buccata</i>	Homalopsidae	1	1	C, TELO, GATA, GACA, AC
<i>Boaedon</i> sp. 1	Lamprophiidae	2	4	C, TELO, GATA, GACA, AC
<i>Boaedon</i> sp. 2		1	2	C, TELO, GATA, GACA, AC
<i>Boaedon</i> sp. 3		1	1	C, GATA, GACA, AC
<i>Xenodermus javanicus</i>	Xenodermatidae	0	1	GACA, AC
<i>Acrochordus javanicus</i>	Acrochordidae	1	3	C, TELO, GATA, GACA, AC
Booidea				
<i>Acrantophis dumerili</i>	Boidae	3	7	C, TELO, GATA, rDNA
<i>Acrantophis madagascariensis</i>		1	2	C, TELO, GATA, rDNA
<i>Sanzinia madagascariensis</i>		3	1	C, TELO, GATA, rDNA, CGH
<i>Candoia paulsoni</i>		1	1	C, TELO, GATA, rDNA, CGH
<i>Lichanura trivirgata</i>		1	1	C, TELO, GATA, rDNA, CGH
<i>Calabaria reinhardtii</i>	Calabariidae	1	2	C, TELO, GATA, rDNA, CGH

3.2. Odběr krevních vzorků

K odběru periferní krve byly použity sterilní inzulinové stříkačky s integrovanou jehlou. Stříkačka byla naplněna přibližně třemi jednotkami heparinu. Krev byla odebírána z ocasní žíly. Množství odebrané krve se odvíjelo od velikosti daného jedince, obvykle se pohybovalo v rozmezí od 100 do 400 μl .

3.3. Izolace DNA

DNA byla izolována z čerstvé krve pomocí izolačního kitu DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen). Do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml s 2-3 kapkami krve bylo přidáno 180 μl sterilního PBS (fosfátový pufr), 20 μl proteinázy K a 4 μl RNasy A (100 mg/ml). Obsah zkumavky byl následně promíchán a inkubován dvě minuty při pokojové teplotě. Poté bylo přidáno 200 μl AL pufru, díky němuž dochází k lýzi buněk. Obsah zkumavky byl opět promíchán a inkubován při teplotě 56 °C po dobu 30 až 60 minut až do úplného rozpuštění krevního vzorku.

Posléze bylo do zkumavky přidáno 200 μl 96% etanolu. Obsah zkumavky byl protřepán a přenesen do kolonky pro izolaci DNA (DNeasy Mini spin column) a centrifugován 1 minutu při 8000 rpm. Poté byla kolonka přesunuta do nové zkumavky, bylo přidáno 500 μl promývacího pufru AW1 (pro odstranění proteinů) a centrifugována 3 minuty při 14000 rpm. Kolonka byla opět přesunuta do čisté zkumavky a bylo přidáno 500 μl promývacího pufru AW2 (pro odstranění solí). Následovala centrifugace 1 min při 8000 rpm k odstranění zbytkového etanolu. Poté byla kolonka přesunuta do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml. Bylo přidáno 100 μl AE pufru (k uvolnění DNA z kolonky) a po pěti minutách centrifugováno 1 minutu při 8000 rpm.

3.4. Charakterizace studovaných druhů pomocí DNA barcodingu

DNA barcoding je metoda, díky které je na základě molekulárních dat možné odlišit kryptické druhy či identifikovat studované druhy, využití nachází ale například i v populační genetice. Zpravidla se sekvenuje krátký úsek mitochondriální DNA, typicky se jedná o cytochrom oxidázu I (COXI) (Hebert *et al.* 2003; Hajibabaei *et al.* 2007).

V tomto případě byl DNA barcoding použit pro charakterizaci druhů rodu *Boaedon*, a to toho důvodu, že se jedná o složitý druhový komplex (Greenbaum *et al.* 2015).

Vzhledem k předchozí studii a dostupnosti sekvencí v online databázi Genbank byla pro identifikaci druhů použita sekvence pro cytochrom b.

Amplifikace zvoleného úseku DNA byla provedena pomocí PCR (polymerázové řetězové reakce) za použití specifických primerů L14910 a H16064 (tab. 2). PCR mix byl připraven jako směs 1 µl primerů (koncentrace 10 %), 5 µl PCR pufru, 2,5 µl MgCl₂, 2 µl nukleotidů (směs deoxynukleosid trifosfátů: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0,5 µl Taq polymerázy a 37,5 µl sterilní vody (miliQ H₂O). Uvedené množství odpovídá dvěma PCR reakcím. Ke každé reakci bylo přidáno 0,5 µl templátové DNA. Celkový objem jedné PCR reakce byl tedy 25 µl.

PCR reakce probíhala v cykléru ve 35 cyklech. Na počátku došlo k denaturaci DNA při teplotě 94 °C a to po dobu 3 min. Následně pak každý cyklus zahrnoval denaturaci DNA při 94 °C po dobu 40 s, nasedání specifických primerů při teplotě 47 °C po 40 s a fázi elongace při 72 °C po dobu 60 s. V posledním cyklu byla doba elongace o 5 min prodloužena. Následně byl produkt PCR uchováván při teplotě 4 °C. Funkčnost PCR reakce byla ověřena elektroforézou na 1% agarosovém gelu. PCR produkty byly následně odeslány na obousměrnou sekvenaci (*Macrogen*, Korea).

Tab. 2: Tabulka použitých primerů pro cytochrom b

Název primeru	Sekvence primeru 5'→3'	Směr primeru	Reference
L14910	GACCTGTGATMTGAAAACCA YCGTTGT	dopředný	(de Queiroz <i>et al.</i> 2002)
H16064	CTTTGGTTTACAAGAACAATGCTTTA	reverzní	(Burbrink <i>et al.</i> 2000)

3.5. Příprava chromozomových suspenzí

Chromozomové suspenze byly připraveny prostřednictvím kultivace leukocytů za použití čerstvé periferní krve. Vzhledem k tomu, že leukocyty periferní krve nejsou schopny spontánního mitotického dělení, bylo potřeba zajistit iniciaci mitotické aktivity. K tomuto účelu je při kultivaci leukocytů periferní krve do živného média přidáván fytohemaglutinin, rostlinný lektin extrahovaný z fazole *Phaseolus vulgaris* (Nowell 1960).

Živné médium pro kultivaci leukocytů bylo připraveno při pokojové teplotě ve sterilním laminárním boxu. Pro přípravu média o objemu 100 ml bylo použito 90 ml základního média D-MEM (Sigma-Aldrich; M2154), 10 ml fetálního telecího séra (Baria; S 0125), 3 ml fytohemaglutininu M (GIBCO; 10576-015), 1 ml penicilinu/streptomycinu (Sigma-Aldrich; A5955), 1 ml L- glutaminu (Sigma-Aldrich; K1377) a 1 ml lipopolysacharidu (Sigma-Aldrich; L4005). Takto připravené médium bylo přeneseno do sterilní lahve a řádně promícháno. Následně bylo médium přeneseno po 5 ml do 15ml falkonek a do každé zkumavky pak bylo po kapkách přidáno přibližně 100 až 200 μ l krve. Takto připravené zkumavky pak byly inkubovány jeden týden při teplotě 30 °C. Čtvrtý den inkubace byl obsah zkumavek šetrně promíchán.

Osmý den kultivace, před samotným sklizením buněk, bylo do každé zkumavky přidáno 35 μ l kolcemidu (Roche; 10295892001), obsah zkumavek byl promíchán a ponechán ještě 3,5 h v inkubátoru při 30 °C. Díky přidání kolcemidu dochází k zastavení buněčného dělení ve fázi metafáze. Po dvou hodinách byl obsah zkumavek opět promíchán. Po uplynutí 3,5 h byly zkumavky centrifugovány při pokojové teplotě s rychlostí 1200 rpm po dobu 10 min. Poté byl pomocí skleněné pipety odstraněn supernatant a bylo přidáno přibližně 5 ml hypotonizačního roztoku 0.075M KCl předeštěného na 37 °C. Obsah zkumavky byl šetrně promíchán a umístěn do inkubátoru vyhřátého na 37 °C na dobu 30 min. Poté bylo do každé zkumavky přidáno přibližně 500 μ l čerstvě připraveného fixačního roztoku (metanol : kyselina octová = 3:1) k zastavení hypotonizace. Obsah zkumavky byl promíchán a stočen na centrifuze vychlazené na 4 °C při 1200 rpm po dobu 10 minut. Následovala první kolo fixace. Supernatant byl opět odstraněn pomocí skleněné pipety a do zkumavek bylo přidáno přibližně 5 ml fixačního roztoku, peleta byla opatrně rozmíchána za použití skleněné pipety. Zkumavky byly na 20 min přesunuty do ledničky (4 °C) a následně centrifugovány při teplotě 4 °C po dobu 10 min s rychlostí 1200 rpm. Podle velikosti pelety byly provedeny 3 – 4 kola fixace. Po posledním kole fixace byla suspenze zahuštěna a uchovávána při teplotě -20 °C.

3.6. Konvenční barvení Giemsou

Podložní skla byla odmaštěna za použití čistého 96% etanolu. Na čistá, odmaštěná skla byly nanášeny dvě kapky chromozomální suspenze (přibližně 15 μ l na kapku).

Po zaschnutí vzorků byla skla barvena pomocí Giemsy. V tomto případě byl použit 3% roztok Giemsy. Skleněná kyveta o objemu 100 ml byla naplněna fosfátovým pufrem (4,5 g KH_2PO_4 + 4,7 g Na_2HPO_4 ve 1000 ml destilované vody, pH = 6,8), byly přidány 3 ml Giemsy a roztok byl důkladně promíchán. Sklíčka byla v roztoku ponechána po dobu 15 minut, následně byla opláchnuta ve fosfátovém pufru a destilované vodě.

3.7. C-pruhování

C-pruhování je klasická cytogenetická metoda využívaná k vizualizaci konstitutivního heterochromatinu (Sumner 1972), který se obvykle nachází zejména v centromerických oblastech chromozomů. Častým využitím této metody je detekce diferencovaných pohlavních chromozomů díky akumulaci konstitutivního heterochromatinu na diferencované části nepárového pohlavního chromozomu.

Chromozomální suspenze (kapka o objemu cca 15 μl) byla nanesena na čistá a odmaštěná podložní skla. Po zaschnutí byla skla na dobu 60 minut přenesena na topnou plotýnku nahřátou na teplotu 60 °C. Vychladnutá skla byla následně vložena do kyvety s 0,2M roztokem HCl a inkubována 30 minut při pokojové teplotě. Poté byla skla důkladně propláchnuta v kohoutkové vodě a nakonec i ve vodě destilované. Následovala inkubace v 5% $\text{Ba}(\text{OH})_2$ po dobu pěti minut při teplotě 45 °C. Poté byla skla na 2 sekundy vložena do roztoku s 0,2M HCl a několikrát opět propláchnuta kohoutkovou vodou a destilovanou vodou. V posledním kroku renaturace byla skla vložena na 60 minut do roztoku 2x SSC (*saline-sodium citrate* – citrát sodný) předehřátého ve vodní lázni na 60 °C. Následně byla skla opláchnuta v destilované vodě a usušena při pokojové teplotě. Nakonec byly vzorky obarveny pomocí roztoku Vectashield (Vector Laboratories), obsahujícího DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol).

3.8. Fluorescenční *in situ* hybridizace

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) je molekulárně cytogenetická metoda, která umožňuje vizualizovat specifické sekvence DNA přímo na metafázních chromozomech. Tato metoda je založená na schopnosti specifické hybridizace fluorescenčně označeného jednořetězcového úseku DNA s komplementární DNA na chromozomu (shrnutí např. v Trask 1991).

Ve všech případech fluorescenční *in situ* hybridizace byla sklíčka připravována obdobným způsobem jako v případě C-pruhování. Před nakapáním chromozomové suspenze byla sklíčka odmaštěna pomocí 96% etanolu. Na každé sklíčko byly obvykle nanесeny 2 kapky suspenze (objem jedné kapky byl přibližně 15 μ l) a po zaschnutí byla sklíčka přenesena na topnou plotýnku nahřátou na teplotu 60 °C po dobu alespoň 45 min, případně byla ponechána minimálně jeden den v inkubátoru při teplotě 37 °C.

3.8.1. FISH s telomerickou sondou

Fluorescenční *in situ* hybridizace s telomerickou sondou byla použita k vizualizaci konzervativní telomerické sekvence (TTAGGG)_n, která je typická pro telomerické oblasti obratlovců (Meyne *et al.* 1989). Tato sekvence se ale může vyskytovat i mimo terminální oblast telomer, jedná se pak o intersticiální telomerickou sekvenci (ITS). K tomu může dojít například kvůli chromozomálním přestavbám (Ashley & Ward 1993; Ventura *et al.* 2006).

Telomerická sonda (TTAGGG)_n byla připravena pomocí PCR. Byly použity primery (TTAGGG)₅ a (CCCTAA)₅ a PCR proběhla bez DNA templátu. V průběhu PCR reakce byla sonda označena dUTP-biotinem (1 mM), který je detekovatelný pomocí primární protilátky avidin-FITC. Na jednu PCR reakci o objemu 50 μ l bylo použito 0,4 μ l každého primeru (5 pmol/ μ l), 5 μ l PCR pufru pro Taq polymerázu (Bioline), 2,5 μ l MgCl₂ (50 mM), 1 μ l směsi deoxynukleotidů obsahující dATP, dCTP, dGTP (10 mM každý), 0,7 μ l dTTP (10 mM), 1 μ l dUTP-biotinu (1 mM) a 1 μ l BioTaq DNA polymerázy (5 U/ μ l, Bioline). Do konečného objemu 50 μ l byla směs doplněna sterilní vodou, miliQ H₂O.

PCR reakce byla započata denaturační fází při 94 °C po dobu 5 min. Poté proběhlo 10 cyklů, kdy každý cyklus obsahoval 1 min denaturace DNA při 94 °C, nasedání primerů 30 s při 60 °C a 1 s elongace řetězce při 72 °C a následovalo 30 cyklů, kde teplota pro nasedání primerů byla zvýšena na 60 °C a doba prodlužování řetězce zkrácena na 30 s. V posledním kroku byla fáze elongace prodloužena o 5 min. Výsledek PCR reakce byl následně ověřen na 1% agarózovém gelu.

Následně byla k produktu PCR přidána kompetitorová DNA z lososích spermií, kvasinkové RNA a NaCl (5M). Produkt byl přečištěn za použití 100% etanolu. Nakonec byl rozpuštěn v 300 μ l hybridizačního pufru (50% formamid v 2 \times SSC). Takto připravená

sonda byla skladována v mrazáku (-20 °C), před použitím byla denaturována při 73 °C po dobu 6 minut a poté byla přemístěna zpět do -20 °C alespoň na dobu 10 min.

Předpřipravená sklíčka byla nejprve opláchnuta v roztoku 2xSSC. Aby došlo k odstranění RNA, byla sklíčka ošetřena pomocí RNázy (100 mg/ml) (37 °C). Následně byla třikrát po dobu 5 min opláchnuta v 2xSSC a byl přidán pepsin (0,01%) (při 37 °C) pro odstranění proteinů. Poté byla sklíčka třikrát omyta v roztoku PBS a následně inkubována 10 minut v 1% roztoku formaldehydu (2,7 ml 37% formaldehydu, 250 µl MgCl₂ 1M, doplněno do 100 ml roztokem PBS) a opět opláchnuta v PBS. Posléze byla sklíčka dehydrována pomocí etanolové řady, nejprve byla sklíčka vložena do 70% etanolu, pak do 80% a nakonec do 96% etanolu. Sklíčka byla usušena ve vertikální poloze při pokojové teplotě. Následovala denaturace chromozomů v 70% roztoku formamidu ve vodní lázni předehřáté na 75 °C, a to po dobu 4 min. 100 ml tohoto roztoku bylo připraveno jako směs 70 ml formamidu, 10 ml 20xSSC a 20 ml ddH₂O. Následně byla sklíčka opláchnuta v 2xSSC, opět dehydrována pomocí etanolové řady a ponechána uschnout. Nakonec bylo na každou kapku na sklíčku přidáno 11 µl sondy. Skla byla překryta krycími sklíčky a inkubována přes noc při teplotě 37 °C.

Druhý den byla skla vložena do kyvety s roztokem 2xSSC, byla opatrně odstraněna krycí sklíčka a skla omyta v tomto roztoku. Aby došlo k odmytí nadbytečné sondy, byla skla následně třikrát promyta v 50% roztoku formamidu (100 ml roztoku bylo připraveno jako směs 50 ml formamidu, 10 ml 20x SSC a 40 ml destilované vody) za třepání ve vodní lázni předehřáté na 42 ° a to vždy po dobu 5 min. Poté byla skla dvakrát opláchnuta v 2xSSC a jednou v roztoku detergentu Tween-20 (4T), 1 l tohoto roztoku obsahuje 200 ml 20xSSC, 800 ml ddH₂O a 500 µl Tween-20 (Sigma). Následně byla sklíčka inkubována s 200 µl 4xSSC/5% blokátoru (Roche) při 37 °C po dobu 45 min. Pak byla sklíčka krátce opláchnuta v roztoku 4T.

Poté následovaly kroky vedoucí k detekci telomerické sekvence a zesílení fluorescenčního signálu. K tomu bylo zapotřebí dvou různých roztoků – primárních a sekundárních protilátek. Primární protilátky byly připraveny přidáním 1 µl avidin-FITC (Vector Laboratories) do 1 ml připraveného roztoku blokátoru, zatímco sekundární protilátky přidáním 10 µl biotinylovaného anti-avidinu (Vector Laboratories) do 1 ml roztoku blokátoru. Na každou kapku na sklíčku pak bylo aplikováno 100 µl protilátek. K zesílení fluorescenčního signálu byla provedena dvě kola amplifikace. To znamená,

že primární protilátky byly aplikovány třikrát a sekundární protilátky dvakrát. Během aplikace protilátek byla skříčka inkubována vždy 30 minut při teplotě 37 °C. Mezi každou aplikací protilátek byla skříčka promyta v roztoku 4T, a to třikrát vždy po dobu 5 min. Po druhé aplikaci sekundárních protilátek byla skříčka omyta v roztoku 4T a následně opláchnuta v roztoku PBS. Poté byla dehydrována za pomoci etanolové řady. Nakonec byla skříčka obarvena pomocí roztoku Vectashield (Vector Laboratories) obsahujícího DAPI.

3.8.2. FISH se sondou specifickou pro rDNA

Fluorescenční *in situ* hybridizace se sondou specifickou pro rDNA slouží k vizualizaci nukleolárních organizátorů jádérka (NOR). Tato metoda může být tak použita například k odhalení případných kryptických chromozomálních přestaveb (např. Leaché & Sites 2010).

Příprava sondy specifické pro rDNA je poměrně komplikovaná. Prvním krokem je namnožení a izolace rDNA (konkrétně 11,5 kbp DNA kódující podjednotky 18S a 28S ribozomální DNA *Drosophila melanogaster*) z plazmidu (pDmr.a 51#1) podle protokolu uvedeného v Endow (1982). Ta je následně amplifikována pomocí nick translace za využití kitu ABBOTT (07J00-001). Během nick translace byl na sondu navázán dUTP-biotin (stejně jako v případě přípravy sondy s telomerickou sekvencí). Postup samotné nick translace je podrobněji popsán v protokolu pro komparativní celogenomovou hybridizaci (CGH). Postup ošetření sklíček před i po aplikaci sondy je shodný s protokolem pro FISH s telomerickou sondou.

3.8.3. FISH se sondami pro mikrosatelitové sekvence

Fluorescenční *in situ* hybridizace se sondami s mikrosatelitovými motivy byla použita k odhalení akumulací tří mikrosatelitových sekvencí GATA, GACA a AG na W chromozomu u hadů skupiny Caenophidia. U hadů mimo tuto skupinu byla zkoumána akumulace GATA.

Postup FISH s mikrosatelitovou sondou je víceméně shodný s protokolem pro telomerickou FISH. Hlavním rozdílem je příprava samotné sondy, k té jsou použity komerčně připravené oligonukleotidy s navázaným biotinem na 5' konci (Macrogen, Korea). Tyto oligonukleotidy byly rozpuštěny v hybridizačním pufru (obsahujícího: 50%

formamid, 20xSSC, 10% SDS ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{SO}_4\text{Na}$), 10% dextran sulfát a Denhardtovo činidlo). Pro jednu kapku chromozomální suspenze je potřeba 0,3 μl oligonukleotidu rozpuštěného v 11 μl hybridizačního pufru. Další rozdíl je v post-hybridizačním ošetření sklíček. Namísto omytí sklíček v 50% formamidu byla sklíčka opláchnuta v 0,3% roztoku Nonidetu P-40 (Sigma-Aldrich) rozpuštěného v SSC, a to při 40 °C po dobu 2 min. Následně byla opláchnuta po dobu 30 s v 0,1% roztoku Nonidetu P-40 v SSC při pokojové teplotě. Ostatní kroky jsou stejné jako u FISH s telomerickou sondou.

3.8.4. Komparativní genomová hybridizace

Komparativní genomová hybridizace (CGH, *Comparative genomic hybridization*) je metoda založená na principu porovnávání celých genomů. Díky tomu mohou být odhaleny především rozdíly v sekvencích celých nebo částí chromozomů či chromozomální přestavby (du Manoir *et al.* 1993). V tomto případě byla metoda CGH použita za účelem detekce pohlavně specifických rozdílů v karyotypu u hadů mimo skupinu Caenophidia.

Sonda pro komparativní genomovou hybridizaci byla připravena stejně jako sonda v případě FISH s rDNA za použití nick translačního kitu ABBOTT (07J00-001). Pro přípravu sondy byla použita vyizolovaná DNA samce i samice daného druhu o minimální koncentraci 44 ng/ μl . Koncentrace DNA byla měřena pomocí Nanodropu. V průběhu nick translace byla sonda označena dvěma odlišnými fluorochromy – sonda specifická pro samičí genom pomocí látky dUTP- digoxigenin (detekovatelné s použitím anti- digoxigenin -Rhodaminu) a sonda specifická pro samčí genom pomocí dUTP-biotinu (detekovatelného za použití avidin-FITC). Značící nick translační směs pro samčí a samičí DNA byla připravena odděleně.

Nejprve bylo potřeba připravit směs nukleotidů se značeným dUTP. Ta obsahovala 50 μl dCTP, 50 μl dGTP, 50 μl dATP, 25 μl dTTP a 7,5 μl dUTP-biotinu nebo 7,5 μl dUTP- digoxigeninu. Značící směs byla připravena na ledu a pro jednu reakci obsahovala 23 μl vody s 1 μg DNA, 12 μl předpřipravené směsi nukleotidů (s dUTP-biotinem nebo dUTP- digoxigeninem - podle toho, zda byla připravována sonda specifická pro samčí či samičí genom), 5 μl nick translačního pufru a 10 μl nick translačního enzymu. V případě, že koncentrace používaného vzorku DNA byla vyšší než 44 ng/ μl , bylo jej potřeba naředit na požadovanou hodnotu.

Následně byla reakční směs inkubována v cykléru při 15 °C, a to 10 h. Funkčnost nick translace byla zkontrolována na 1% agarózovém gelu. Pokud se velikost sondy pohybovala v rozmezí mezi 200 a 300 bp, reakce byla ukončena navýšením teploty na 70 °C po dobu 10 min, aby došlo ke zničení enzymů a následně byla až do dalšího použití uchovávána při 4 °C. V případě, že byl produkt translace větší, než je požadovaná velikost, byla sonda opět inkubována při 15 °C a to alespoň 30 min. Poté byly produkty samčí a samičí nick translace přeneseny do stejné mikrokumavky a přečištěny za přítomnosti 50 µl sondy specifické pro samčí a 50 µl sondy specifické pro samičí genom, 5 µl DNA z lososích spermií, 3 µl NaCl a 280 µl 100% etanolu vychlazeného na -20 °C. Následně byla směs inkubována přes noc při -20 °C, případně 1 h při teplotě -80 °C. Poté byla centrifugována při 14000 rpm 30 min. Peleta byla dvakrát promyta pomocí 70% etanolu a ponechána uschnout (1h). Následně byla rozpuštěna v 22 µl hybridizačního pufru při teplotě 37 °C po dobu 2-3 h. Takto připravená sonda byla uchovávána v mrazáku při -20 °C.

První den samotné CGH zahrnuje ošetření sklíček s nakapanou chromozomovou suspenzí a je tak shodný s prvním dnem protokolu pro FISH s telomerickou sondou. Po přidání sondy byla sklíčka inkubována alespoň 48 h při teplotě 37 °C. Poté byla šetrně odstraněna krycí sklíčka, skla byla opláchnuta v roztoku 2xSSC. Nadbytečná sonda byla odstraněna omytím sklíček v 50% formamidu předehřátém na teplotu 37 °C a to třikrát po dobu 5 min. Následně byla sklíčka třikrát omyta v roztoku 2xSSC opět při pokojové teplotě po dobu 5 min. Poté byla sklíčka na 30 s vložena do kyvety s roztokem 4T, opět při pokojové teplotě. Následovala aplikace blokátoru (vždy 100 µl na kapku) a sklíčka byla inkubována 30 min při teplotě 37 °C. Poté byly aplikovány protilátky (100 µl blokátoru s 2 µl avidin-FITC a 10 µl anti- digoxigenin -Rhodamin). Sklíčka byla inkubována 30 min při teplotě 37 °C. Po uplynutí této doby byla sklíčka třikrát omyta v roztoku 4T (5 min), jednou v roztoku PBS (5 min) a nakonec dehydrována pomocí etanolové řady. Po uschnutí bylo na skla nanášeno 20 µl roztoku Vectashield (Vector Laboratories), obsahujícího DAPI. Nakonec byla skla překryta krycími sklíčky.

3.9. Zpracování dat

a) DNA barcoding

Získané sekvence hadů rodu *Boaedon* byly zpracovány v programu BioEdit 5.0.9 (Hall 1999). Do analýzy byly zahrnuty sekvence publikované Greenbaumem *et al.* (2015), které byly uloženy do databáze GenBank. Jako outgroup byly použity blíže příbuzné druhy *Lamprophis guttatus*, *Lamprophis aurora*, *Lamprophis fuscus*, *Lycodonomorphus laevisimus* a *Lycodonomorphus rufulus*. Alingment byl vytvořen pomocí algoritmu ClustalW (Thompson *et al.* 1994) a následně analyzován v programu MEGA 6.0.5 (Tamura *et al.* 2013).

Pro vytvoření fenetického stromu byla použita metoda Neighbour joining. Statistická podpora větví stromu byla ověřena pomocí bootstrapové metody (s počtem opakování 1000). Jako substituční model byla zvolena metoda p-distance s rozlišením substituční rychlosti mezi tranzicemi a transverzemi. Substituční rychlost byla pro celý studovaný úsek DNA nastavena shodně. Pro ošetření mezer a chybějících dat byla zvolena možnost „Pairwise deletion“. Všechna větvení s hodnotou bootstrapu pod 50 byly brány jako nerozřešené.

b) Cytogenetická data

K nasnímání skel obarvených Giemsou byl použit mikroskop Zeiss AxioImager Z2 s automatickým vyhledáváním metafází Metafer-MSearch (MetaSystems). K sestavení karyogramů byl použit program Ikaros (MetaSystems). Sklíčka obarvená pomocí DAPI byla prohlížena pomocí fluorescenčního mikroskopu Provis AX70 (Olympus) a metafáze byly nafoceny digitální kamerou DP30BW (Olympus) za použití imerzního objektivu. Kontrast nasnímaných fotografií byl upraven pomocí Adobe Photoshopu CS6 a snímky z C-pruhování byly barevně invertovány. V případě FISH experimentů byly jednotlivé snímky následně obarveny a poskládány v programu DP Manager (Olympus). Fylogenetické stromy byly sestaveny v programu Mesquite 3.10 a následně upraveny ve Photoshopu.

4. Výsledky

4.1. DNA barcoding rodu *Boaedon*

Rod *Boaedon* je poměrně složitý druhový komplex, jednotlivé druhy nejsou morfologicky příliš odlišné a obsahuje i několik kryptických druhů (Greenbaum *et al.* 2015). Z tohoto důvodu byl pro charakterizaci druhů u studovaných jedinců tohoto rodu proveden DNA barcoding. Na základě získaných sekvencí doplněných o sekvence ze studie Greenbaum *et al.* (2015) dostupných online v databázi GenBank byl metodou Neighbour joining sestaven fenetický strom (obr. 5). Veškerá větvení s hodnotou bootstrapu pod 50 byla brána jako nerozřešená.

Ze vzniklého stromu je patrné, že rod *Boaedon* je sice nejspíše monofyletický, ale celkově se spíše jedná o druhový komplex, kdy není snadné jednotlivé druhy od sebe odlišit. V případě našich studovaných jedinců došlo k rozdělení do tří samostatných druhů/linií (obr. 5), které byly následně označeny jako *Boaedon* sp. 1, *Boaedon* sp. 2, *Boaedon* sp. 3.

4.2. Caenophidia

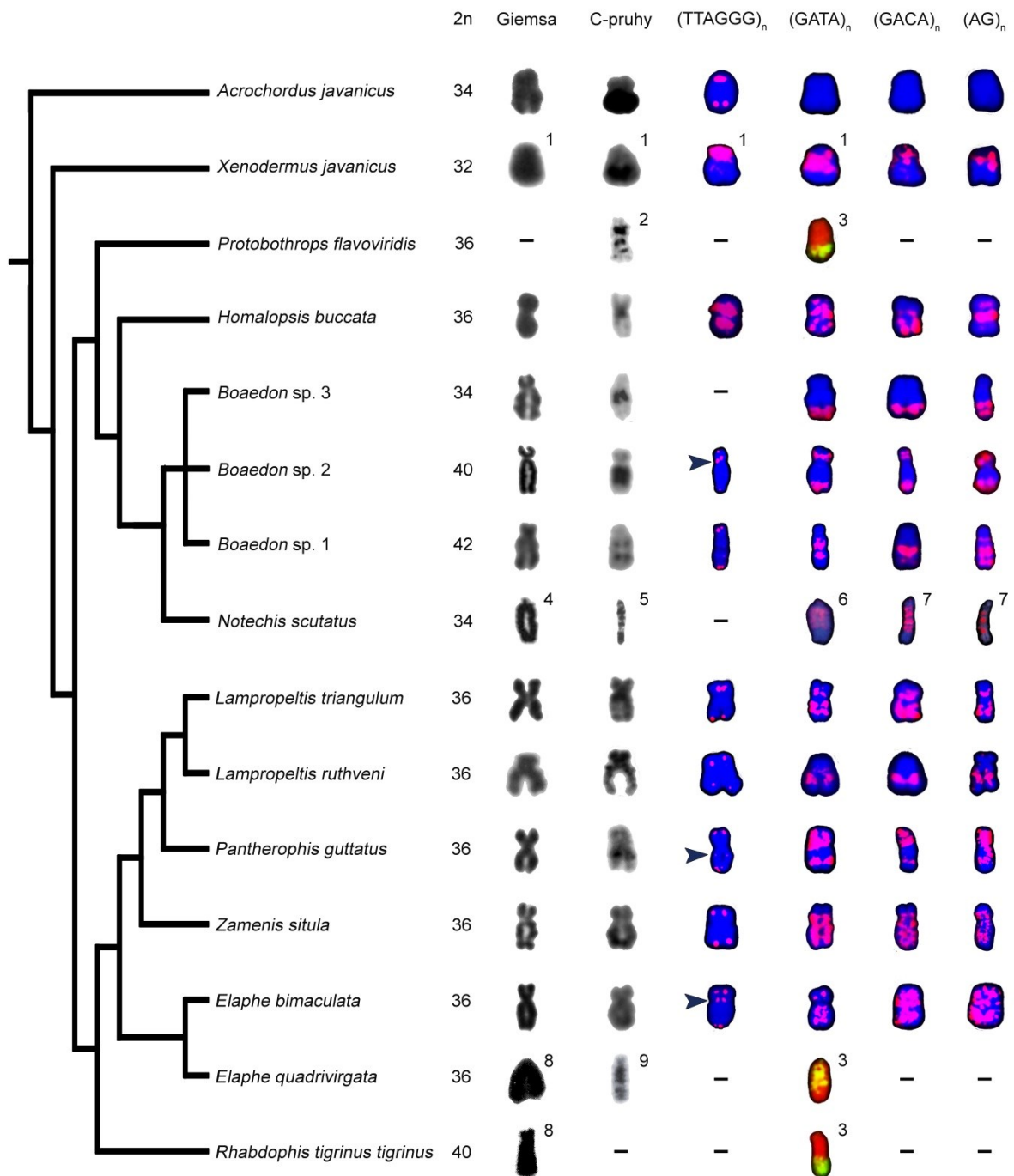
4.2.1. Evoluční dynamika chromozomu W

Pro testování evoluční dynamiky pohlavního chromozomu W u hadů skupiny Caenophidia bylo celkem použito 11 druhů. Pro lepší pokrytí fylogenetického stromu byly zahrnuty i dříve studované druhy (obr. 6).

Chromozom W je u většiny druhů submetacentrický až subtelocentrický (obr. 6). V případě druhů *Notechius scuttatus* (Shine & Bull 1977), *Elaphe quadrivirgata* a *Rhabdophis tigrinus tigrinus* (Itoh et al. 1970) je akrocentrický (obr. 6). K vizualizaci konstitutivního heterochromatinu byla použita metoda C-pruhování. U všech studovaných druhů byla na chromozomu W pozorována akumulace heterochromatinu, ale jednotlivé druhy se vzájemně odlišují ve velikosti a rozmístění heterochromatinových bloků (obr. 6). Zatímco v případě druhů *Acrochordus javanicus*, *Homalopsis buccata*, *Pantherophis guttatus*, všech tří druhů rodu *Boaedon*, *Xenodermus javanicus* (Rovatsos et al. 2015b), *Protobothrops flavoviridis* (Matsubara et al. 2015) a *Elaphe quadrivirgata* (Kawai et al. 2007) zaujímá konstitutivní heterochromatin jen část chromozomu W, u druhů *Elaphe bimaculata*, *Zamenis situla*, *Lampropeltis triangulum*, *Lampropeltis ruthveni* a *Notechius scuttatus* (Mengden 1981) je heterochromatin rozložen po celém chromozomu (obr. 6).

U všech testovaných druhů byl detekován telomerický motiv (TTAGGG)_n v typické terminální pozici. U některých druhů se na W chromozomu vyskytují i intersticiální telomerické sekvence (ITS), a to u *E. bimaculata*, *P. guttatus*, *Boaedon* sp. 2. U druhu *X. javanicus* je ITS akumulována v okolí centromery (Rovatsos et al. 2015b). V případě druhu *H. buccata* je telomerická sekvence akumulována dokonce po celém chromozomu W (obr. 6).

Dále byla testována přítomnost tří mikrosatelitových motivů: (GATA)_n, (GACA)_n a (AG)_n. Přítomnost akumulace těchto mikrosatelitů byla potvrzena u všech zkoumaných druhů s výjimkou druhu *A. javanicus*. Topologie jednotlivých bloků akumulovaných mikrosatelitů se však mezi druhy výrazně liší a to i u blízce příbuzných druhů, příkladem může být rozložení (GACA)_n u druhů rodu *Lampropeltis* či (GATA)_n u rodu *Boaedon* (obr. 6).



Obr. 6: Komparativní fylogenetická rekonstrukce nekódujících oblastí chromozomu W

Fylogenetický strom studovaných druhů s použitými cytogenetickými a molekulárně-cytogenetickými metodami. Chybějící data jsou označena pomlčkou. Intersticiální telomerické oblasti (ITS) jsou označeny šipkou. Fylogenetické vztahy převzaty z prací Pyron *et al.* (2013, 2014). Data označená číslem byla přejata z jiných studií: (1) Rovatsos *et al.* (2015b); (2) Matsubara *et al.* (2015); (3) Matsubara *et al.* (2016b); (4) Shine & Bull (1977); (5) Mengden (1981); (6) O'Meally *et al.* (2010); (7) Matsubara *et al.* (2016a); (8) Itoh *et al.* (1970); (9) Kawai *et al.* (2007).

4.2.2. Popis karyotypů a pohlavních chromozomů u cytogeneticky nestudovaných druhů

Pro studium evoluční dynamiky W chromozomu bylo do práce zařazeno i osm druhů hadů skupiny Caenophidia, u kterých nebyly pohlavní chromozomy ani karyotyp doposud popsány (tab. 3). K sestavení karyogramů byly použity metafáze obarvené Giemsou. Díky tomu, že na W chromozomu dochází k akumulaci konstitutivního heterochromatinu (Bečak & Bečak 1969), byla k rozlišení pohlavních chromozomů použita metoda C-pruhování.

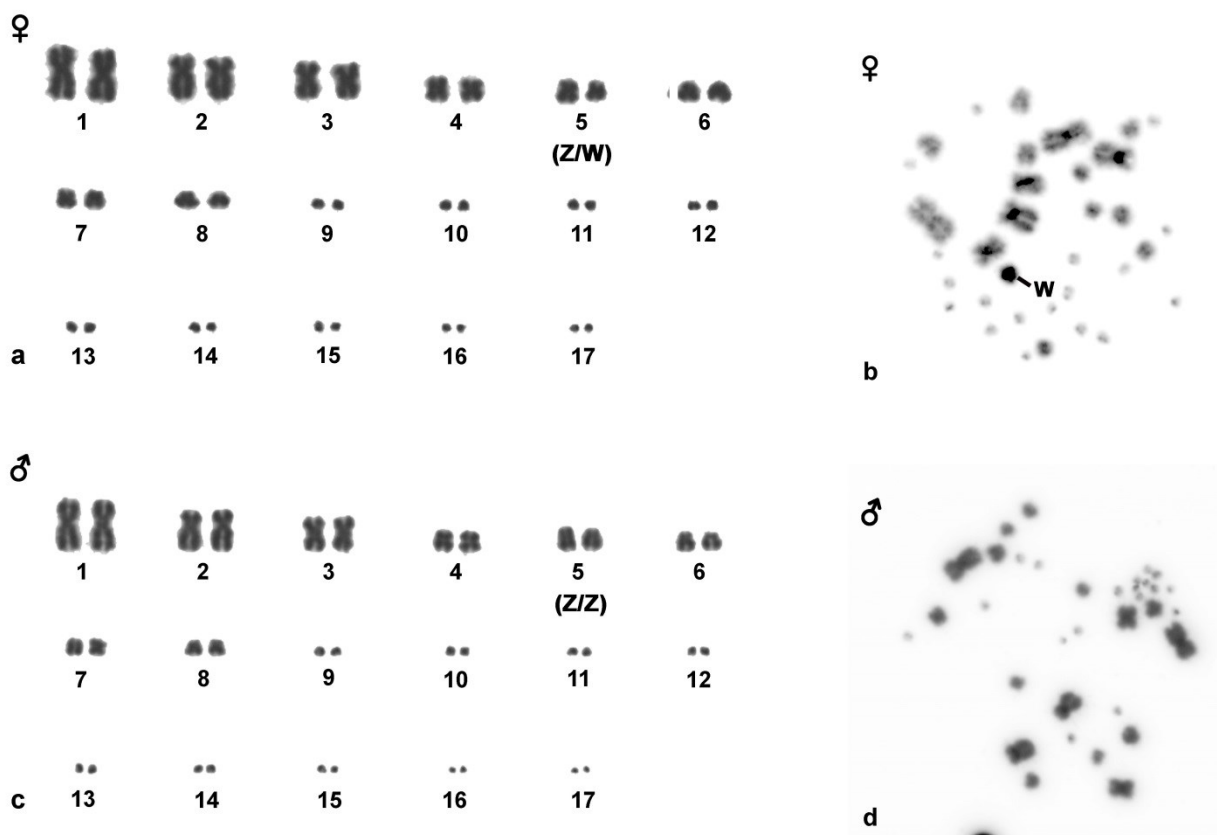
Tab. 3: Přehled nově studovaných druhů skupiny Caenophidia

2n odpovídá počtu chromozomů v diploidním stavu. Zápis chromozomového vzorce: diploidní počet chromozomů: počet makrochromozomů (dvouramenných, akrocentrických) počet mikrochromozomů.

Čeleď	Druh	2n	Pozice pohlavních chromozomů	Chromozomový vzorec
Acrochordidae	<i>Acrochordus javanicus</i>	34	5	34: 16(12,4) 18
Lamprophiidae	<i>Boaedon</i> sp. 1	42	1	42: 20(12,8) 22
	<i>Boaedon</i> sp. 2	40	4	40: 20(20,0) 20
	<i>Boaedon</i> sp. 3	34	1	34: 20(18,2) 14
Colubridae	<i>Elaphe bimaculata</i>	36	4	36: 16(14,2) 20
	<i>Lampropeltis ruthveni</i>	36	4	36: 16(12, 4) 20
	<i>Lampropeltis triangulum</i>	36	4	36: 16(14,2) 20
	<i>Zamenis situla</i>	36	4/5	36: 16(14,2) 20

Acrochordus javanicus

Acrochordus javanicus má v diploidním stavu 34 chromozomů. Karyotyp se skládá z 16 makrochromozomů a 18 mikrochromozomů (obr. 7). Makrochromozomy odpovídají prvním osmi chromozomovým párům. První až pátý pár a sedmý pár sestává z dvouramenných chromozomů. Akrocentrické chromozomy odpovídají šestému a osmému chromozomovému páru. Vzhledem k velikosti nelze morfologii mikrochromozomů s jistotou rozlišit. Pohlavní chromozomy se nacházejí na páté pozici (obr. 7). Chromozom Z je metacentrický, W chromozom submetacentrický a většina chromozomu W je heterochromatinizována (obr 7b).

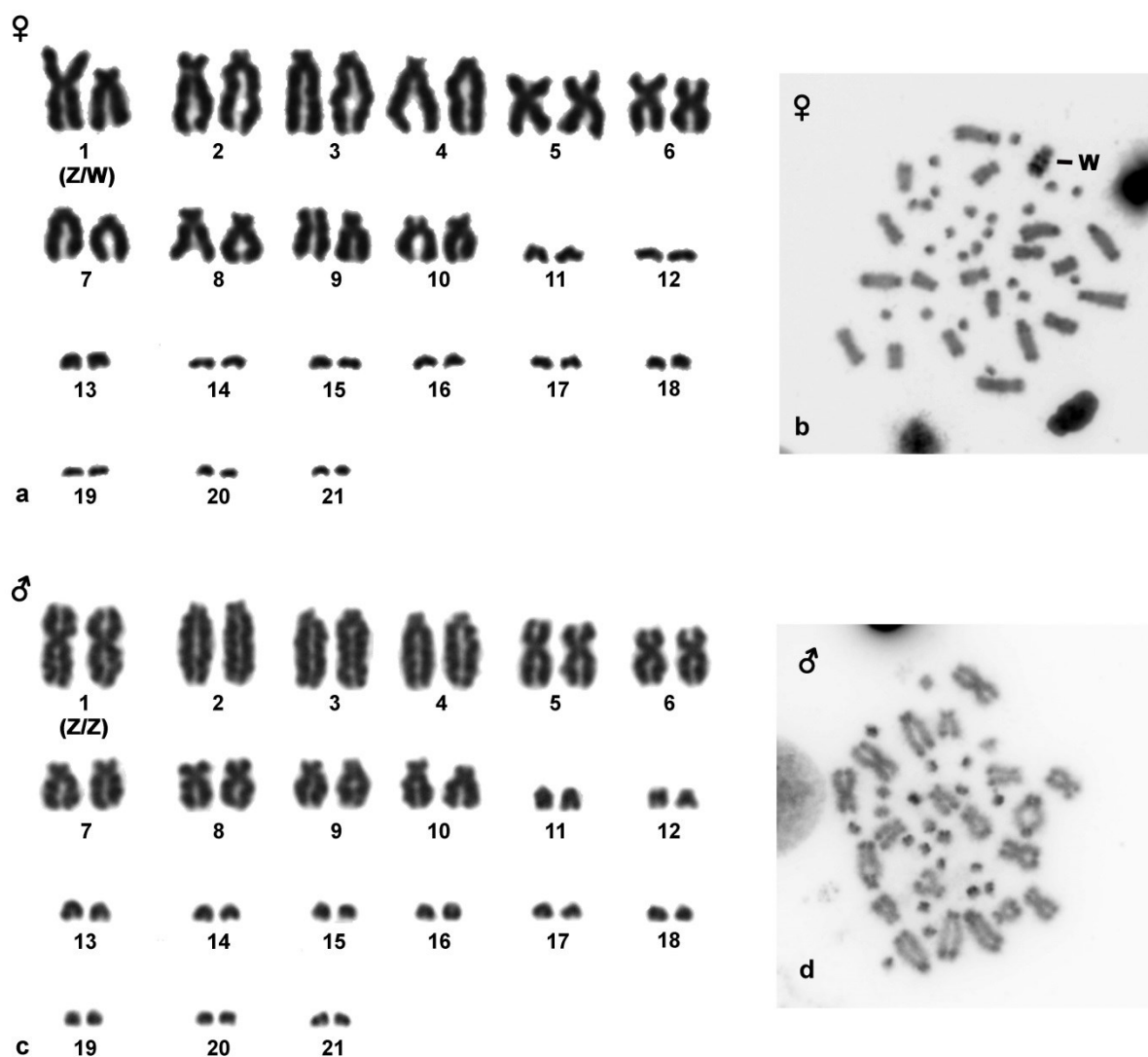


Obr. 7: *Acrochordus javanicus* – karyogram a C-pruhování

Karyotyp samice (a), C-pruhování samice (b), karyotyp samce (c), C-pruhování samce (d).

***Boaedon* sp. 1**

První ze tří studovaných druhů rodového komplexu *Boaedon* – *Boaedon* sp. 1 – má v diploidním stavu 42 chromozomů, z toho 20 makro- a 22 mikrochromozomů (obr. 8). Druhý až čtvrtý a sedmý makrochromozomový pár je akrocentrický. První, pátý, šestý a osmý až desátý pár chromozomů je dvouramenný. Morfologii mikrochromozomů nebylo možné rozlišit. Pohlavní chromozomy odpovídají prvnímu chromozomovému páru (obr. 8). Chromozom Z je větší a metacentrický, zatímco menší W chromozom je subtelocentrický. Chromozom W je z velké části heterochromatinizován (obr. 8b).

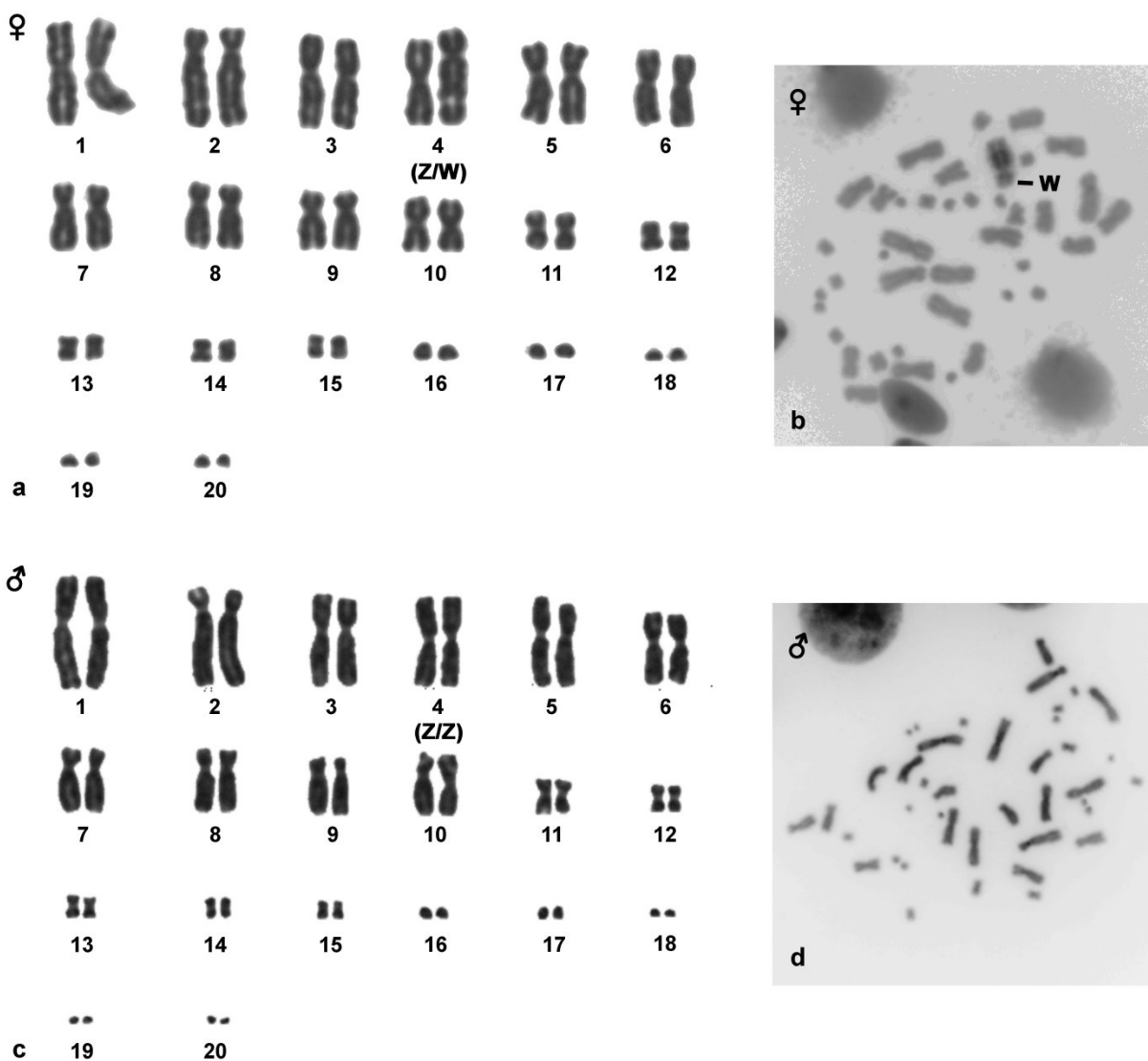


Obr. 8: *Boaedon* sp. 1 – karyogram a C-pruhování

Karyotyp samice (a), C-pruhování samice (b), karyotyp samce (c), C-pruhování samce (d).

Boaedon sp. 2

Diploidní počet chromozomů druhu *Boaedon* sp. 2 je $2n = 40$. Karyotyp tohoto druhu sestává z 20 makro- a 20 mikrochromozomů (obr. 9). Všechny makrochromozomové páry, tedy první až desátý pár, jsou dvouramenné. U mikrochromozomů není možné morfologii s jistotou určit. Pohlavní chromozomy odpovídají čtvrtému chromozomovému páru (obr. 9). Chromozom Z je metacentrický. O něco větší W chromozom je subtelocentrický a z velké části heterochromatinizovaný (obr. 9b).

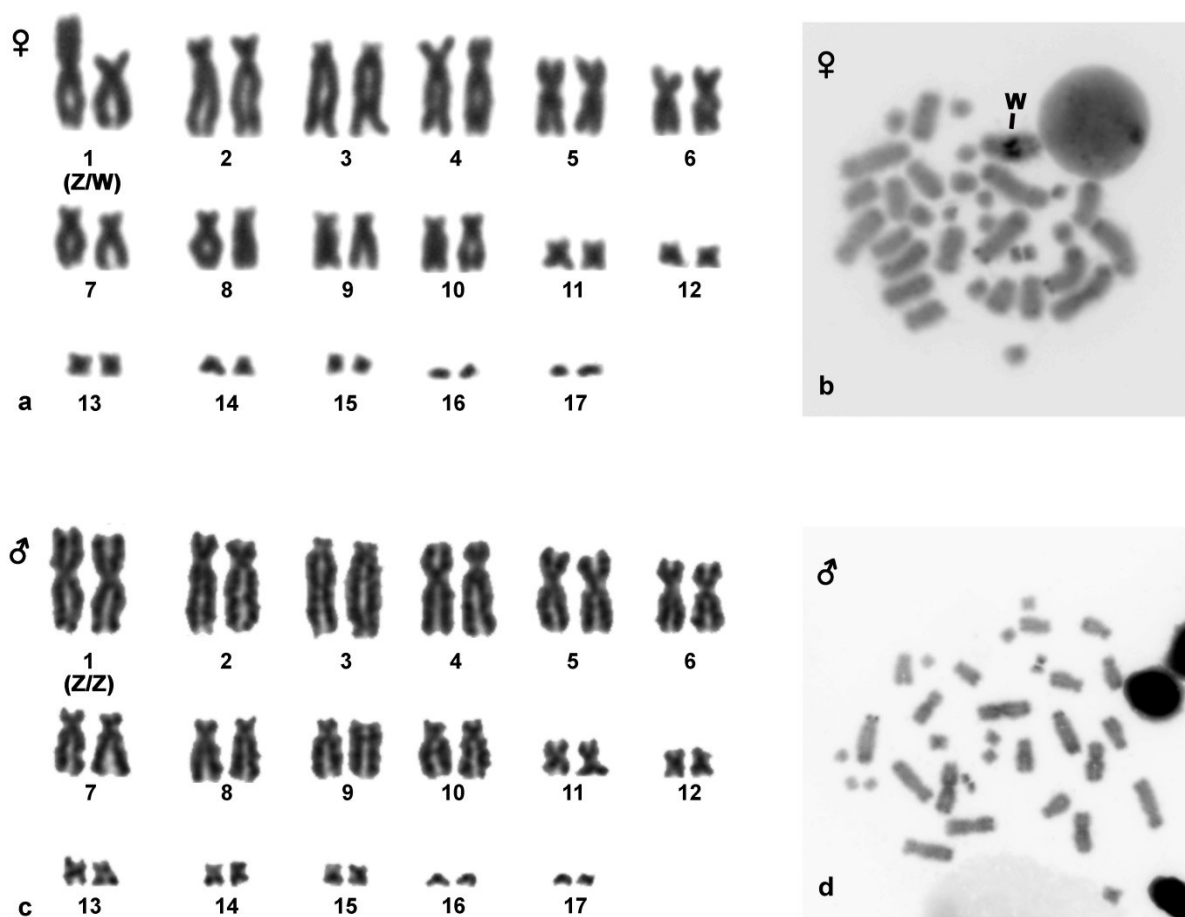


Obr. 9: *Boaedon* sp. 2 – karyogram a C-pruhování

Karyotyp samice (a), C-pruhování samice (b), karyotyp samce (c), C-pruhování samce (d).

***Boaedon* sp. 3**

Boaedon sp. 3, má v diploidním stavu 34 chromozomů (obr. 10). Karyogram obsahuje 20 makrochromozomů a 14 mikrochromozomů. Třetí pár makrochromozomů je akrocentrický, zbývající makrochromozomy jsou dvouramenné. V případě mikrochromozomů nelze jejich morfologii určit. Stejně jako u druhu *Boaedon* sp. 1 pohlavní chromozomy odpovídají prvnímu chromozomovému páru (obr. 10). Chromozom Z je větší a metacentrický, zatímco menší W chromozom je subtelocentrický. W chromozom je částečně heterochromatinizován (obr. 10b).



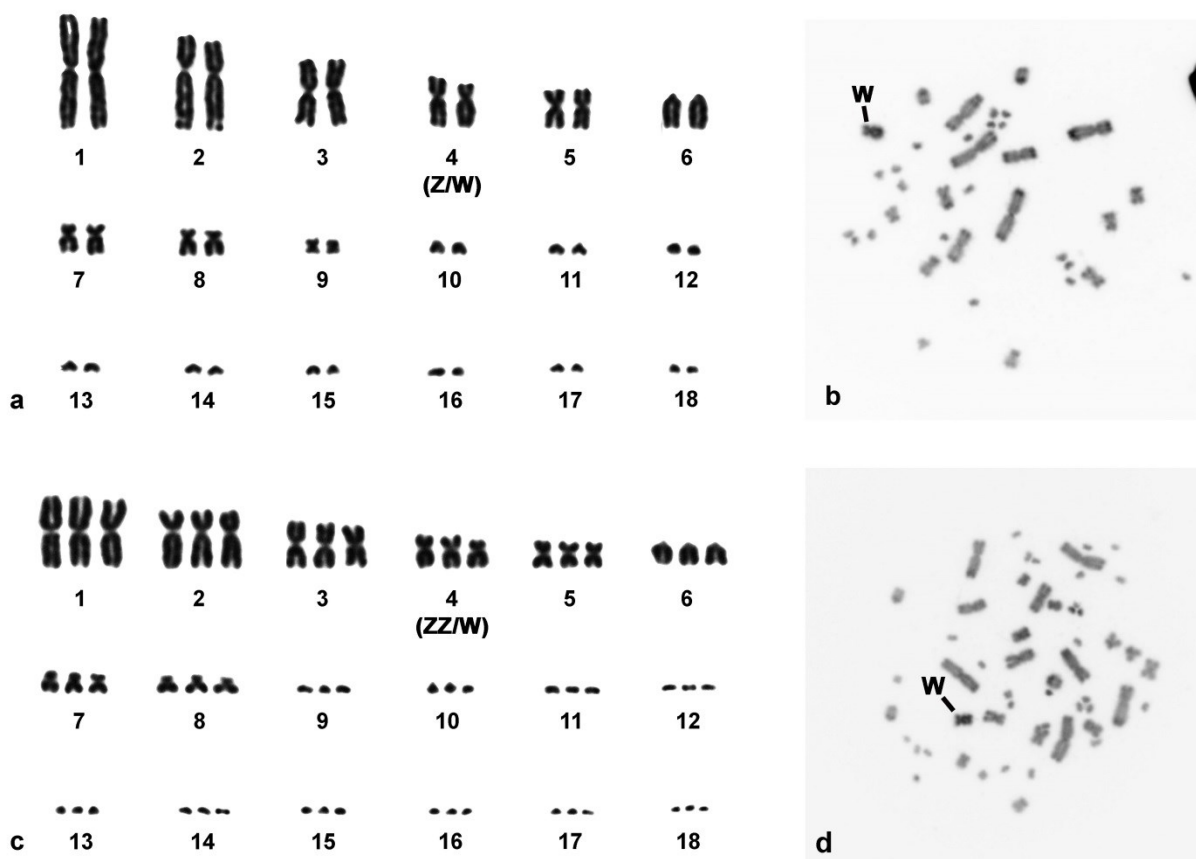
Obr. 10: *Boaedon* sp. 3 – karyogram a C-pruhování

Karyotyp samice (a), C-pruhování samice (b), karyotyp samce (c), C-pruhování samce (d).

Elaphe bimaculata

Karyogram asijské užovky *Elaphe bimaculata* má v diploidním stavu 36 chromozomů, skládá se z 16 makro- a 20 mikrochromozomů (obr. 11). Kromě šestého páru makrochromozomů, který je akrocentrický jsou ostatní páry makrochromozomů dvouramenné. V případě mikrochromozomů nelze jejich morfologii s jistotou rozlišit (obr. 11.). Pohlavní chromozomy se nacházejí na čtvrté pozici (obr. 11). Chromozomy Z i W jsou submetacentrické a liší se nepatrně ve velikosti, Z chromozom je o něco větší než chromozom W, ten je zcela heterochromatinizovaný (obr. 11b).

U jednoho ze tří studovaných jedinců byl zjištěn triploidní počet chromozomů, $3n = 54$ (obr. 11c). Karyotyp obsahuje dva chromozomy Z a jeden W chromozom (obr. 11c,d).

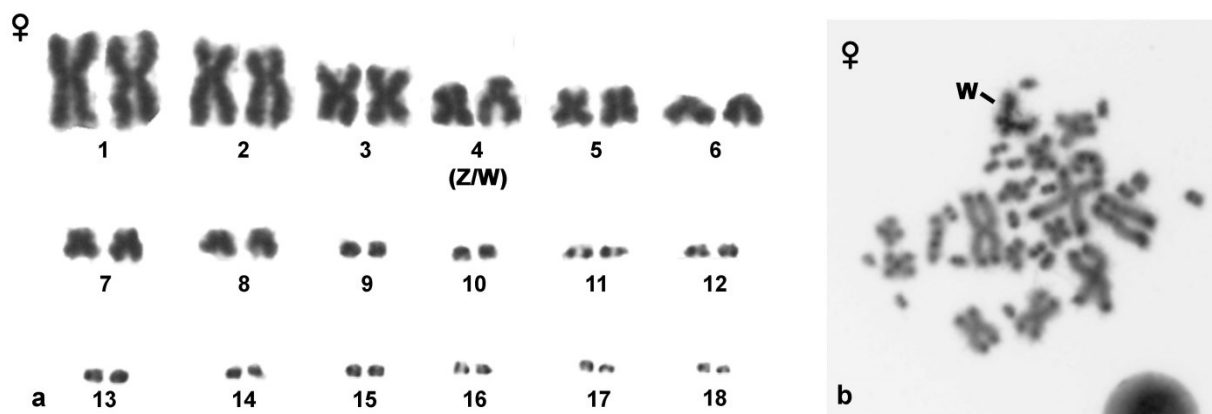


Obr. 11: *Elaphe bimaculata* – karyogram a C-pruhování

Karyotyp samice (a), C-pruhování samice (b), karyotyp triploidní samice (c), C-pruhování triploidní samice (d)

Lampropeltis ruthveni

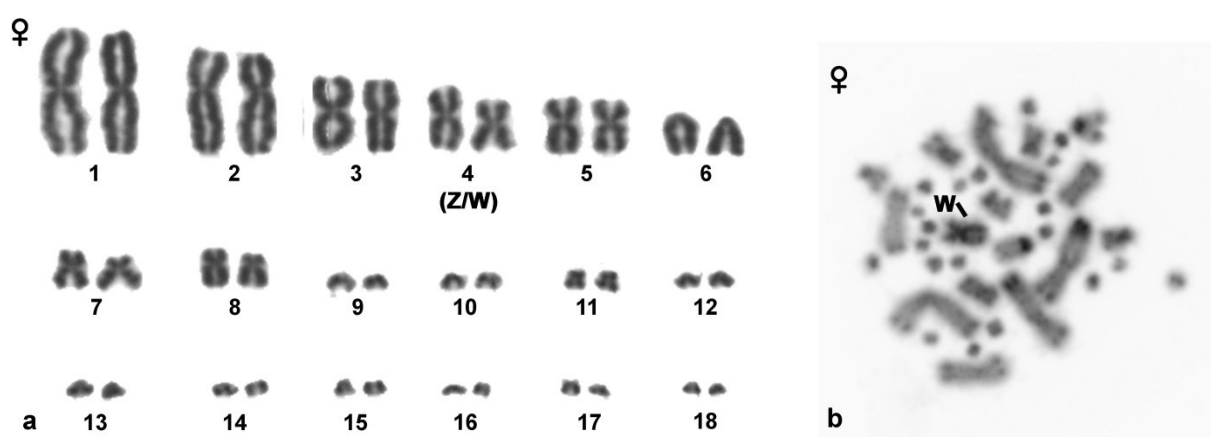
Lampropeltis ruthveni má v diploidním stavu 36 chromozomů, z toho je 16 makro- a 20 mikrochromozomů (obr. 12). První až pátý a sedmý chromozomový pár je dvouramenný. Šestý a osmý pár chromozomů je akrocentrický. V případě mikrochromozomů nebylo možné jejich morfologii určit. Pohlavní chromozomy se nacházejí na čtvrté pozici. Menší Z chromozom je metacentrický. W chromozom je subtelocentrický a zcela heterochromatizovaný (obr. 12b).



Obr. 12: *Lampropeltis ruthveni* – karyogram a C-pruhování
Karyotyp samice (a), C-pruhování samice (b)

Lampropeltis triangulum

Lampropeltis triangulum má stejně jako *L. ruthveni* v diploidním stavu 36 chromozomů s 16 makro- a 20 mikrochromozomy (obr. 13). První až pátý, sedmý a osmý chromozomový pár sestává z dvouramenných chromozomů, šestý pár chromozomů je akrocentrický. Morfologii mikrochromozomů nelze vzhledem k jejich velikosti s jistotou určit. Pohlavní chromozomy odpovídají čtvrté pozici v karyogramu (obr. 13). Středně velký Z chromozom je metacentrický, o něco menší W chromozom je submetacentrický a zcela heterochromatinizovaný (obr. 13b).

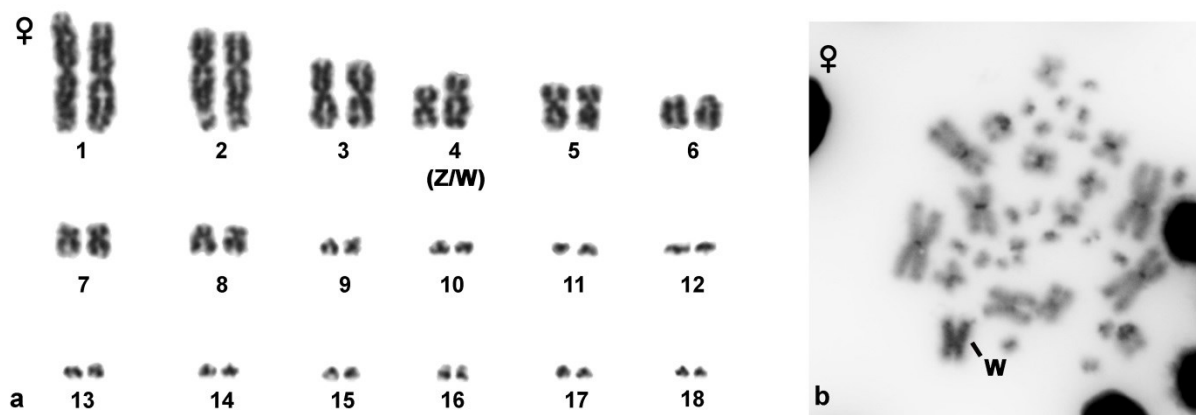


Obr. 13: *Lampropeltis triangulum* – karyogram a C-pruhování

Karyotyp samice (a), C-pruhování samice (b).

Zamenis situla

Karyotyp užovky *Zamenis situla* má v diploidním stavu 36 chromozomů, z čehož je opět 16 makro- a 20 mikrochromozomů (obr. 14). Prvních osm párů chromozomů v karyogramu odpovídá makrochromozomům. S výjimkou šestého páru chromozomů, který je akrocentrický, jsou zbylé makrochromozomy dvouramenné. Morfologii mikrochromozomů není vzhledem k jejich velikosti možné snadno odlišit. Pohlavní chromozomy se zřejmě nacházejí na čtvrté pozici, ale vzhledem k podobnosti velikosti Z chromozomu s velikostí pátého chromozomového páru by mohla být pozice těchto dvou párů prohozena (obr. 14). Chromozom Z je submetacentrický, větší W chromozom je akrocentrický a je zcela heterochromatinizovaný (obr. 14b).



Obr. 14: *Zamenis situla* – karyogram a C-pruhování
Karyotyp samice (a), C-pruhování samice (b).

4. 3. Hadi mimo skupinu Caenophidia

V případě hadů mimo skupinu Caenophidia bylo hlavním cílem pokusit se odhalit pohlavní chromozomy pomocí molekulárně cytogenetických metod. Celkem bylo testováno šest druhů ze dvou čeledí (tab. 4), z toho u čtyř druhů se jedná o první popis karyotypu. Pro popis karyotypů a detekci pohlavně specifických rozdílů mezi karyotypy byly použity klasické cytogenetické metody (barvení giemsou a C-pruhování pro vizualizaci konstitutivního heterochromatinu) v kombinaci s molekulárně cytogenetickými metodami (FISH s mikrosatelitovou sondou (GATA)_n, CGH a FISH se sondou pro ribosomální DNA).

Tab 4: Přehled studovaných druhů mimo skupinu Caenophidia

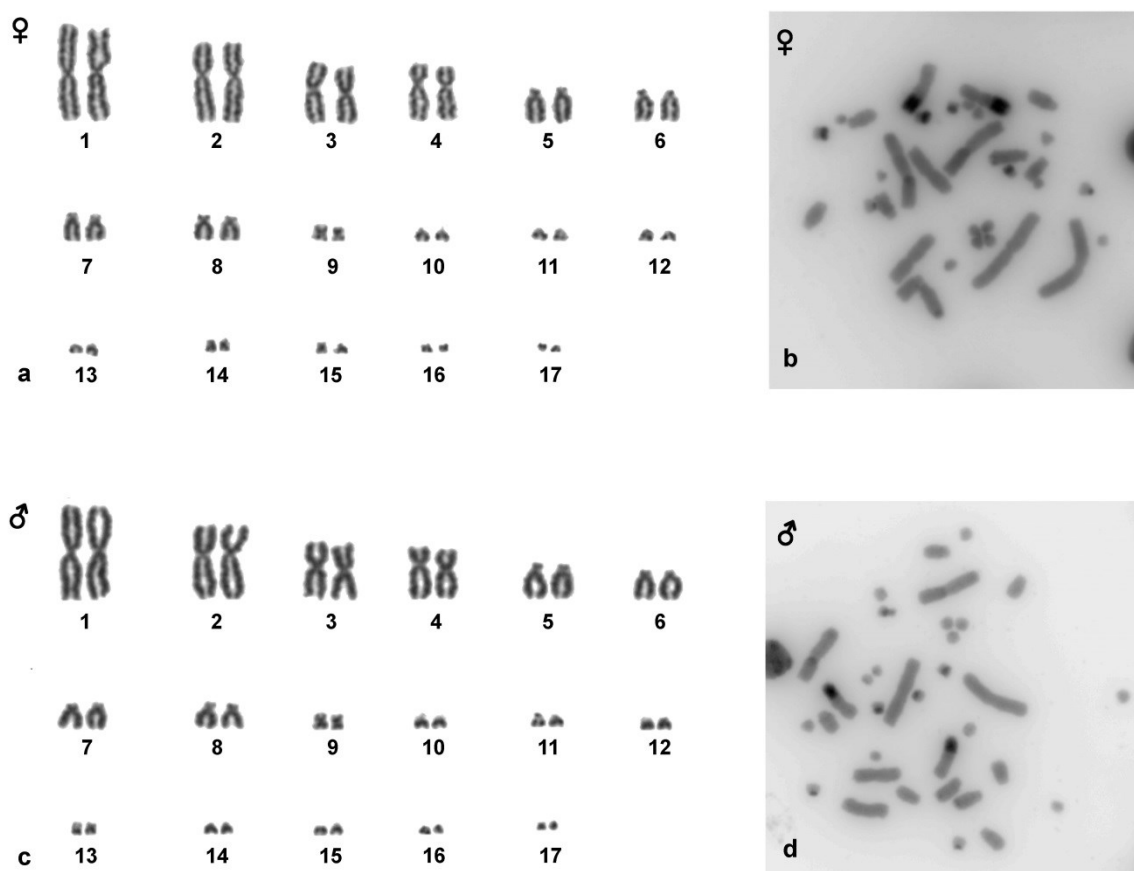
2n odpovídá počtu chromozomů v diploidním stavu. Zápis chromozomového vzorce: diploidní počet chromozomů: počet makrochromozomů (dvouramenných, akrocentrických) počet mikrochromozomů.

Čeď	Druh	2n	Chromozomový vzorec
Boidae	<i>Acrantophis dumerili</i>	34	34: 16(8,8) 18
	<i>Acrantophis madagascariensis</i>	34	34: 16(8,8) 18
	<i>Sanzinia madagascariensis</i>	34	34: 18(14,4) 16
	<i>Candoia paulsoni</i>	36	36: 16(8,8) 20
	<i>Lichanura trivirgata</i>	36	36: 16(8,8) 20
Calabariidae	<i>Calabaria reinhardtii</i>	36	36: 16(8,8) 20

Acrantophis dumerili

Madagaskarský hroznýš *Acrantophis dumerili* je jeden ze dvou druhů, u kterého byl karyotyp popsán již dříve (obr. 4). Jedná se o jediný druh hada mimo skupinu Caenophidia, u kterého byly popsány pohlavní chromozomy (Mengden & Stock 1980). Karyotyp námi studovaných jedinců druhu *A. dumerili* však pohlavní chromozomy popsané ve studii publikované dvojicí Mengden a Stock (1980) neobsahoval a u samčích i samičích karyotypů byly všechny chromozomy morfologicky shodné (obr. 15a,c).

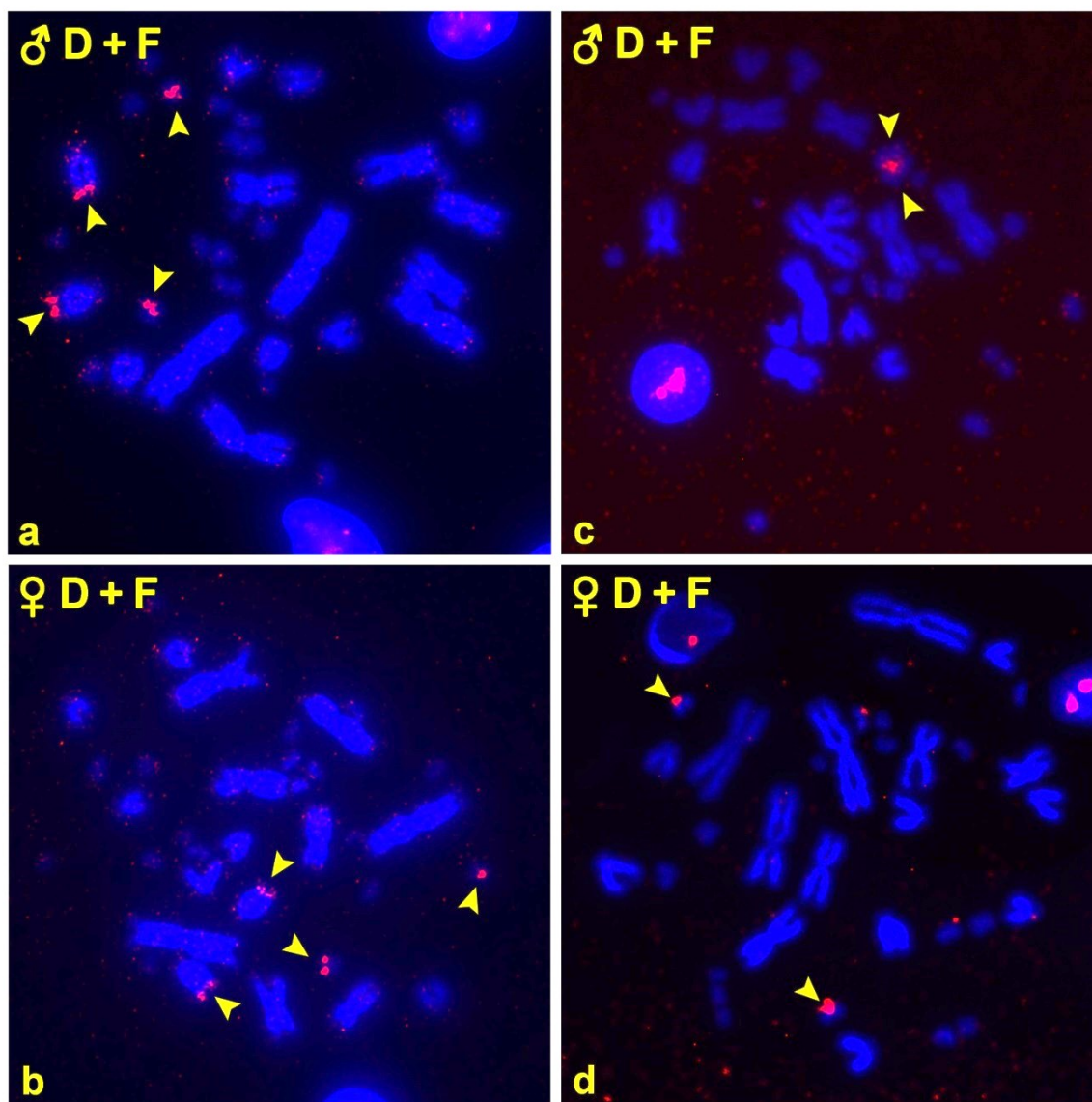
Karyotyp druhu *Acrantophis dumerili* obsahuje v diploidním stavu 34 chromozomů, z toho je 16 makro- a 18 mikrochromozomů (obr. 4; obr. 15). První až čtvrtý pár makrochromozomů je dvouramenný a pátý až osmý pár je akrocentrický. V případě mikrochromozomů nelze morfologii určit s jistotou. Na čtvrtém páru makrochromozomů je heterochromatinizovaný blok v telomerické oblasti q raménka. Částečně heterochromatinizované jsou také tři páry mikrochromozomů (obr. 15b).



Obr. 15: *Acrantophis dumerili* – karyogram a C-pruhování

Karyotyp samice (a), C-pruhování samice (b), karyotyp samce (c), C-pruhování samce (d).

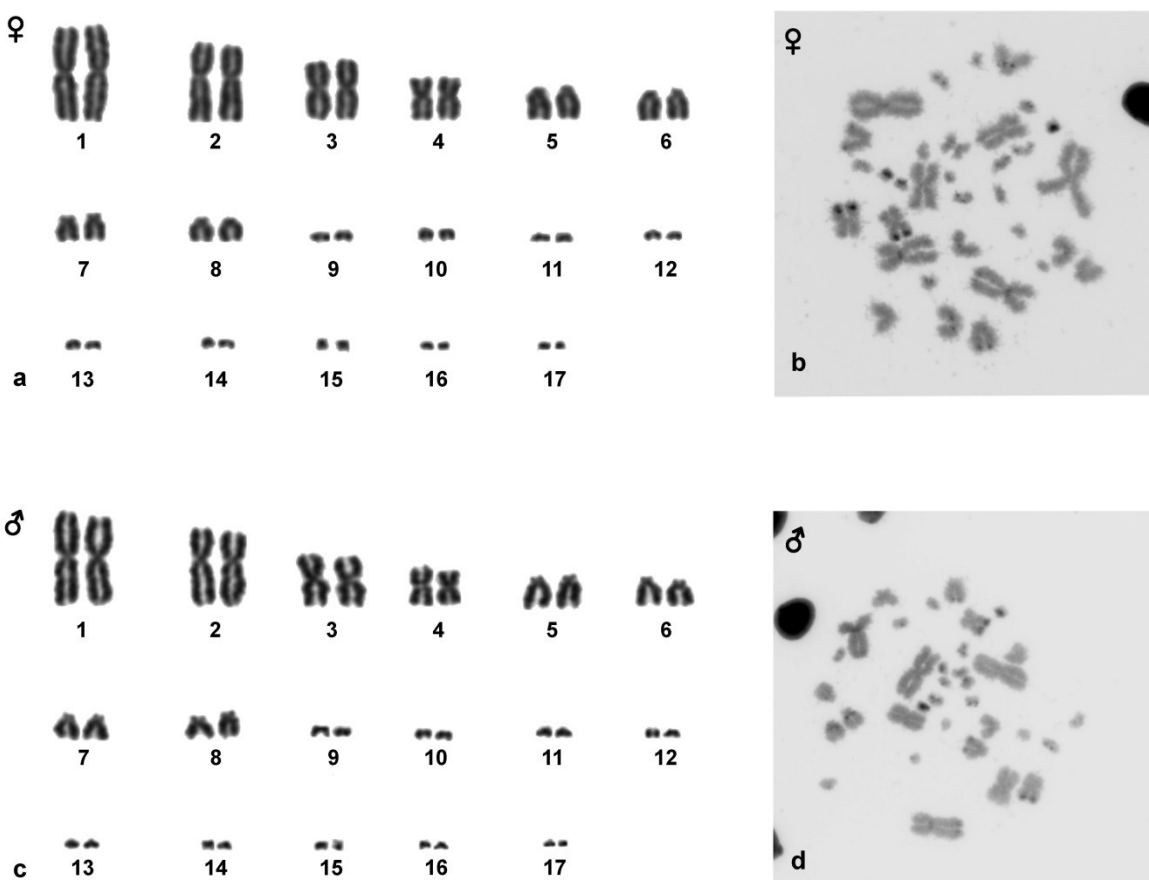
V telomerické oblasti q raménka pátého páru makrochromozomů a na jednom páru mikrochromozomů došlo k akumulaci mikrosatelitového motivu (GATA)_n (obr. 16a,b). Na jednom z mikrochromozomových párů došlo k akumulaci rDNA (obr. 16c,d). Pohlavní chromozomy se použitými metodami nepodařilo odhalit.



Obr. 16: *Acrantophis dumerili* – GATA, rDNA
GATA samec (a), GATA samice (b), rDNA samec (c), rDNA samice (d)

Acrantophis madagascariensis

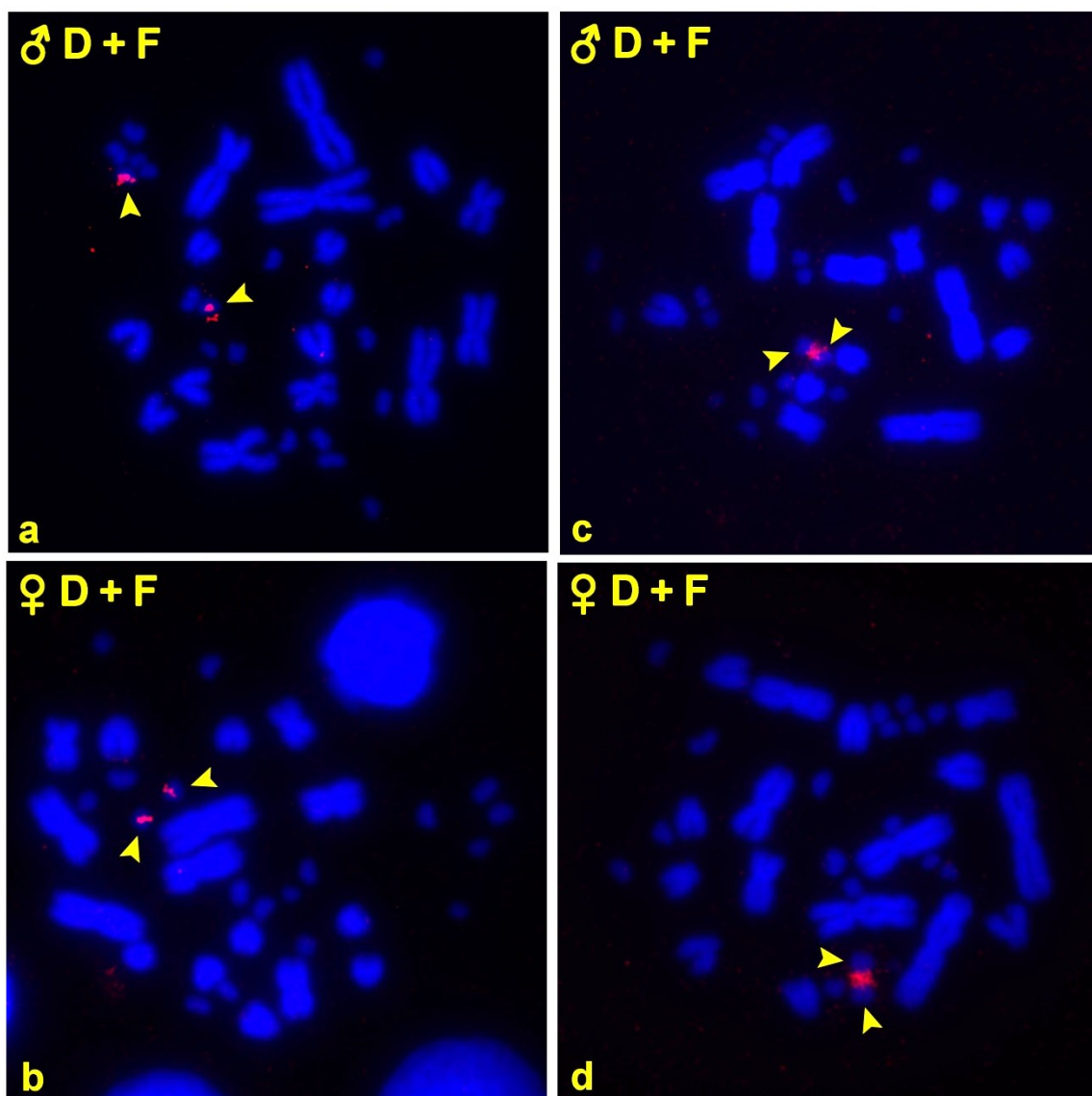
Acrantophis madagascariensis má stejně jako *A. dumerili* v diploidním stavu 34 chromozomů s 16 makro- a 18 mikrochromozomy (obr. 17). První čtyři makrochromozomy jsou dvouramenné, pátý až osmý chromozomový pár je akrocentrický. Mikrochromozomové páry nebylo možné morfologicky rozlišit. Na čtvrtém páru makrochromozomů je heterochromatický blok v telomerické oblasti q raménka. Částečně heterochromatinizované jsou také některé páry mikrochromozomů (obr. 17b,d).



Obr. 17: *Acrantophis madagascariensis* – karyogram a C-pruhování

Karyotyp samice (a), C-pruhování samice (b), karyotyp samce (c), C-pruhování samce (d).

Mikrosatelitový motiv $(GATA)_n$ je akumulována na rozdíl od *A. dumerili* jen na jednom páru mikrochromozomů (obr. 18a,b). Na jednom z párů mikrochromozomů došlo také k akumulaci rDNA (obr. 18c,d). Použitými metodami se nepodařilo odhalit rozdíl v samčím a samičím karyotypu.

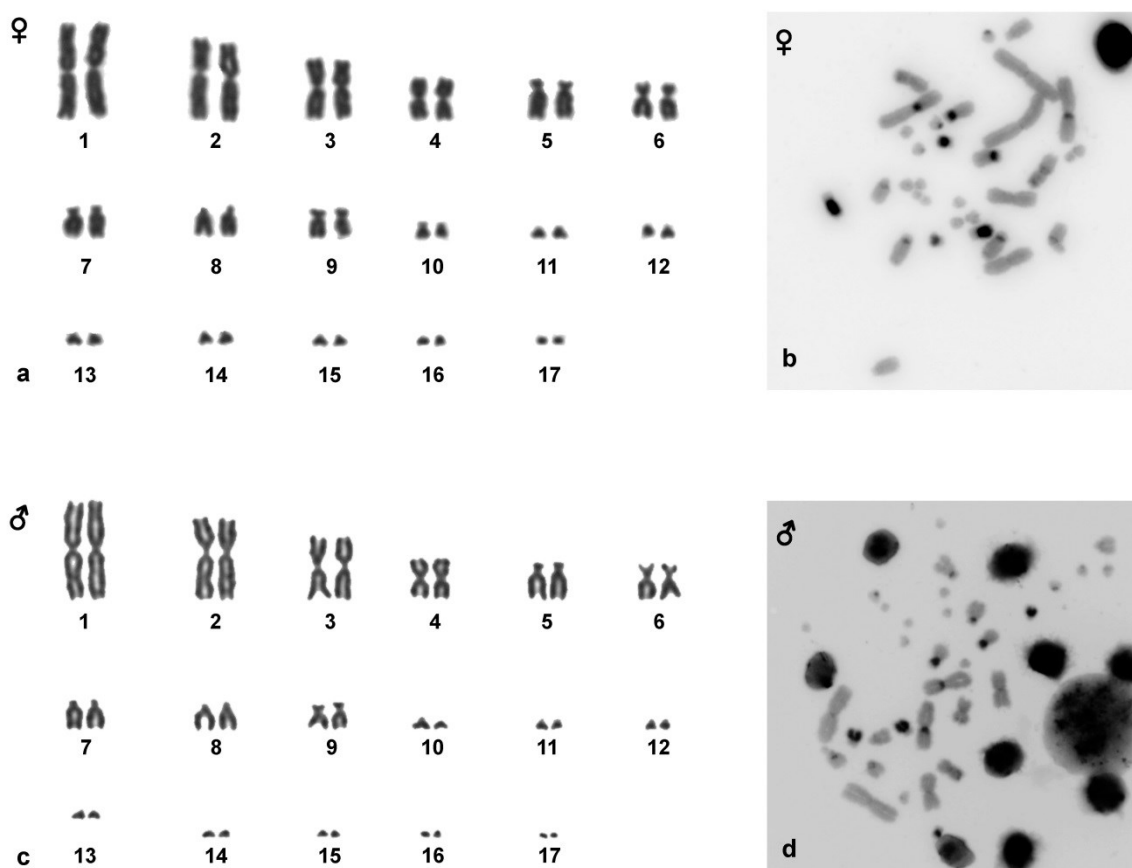


Obr. 18: *Acrantophis madagascariensis* – GATA, rDNA
GATA samec (a), GATA samice (b), rDNA samec (c), rDNA samice (d).

Sanzinia madagascariensis

U druhu *Sanzinia madagascariensis* byl karyotyp popsán již dříve. Karyotyp byl však popsán jen u samce tohoto druhu za použití klasických cytogenetických metod (g-pruhování a C-pruhování) (Mengden & Stock 1980).

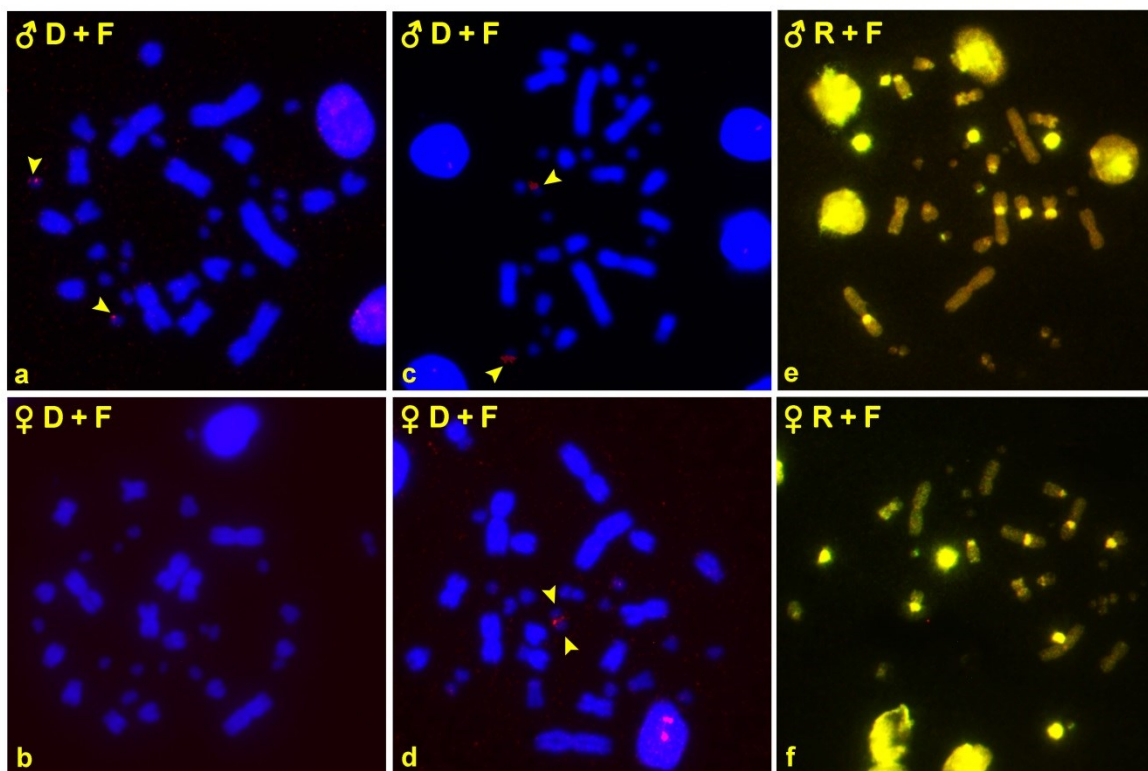
Karyotyp druhu *Sanzinia madagascariensis* sestává z 34 chromozomů, z toho 18 chromozomů tvoří makrochromozomy a zbývajících 16 chromozomů jsou mikrochromozomy (obr. 19). První až šestý a devátý makrochromozomový pár je dvouramenný. Sedmý a osmý pár chromozomů je akrocentrický. Vzhledem k velikosti mikrochromozomových párů nebylo možné jejich morfologii rozlišit. Bloky heterochromatinu byly detekovány v centromerické oblasti druhého, pátého a devátého páru makrochromozomů, na p raménku šestého páru makrochromozomů a na q raménku sedmého a desátého makrochromozomového páru (obr. 19b,d).



Obr. 19: *Sanzinia madagascariensis* – karyogram a C-pruhování

Karyotyp samice (a), C-pruhování samice (b), karyotyp samce (c), C-pruhování samce (d).

V karyotypu samce byl detekován slabý signál mikrosatelitového motivu (GATA)_n, a to na jednom páru mikrochromozomů (obr. 20a). V případě samičího karyotypu se motiv (GATA)_n detekovat nepodařilo (obr. 20b). U obou pohlaví došlo k akumulaci ribosomální DNA na jednom páru mikrochromozomů (obr. 20c,d). Metoda CGH neodhalila žádné pohlavně specifické rozdíly v karyotypech samce a samice (obr. 20e,f). Pohlavní chromozomy se použitými metodami nepodařilo odhalit.

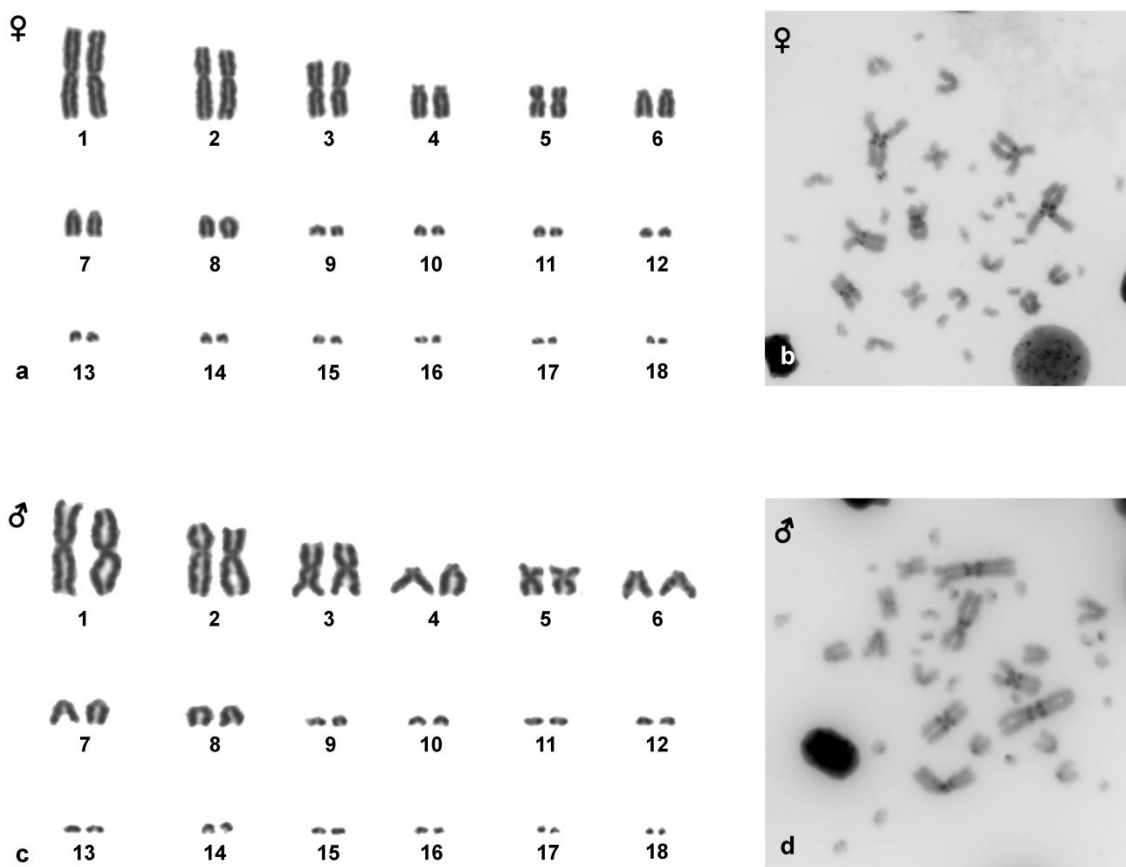


Obr. 20: *Sanzinia madagascariensis* – GATA, rDNA, CGH

GATA samec (a), GATA samice (b), rDNA samec (c), rDNA samice (d), CGH samec (e), CGH samice (f).

Candoia paulsoni

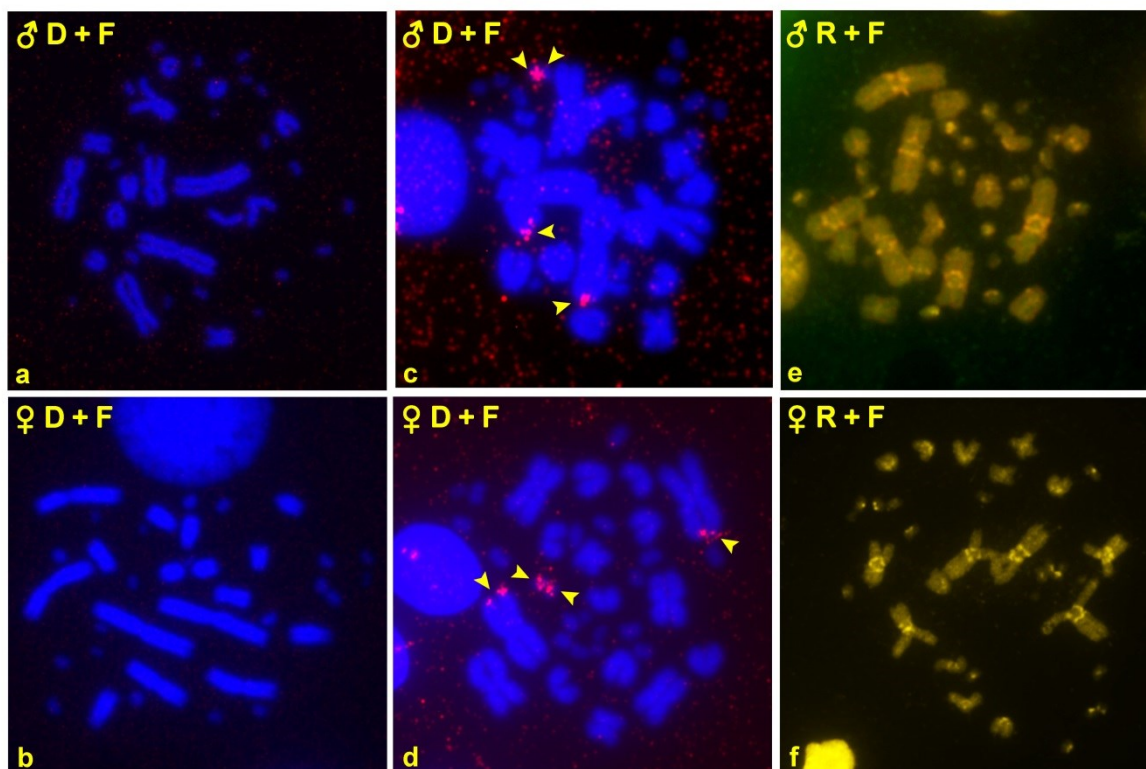
Candoia paulsoni má v diploidním stavu 36 chromozomů. Karyotyp obsahuje 16 makro- a 20 mikrochromozomů (obr. 21). První až třetí a pátý pár makrochromozomů je dvouramenný, čtvrtý a šestý až osmý pár makrochromozomů je akrocentrický. V případě mikrochromozomů nebylo možné morfologii určit. Pomocí metody C-pruhování se podařilo odhalit výraznou akumulaci heterochromatinu v centromerické oblasti všech dvouramenných makrochromozomů (obr. 21b,d).



Obr. 21: *Candoia paulsoni* – karyogram a C-pruhování

Karyotyp samice (a), C-pruhování samice (b), karyotyp samce (c), C-pruhování samce (d).

Akumulace mikrosatelitového motivu $(GATA)_n$ nebyla detekována (obr. 22a,b). Signál rDNA byl detekován na jednom z mikrochromozomových párů a v telomerické oblasti jednoho raménka prvního metacentrického páru makrochromozomů (obr. 22c,d). Pomocí CGH nebyly odhaleny žádné pohlavně specifické rozdíly mezi samčím a samičím karyotypem (obr. 21e,f). Použitými metodami se nepodařilo odhalit pohlavní chromozomy.

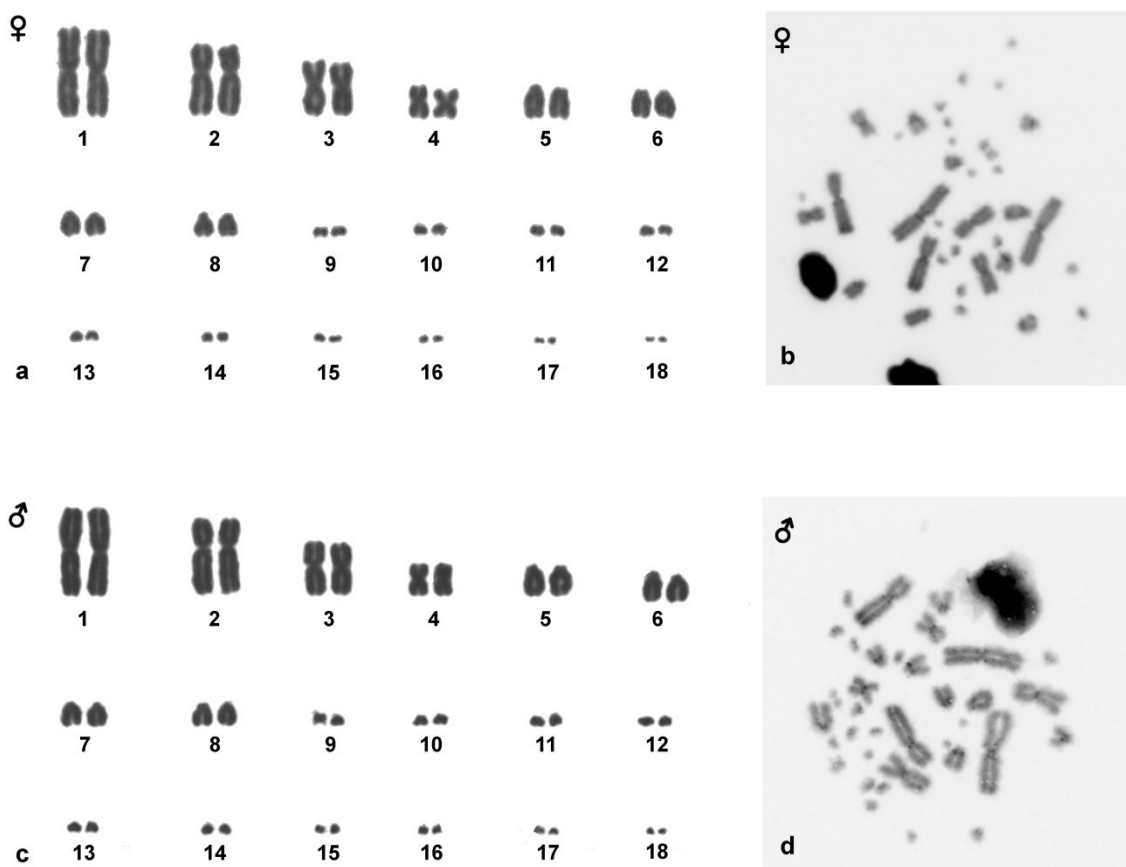


Obr. 22: *Candoia paulsoni* – GATA, rDNA, CGH

GATA samec (a), GATA samice (b), rDNA samec (c), rDNA samice (d), CGH samec (e), CGH samice (f).

Lichanura trivirgata

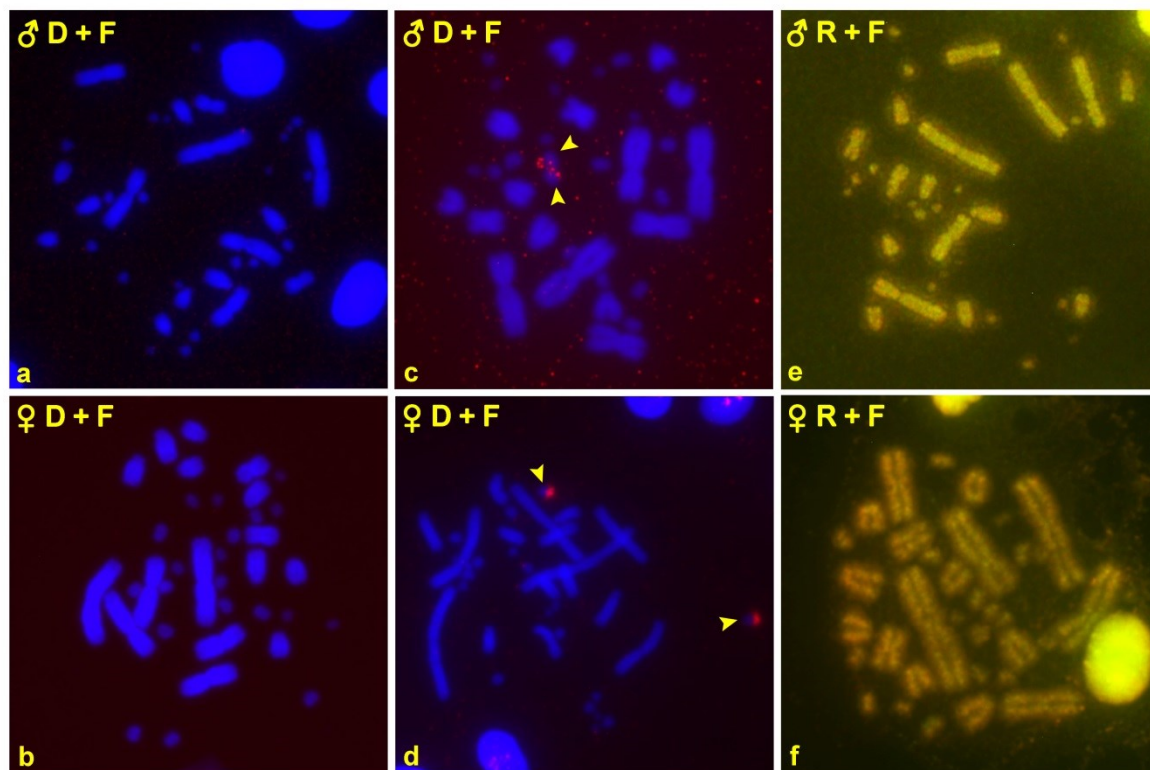
Karyotyp druhu *Lichanura trivirgata* sestává z 36 chromozomů, z toho je 16 makro- a 18 mikrochromozomů (obr. 23). První čtyři makrochromozomové páry jsou dvouramenné. Pátý až osmý pár makrochromozomů je akrocentrický. U mikrochromozomových párů nebylo možné morfologii rozlišit. Konstitutivní heterochromatin byl pomocí C-pruhování vizualizován v oblasti centromer u všech makrochromozomů (obr. 23b,d).



Obr. 23: *Lichanura trivirgata* – karyogram a C-pruhování

Karyotyp samice (a), C-pruhování samice (b), karyotyp samce (c), C-pruhování samce (d).

Mikrosatelitový motiv (GATA)_n nebyl detekován (obr. 24a,b). Akumulace signálu rDNA byla detekována na jednom páru mikrochromozomů (obr. 24c,d). Použitím metody CGH nebyly odhaleny žádné pohlavně specifické rozdíly mezi karyotypy (obr. 24e,f). Pomocí použitých metod se pohlavně specifické rozdíly mezi samčím a samičím karyotypem nepodařilo odhalit.

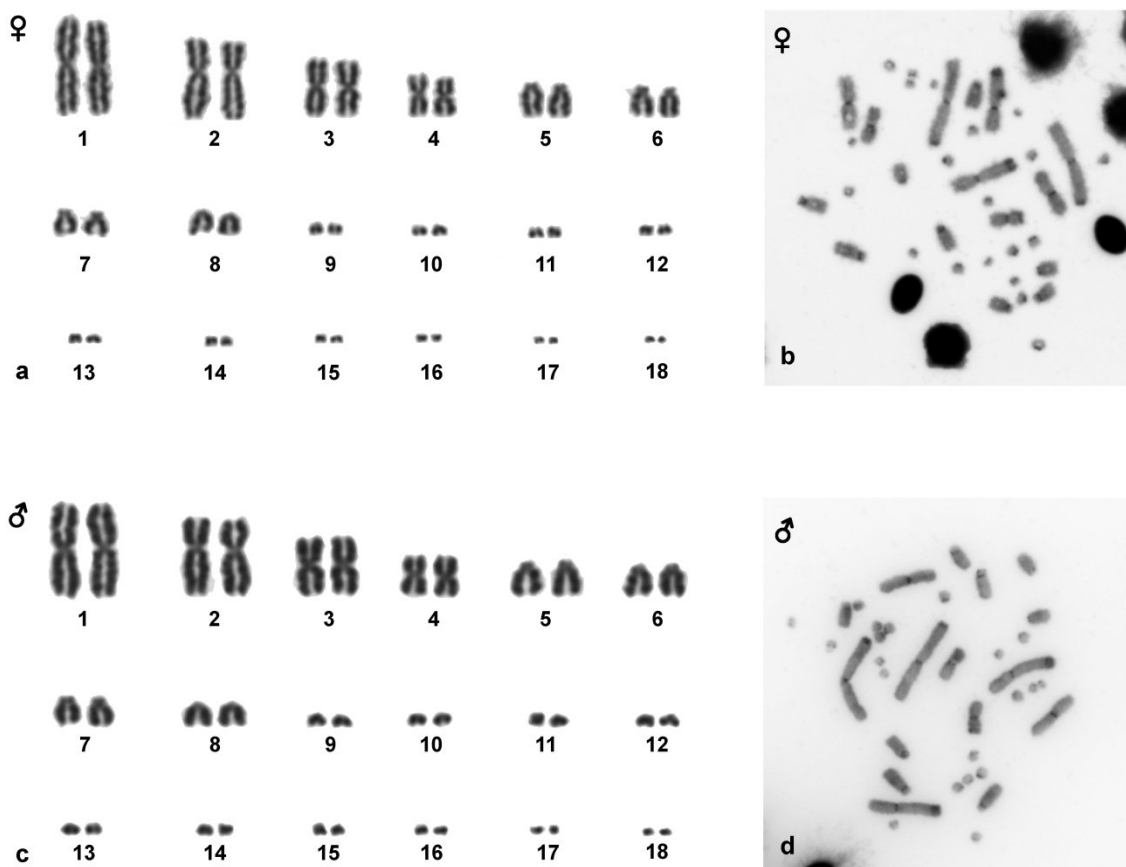


Obr. 24: *Lichanura trivirgata* – GATA, rDNA, CGH

GATA samec (a), GATA samice (b), rDNA samec (c), rDNA samice (d), CGH samec (e), CGH samice (f).

Calabaria reinhardtii

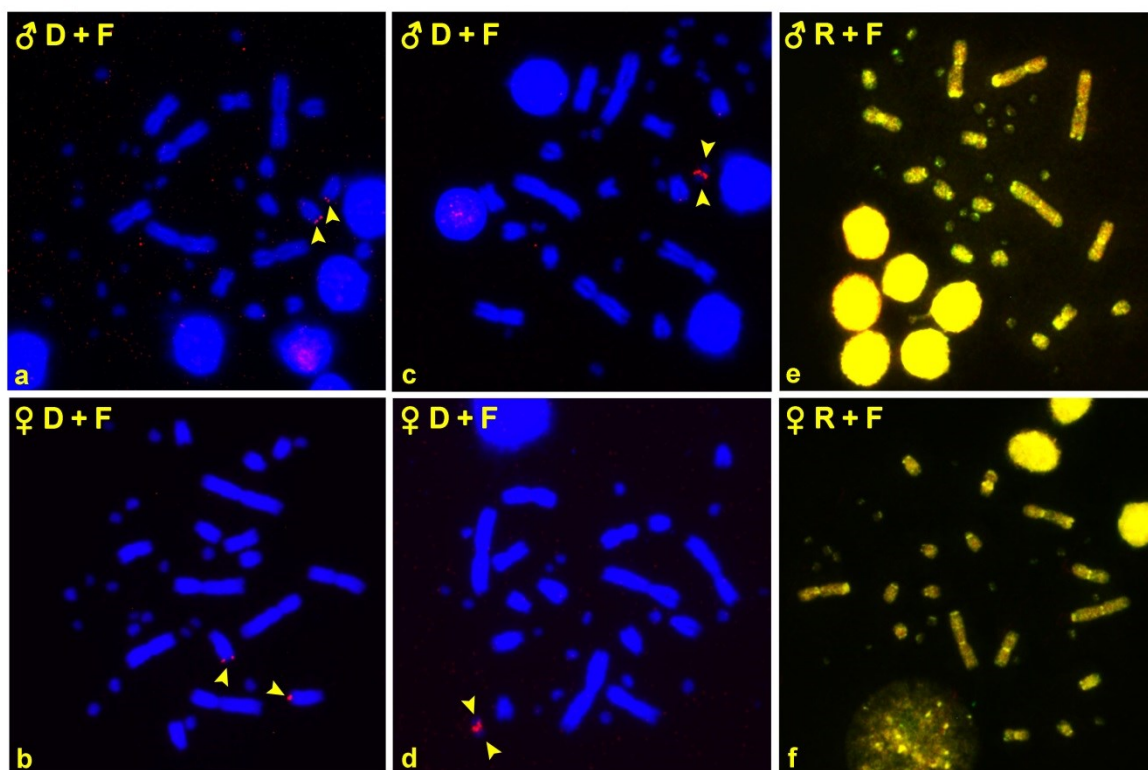
Diploidní počet chromozomů druhu *Calabaria reinhardtii* je 36. Karyotyp tohoto druhu sestává z 16 makro- a 20 mikrochromozomů (obr. 25). První až čtvrtý chromozomový pár je dvouramenný. Pátý až osmý pár je akrocentrický. Morfologii mikrochromozomů nebylo možné vzhledem k jejich velikosti s jistotou určit. Metodou C-pruhování byl detekován heterochromatin v centromerické oblasti u všech makrochromozomů (obr. 25b,d).



Obr. 25: *Calabaria reinhardtii* – karyogram a C-pruhování

Karyotyp samice (a), C-pruhování samice (b), karyotyp samce (c), C-pruhování samce (d)

Akumulace mikrosatelitového motivu (GATA)_n byla detekována v telomerické oblasti q raménka pátého chromozomového páru (obr. 26a,b). K akumulaci rDNA došlo na jednom páru mikrochromozomů (obr. 26c,d). Pomocí metody CGH nebyly odhaleny žádné pohlavně specifické rozdíly v karyotypech (obr. 26e,f). Pohlavní chromozomy se použitými metodami nepodařilo odhalit.



Obr. 26: *Calabaria reinhardtii* – GATA, rDNA, CGH

GATA samec (a), GATA samice (b), rDNA samec (c), rDNA samice (d), CGH samec (e), CGH samice (f).

5. Diskuse

5.1. Popis karyotypů

V této práci je zahrnuto celkem 17 druhů hadů ze sedmi čeledí, přičemž 12 z nich bylo cytogeneticky studováno vůbec poprvé. Většina z nich má v diploidním stavu 36 chromozomů, stejně jako většina ostatních studovaných druhů hadů (Olmo & Signorino 2005). Výjimku tvoří všechny druhy z podčeledi Sanziniinae s diploidním počtem chromozomů $2n = 34$. Stejný počet chromozomů byl nalezen i u druhu *Acrochordus javanicus*. Asi nejzajímavější je však případ druhového komplexu rodu *Boaedon*, kdy cytogenetická data odrážejí výsledky DNA barcodingu a rozdělují studované jedince do tří druhů. Ty se liší nejen v počtu chromozomů ($2n = 34, 40$ a 42), ale i v jejich morfologii a ve velikosti pohlavních chromozomů (obr. 8, obr. 9, obr. 10). Také rozložení heterochromatinu a mikrosatelitových sekvencí na W chromozomu se mezi těmito druhy liší (obr. 6). Přestože jsou hadi v uspořádání karyotypu obecně poměrně stabilní (Oguiura *et al.* 2009), podobná situace jako u druhového komplexu *Boaedon* byla dokumentována i u blízké příbuzných druhů čeledi Colubridae, například u rodu *Thamnodynastes* (Beçak & Beçak 1969), nicméně ani v těchto případech nejsou rozdíly v karyotypu tak výrazné jako v případě rodu *Boaedon*. Příčina odhalených odlišností v karyotypu mezi jednotlivými druhy rodu *Boaedon* je nejasná.

Další zajímavostí odhalenou při studiu karyotypů jednotlivých druhů je *Elaphe bimaculata*, kdy u jednoho ze tří studovaných jedinců tohoto druhu byl zjištěn triploidní počet chromozomů ($3n = 54$). Přestože polyploidie u plazů není tak běžná jako u například u obojživelníků (Schmid *et al.* 2015), nejedná se ani o zcela vzácný jev. Mnohé případy triploidie (případně i tetraploidie) se u plazů vyskytují zejména u nepohlavně rozmnožujících druhů ještěřů (např. Danielyan *et al.* 2008; Moritz & Bi 2011). U hadů byla triploidie popsána jen u dvou druhů. V případě slepáka *Ramphotyphlops braminus* se jedná o druh s obligátní asexualitou a jsou známi pouze samičí jedinci. Triploidie byla zaznamenána u všech zkoumaných jedinců a je možné, že k ní došlo díky hybridizaci rodičovských druhů (Wynn *et al.* 1987). U druhu *Agkistrodon piscivorus* (Viperidae) byl popsán spontánní vznik triploidie u části jedinců v jinak diploidní populaci (Tiersch & Figiel 1991). Ani v jednom případě nebyly u těchto jedinců popsány pohlavní chromozomy. V případě triploidního jedince druhu *E. bimaculata* byly popsány pohlavní

chromozomy ZZW. Pohlaví jedince však nebylo možné s jistotou určit. Pokud by se pohlaví jedince určit podařilo, mohl by tento náález přispět k odhalení molekulárních mechanismů odpovídajících za determinaci pohlaví u hadů. Vzhledem k tomu, že chromozomové suspenze byly připraveny jen z krve, nelze také vyloučit, že jedinec obsahuje mozaiku diploidních a triploidních buněk, jak bylo u plazů dokumentováno u želvy *Platemys platycephala* (Bickham *et al.* 1985). Ověřit přítomnost triploidních buněk v jiných tkáních invazivními metodami však nebylo možné (chovatel to nedovolil).

5.2. Evoluční dynamika W chromozomu

Evoluční dynamika obsahu pohlavního chromozomu W hadů ze skupiny Caenophidia byla studována u 11 druhů z čeledí Acrochordidae, Colubridae, Homalopsidae, Lamprophiidae a Xenodermatidae. Pro lepší pokrytí fylogeneze byla do studie zahrnuta i data z literatury, díky čemuž tak byly pokryty všechny hlavní linie skupiny Caenophidia.

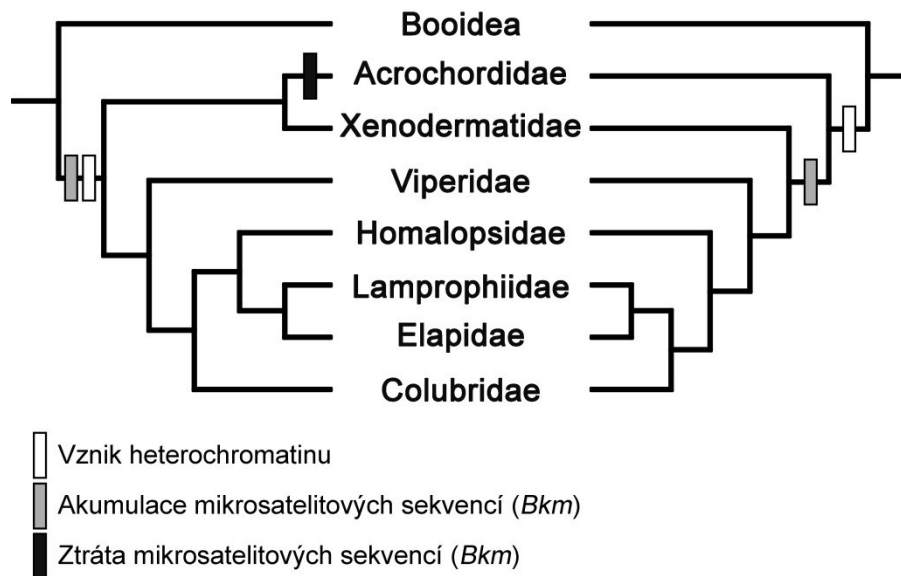
U všech studovaných druhů skupiny Caenophidia byla na W chromozomu detekována přítomnost konstitutivního heretochromatinu, ačkoli jednotlivé druhy se v míře heterochromatinizace lišili. Zatímco byl W chromozom u všech druhů alespoň částečně heterochromatický a v různé míře se morfologicky lišil od pohlavního chromozomu Z, k akumulaci mikrosatelitových sekvencí (GATA, GACA a AG) došlo jen u hadů skupiny Colubroidea, tedy u všech studovaných druhů mimo *Acrochordus javanicus*. Vzhledem k tomu, že akumulace mikrosatelitových sekvencí nebyla prokázána ani u hadů mimo skupinu Caenophidia (O'Meally *et al.* 2010; tato práce), může nepřítomnost repetitivních sekvencí na W chromozomu u druhu *A. javanicus* pomoci s řešením otázky fylogenetické pozice čeledi Acrochordidae na fylogenetickém stromě skupiny Caenophidia (viz obr. 3). Podle principu maximální parsimonie by pak bylo pravděpodobnější umístění čeledi Acrochordidae jako sesterské skupiny ke všem zbývajícím čeledím (obr. 27). V tom případě by pak vznik konstitutivního heterochromatinu na W chromozomu předcházel akumulaci mikrosatelitových sekvencí. Alternativním vysvětlením může být nezávislý vznik W chromozomu u čeledi Acrochordidae a zbývajících čeledí skupiny Caenophidia. Další možností je, že čeleď Acrochordidae je přeci jen sesterská k čeledi Xenodermatidae, a minimálně u druhu *A. javanicus* došlo ke ztrátě akumulace mikrosatelitů. Tato možnost

se však nezdá být příliš pravděpodobná. Ať již z toho důvodu, že ztráta repetitivních sekvencí jen u čeledi ležící právě na bázi skupiny Caenophidia se zdá být přinejmenším zvláštní shodou náhod, nebo čistě proto, že by muselo dojít ke ztrátě nejednoho bloku repetitivních sekvencí. Přestože část genomu obsahující repetitivní sekvence je jednou z velmi dynamických částí genomu (Pokorná *et al.* 2011), ztráta akumulovaných mikrosatelitových sekvencí příliš pravděpodobná není vzhledem k tomu, že u všech zbývajících linií skupiny Caenophidia je přítomnost daných typů repetitivních sekvencí na W chromozomu stabilní, i když se jednotlivé druhy mezi sebou liší v míře akumulace jednotlivých mikrosatelitů (obr. 6). Nepřítomnost mikrosatelitových sekvencí na pohlavním chromozomu W u druhu *A. javanicus* pak zpochybňuje otázku role akumulace *Bkm* při diferenciaci pohlavních chromozomů, která se zdála být právě pro diferenciaci pohlavních chromozomů klíčová (Subramanian *et al.* 2003; O'Meally *et al.* 2010; Matsubara *et al.* 2016a).

Intersticiální telomerické sekvence byly pozorovány na W chromozomu u pěti studovaných druhů: *Boaedon* sp. 2, *Elaphe bimaculata*, *Homalopsis buccata*, *Pantherophis guttata* a *Xenodermus javanicus*. U druhů *E. bimaculata* a *P. guttata* je počet chromozomů karyotypu shodný s pravděpodobným ancestrálním počtem chromozomů ($2n = 36$), dá se tedy předpokládat, že příčinou vzniku ITS u těchto druhů mohou být intrachromozomální přestavby, stejně by tomu mohlo být i druhu *Boaedon* sp. 2 s diploidním počtem chromozomů $2n = 40$, nicméně vliv interchromozomálních přestaveb nelze s jistotou vyloučit. U druhu *X. javanicus* došlo k akumulaci ITS v centromerické oblasti (Rovatsos *et al.* 2015b). U druhu *H. buccata* došlo k extenzivní akumulaci telomerické sekvence téměř po celém chromozomu W. V těchto případech může být za vznik ITS a následnou akumulaci zodpovědná telomerázová aktivita (Nergadze *et al.* 2007; Ruiz-Herrera *et al.* 2008), případně vazba telomerických sekvencí s jiným akumulovaným repetitivním motivem.

Celkově se zdá být pohlavní chromozom W hadů napříč liniemi skupiny Caenophidia poměrně variabilní, a to jak ve velikosti a tvaru, tak i v rozložení heterochromatinu a repetitivních sekvencí (obr. 6). Tato variabilita je v některých případech poměrně výrazná i v případě blízce příbuzných druhů. Asi největší rozmanitost můžeme pozorovat v případě akumulace mikrosatelitových sekvencí, což podporuje hypotézu, že repetitivní sekvence, vyskytující se v nerekombinujících oblastech alozomů, jsou jednou z nejdynamičtějších

částí genomu (Pokorná *et al.* 2011) a zřejmě se liší nejen mezi jednotlivými liniemi, ale i mezi jedinci jednotlivých druhů (Matsubara *et al.* 2016a). Je otázkou, zda stupeň akumulace repetitivních sekvencí skutečně odráží míru diferenciace pohlavních chromozomů.



Obr. 27: Fylogenetické uspořádání skupiny Caenophidia

Možnosti fylogenetického postavení čeledi Acrochordidae v rámci skupiny Caenophidia s alternativními scénáři evoluce heterochromatinu a repetitivních sekvencí (Bkm) na pohlavním chromozomu W. Fylogenetické stromy byly sestaveny podle Pyron *et al.* (2013) (vlevo) a Pyron *et al.* (2014) (vpravo).

5.3. Pohlavní chromozomy hadů mimo skupinu Caenophidia

V práci bylo pomocí molekulárně cytogenetických technik zkoumáno šest druhů hadů mimo skupinu Caenophidia s cílem pokusit se odhalit pohlavní chromozomy těchto hadů. Z toho čtyři druhy byly cytogeneticky studovány vůbec poprvé. Stejně jako dříve studované druhy čeledí Boidae a Pythonidae (Mengden & Stock 1980; Viana *et al.* 2016), mají všechny studované druhy homomorfní a podle všeho málo diferencované pohlavní chromozomy. Přestože v současné době byly popsány XY pohlavní chromozomy u druhů *Boa imperator* (Boidae) a *Python bivittatus* (Pythonidae) (Gamble *et al.* 2017, v tisku), pomocí molekulárně cytogenetických metod se v karyotypech studovaných druhů nepodařilo najít rozdíly mezi pohlavími, a tak se nepodařilo detekovat pohlavní

chromozomy těchto druhů. Vzhledem k tomu, že jsou pohlavní chromozomy hroznější a krajt nehomologické (Gamble *et al.* 2017, v tisku), je možné, že ne všichni hadi mimo skupinu Caenophidia vykazují XX/XY pohlavní determinační systém. Nicméně v případě druhu *Acrantophis dumerili*, u kterého byly dříve popsány pohlavní chromozomy ZW (Mengden & Stock 1980), se jejich přítomnost potvrdit nepodařilo (obr. 15), přestože bylo studováno sedm samic z pěti nepříbuzných linií. Stejně tak se přítomnost ZW pohlavních chromozomů nepodařilo detekovat ani u zbývajících druhů podčeledi Sanziniinae – *Acrantophis madagascariensis* (obr. 17) a *Sanzinia madagascariensis* (obr. 19). Přítomnost ZW pohlavních chromozomů u hadů mimo skupinu Caenophidia se tak nepodařilo potvrdit. Vzhledem k tomu, že pomocí molekulárně cytogenetických metod nelze pohlavní chromozomy hadů mimo skupinu Caenophidia detekovat, je pro odhalení pohlavních chromozomů i u zbývajících linií a zapotřebí využití molekulární markerů.

6. Závěr

Přestože karyotyp většiny druhů hadů sestává z 36 chromozomů s 16 makrochromozomy a 20 mikrochromozomy a odchylky od typického hadího karyotypu nejsou příliš časté (Olmo & Signorino 2005; Oguiura *et al.* 2009), ke změně počtu chromozomů v karyotypu může docházet i u blízce příbuzných druhů, jako je tomu v případě druhového komplexu *Boaedon*.

Rozložení konstitutivního heterochromatinu a akumulace repetitivních sekvencí na pohlavním chromozomu W u hadů skupiny Caenophidia je mezi jednotlivými druhy velmi variabilní. Poměrně výrazně se liší i u blízce příbuzných druhů a navzdory dlouhodobé stabilitě pohlavních chromozomu Z u hadů této skupiny (Rovatsos *et al.* 2015c) se zdá, že minimálně mikrosatelitové motivy akumulované na pohlavním chromozomu W jsou z evolučního hlediska mnohem dynamičtější, což podporuje hypotézu, že diferencované pohlavní chromozomy nesoucí repetitivně sekvence jsou velmi dynamickou částí genomu (Pokorná *et al.* 2011). Naopak chybějící akumulace mikrosatelitových sekvencí na W chromozomu u druhu *Acrochordus javanicus* zpochybňuje předpokládanou úlohu *Bkm* sekvencí v diferenciaci pohlavních chromozomů hadů. Nepřítomnost akumulace repetitivních sekvencí zároveň podporuje sesterskou topologii čeledi Acrochordidae ke všem zbývajícím čeledím skupiny Caenophidia.

V případě hadů mimo skupinu Caenophidia se pohlavní chromozomy pomocí molekulárně cytogenetických metod odhalit nepodařilo. Přestože u čeledí Boidae a Pythonidae se v současnosti podařilo odhalit XX/XY pohlavní determinační systém (Gamble *et al.* 2017, v tisku), studium pohlavních chromozomů mimo skupinu Caenophidia je teprve na počátku a pro pochopení evoluce pohlavních chromozomů hadů bude potřeba dalšího studia pohlavních chromozomů u více linií (včetně skupiny „Scoleophidia“), a to zejména za využití genomických přístupů.

7. Použitá literatura

- Aprea G., Odierna G., Capriglione T., Caputo V., Morescalchi A., Olmo E.** (1996): Heterochromatin and NOR distribution in the chromosomes of six gekkonid species of the genus *Phelsuma* (Squamata: Gekkonidae). *Journal of African Zoology* 110: 341–349.
- Arnemann J., Jakubiczka S., Schmidtke J., Schäfer R., Epplen J.T.** (1986): Clustered GATA repeats (*Bkm* sequences) on the human Y chromosome. *Human Genetics* 73: 301–303.
- Ashley T., Ward D.C.** (1993): A ‘hot spot’ of recombination coincides with an interstitial telomeric sequence in the Armenian hamster. *Cytogenetics and Cell Genetics* 62: 169–171.
- Ayling L.J., Griffin D.K.** (2002): The evolution of sex chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* 99: 125–140.
- Batistic R.F., Ferrarezzi H.**: Nепublikovaná data v **Oguiura N., Ferrarezzi H., Batistic R.F.** (2009): Cytogenetics and molecular data in snakes: A phylogenetic approach. *Cytogenetic and Genome Research* 127: 128–142.
- Bečak W., Bečak M.L.** (1969): Cytotaxonomy and chromosomal evolution in Serpentes. *Cytogenetics* 8: 247–262.
- Becak, M.L. Rabello-Gay M.N., Becak W., Soma M. Batistic R.F. Trajtengertz I.** (1990): The W-chromosome during the evolution and in sex abnormalities of snakes. DNA content, C-banding, , in Olmo E (ed.): Cytogenetics of Amphibians and Reptiles, pp. 221–240 (Birkhäuser Verlag, Basel) v **Olmo E., Signorino G.G.** (2005) Chromorep: a reptile chromosomes database. Dostupné z <http://chromorep.univpm.it>. (Accessed 06/05/2017)
- Bickham J.W., Tucker P.K., Legler J.M.** (1985): Diploid-triploid mosaicism: An unusual phenomenon in side-necked turtles (*Platemys platycephala*). *Science* 227: 1591–1593.
- Booth W., Johnson D.H., Moore S., Schal C., Vargo E.L.** (2011): Evidence for viable, non-clonal but fatherless Boa constrictors. *Biology Letters* 7: 253–256.
- Burbrink F.T., Lawson R., Slowinski J.B.** (2000): Mitochondrial DNA phylogeography of the polytypic North American rat snake (*Elaphe obsoleta*): a critique of the subspecies concept. *Evolution* 54: 2107–2118.
- Cioffi M.D.B., Kejnovský E., Marquioni V., Poltronieri J., Molina W.F., Diniz D., Bertollo L.A.C.** (2012): Correction: The key role of repeated DNAs in sex chromosome evolution in two fish species with ZW sex chromosome system. *Molecular Cytogenetics* 5: 42.
- Cohen M.M., Gans C.** (1970): The chromosomes of the order Crocrodilia. *Cytogenetic and Genome Research* 9: 81–105.
- Dallai R., Talluri M.V.** (1969): A karyological study of three species of Scincidae (Reptilia). *Chromosoma* 27: 86–94.
- Danielyan F., Arakelyan M., Stepanyan I.** (2008): Hybrids of *Darevskia valentini*, *D. armeniaca* and *D. unisexualis* from a sympatric population in Armenia. *Amphibia-Reptilia* 29: 487–504.
- Ellegren H.** (2000): Evolution of the avian sex chromosomes and their role in sex determination. *Communities* 15: 188–192.
- Endow S.A.** (1982): Polytenization of the ribosomal genes on the X and Y chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 100: 375–385.
- Epplen J.T., McCarrey J.R., Sutou S., Ohno S.** (1982): Base sequence of a cloned snake W-chromosome

DNA fragment and identification of a male-specific putative mRNA in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79: 3798–3802.

Ewert M.A., Nelson C.E. (1991): Sex determination in turtles : Diverse patterns and some possible adaptive values. *American Society of Ichthyologists and Herpetologists* 1991: 50–69.

Ezaz T., Stiglec R., Veyrunes F., Marshall Graves J.A. (2006): Relationships between vertebrate ZW and XY sex chromosome systems. *Current Biology* 16: 736–743.

Fishelson L. (1998): Behaviour, socio-ecology and sexuality in damselfishes (Pomacentridae). *Italian Journal of Zoology* 65: 387–398.

Gamble T. (2010): A review of sex determining mechanisms in geckos (Gekkota: Squamata). *Sexual Development* 4: 88–103.

Gamble T., Castoe T.A., Nielsen S. V, Banks J.L, Card D.C., Schield D.R., Schuett G.W., Booth W. (2017): The discovery of XY sex chromosomes in a boa and report the discovery of XY sex chromosomes in a boa and python. *Current Biology*, v tisku.

Gorman G.C. (1969): New chromosome data for 12 species of lacertid lizards. *Journal of Herpetology* 3: 49–54.

Greenbaum E., Portillo F., Jackson K., Kusamba C. (2015): A phylogeny of Central African *Boaedon* (Serpentes: Lamprophiidae), with the description of a new cryptic species from the Albertine Rift. *African Journal of Herpetology* 64: 18–38.

Hajibabaei M., Singer G.A.C., Hebert P.D.N., Hickey D.A. (2007): DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics* 23: 167–172.

Hall T. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.

Harrington S.M., Reeder T.W. (2017): Phylogenetic inference and divergence dating of snakes using molecules, morphology and fossils: new insights into convergent evolution of feeding morphology and limb reduction. *Biological Journal of the Linnean Society*: 1–16.

Head G., May R.M., Pendleton L. (1987): Environmental determination of sex in reptiles. *Nature* 329: 219–222.

Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., DeWaard J.R. (2003): Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 270: 313–21.

Heise P.J., Maxson L.R., Dowling H.G., Hedges S.B. (1995): Higher-level snake phylogeny inferred from mitochondrial DNA sequences of 12S rRNA and 16S rRNA genes. *Molecular Biology and Evolution* 12: 259–265.

Herpin A., Scharl M. (2009): Molecular mechanisms of sex determination and evolution of the Y-chromosome: Insights from the medakafish (*Oryzias latipes*). *Molecular and Cellular Endocrinology* 306: 51–58.

Hsiang A.Y., Field D.J., Webster T.H., Behlke A.D., Davis M.B., Racicot R.A., Gauthier J.A. (2015): The origin of snakes: revealing the ecology, behavior, and evolutionary history of early snakes using genomics, phenomics, and the fossil record. *BMC Evolutionary Biology* 15: 87.

Charlesworth B. (1996): The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Current Biology* 6: 149–162.

Charlesworth B., Charlesworth D. (2000): The degeneration of Y chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 355: 1563–1572.

- Charnov E.L., Bull J.J.** (1977): When is sex environmentally determined? *Nature* 267: 673.
- Itoh M., Sasaki M., Makino S.** (1970): The chromosomes of some Japanese snakes, with special regard to sexual dimorphism. *Japanese Journal of Genetics* 45: 121–128.
- Johnson Pokorná M., Kratochvíl L.** (2016): What was the ancestral sex-determining mechanism in amniote vertebrates? *Biological Reviews* 91: 1–12.
- Jones K.W., Singh L.** (1981): Conserved repeated DNA sequences in vertebrate sex chromosomes. *Human Genetics* 58: 46–53.
- Kawai A., Nishida-Umehara C., Ishijima J., Tsuda Y., Ota H., Matsuda Y.** (2007): Different origins of bird and reptile sex chromosomes inferred from comparative mapping of chicken Z-linked genes. *Cytogenetic and Genome Research* 117: 92–102.
- Kazancıoğlu E., Alonzo S.H.** (2010): A comparative analysis of sex change in labridae supports the size advantage hypothesis. *Evolution* 64: 2254–2264.
- Kejnovsky E., Hobza R., Cermak T., Kubat Z., Vyskot B.** (2009): The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. *Heredity* 102: 533–541.
- Kelly C.M.R., Barker N.P., Villet M.H.** (2003): Phylogenetics of advanced snakes (Caenophidia) based on four mitochondrial genes. *Systematic Biology* 52: 439–459.
- King M., King D.** (1975): Chromosomal evolution in the lizard genus *Varanus* (Reptilia). *Australian Journal of Biological Sciences* 28: 89–108.
- King M.** (1987): Chromosomal evolution in the Diplodactylinae (Gekkonidae, Reptilia). I. Evolutionary relationships and patterns of change. *Australian Journal of Zoology* 35: 507–531.
- Lang J.W., Andrews H. V.** (1994): Temperature-dependent sex determination in crocodylians. *Journal of Experimental Zoology* 270: 28–44.
- Leaché A.D., Sites J.W.** (2010): Chromosome evolution and diversification in north american spiny lizards (genus *Sceloporus*). *Cytogenetic and Genome Research* 127: 166–181.
- Li W.M., Feng Y.P., Zhao R.X., Fan Y.Z., Affara N. a, Wu J.J., Fang J., Tong Q., Wang C., Zhang S.J.** (2008): Sex ratio bias in early-dead embryos of chickens collected during the first week of incubation. *Poultry Science* 87: 2231–2233.
- Mallery C.S., Carrillo M.M.** (2016): A case study of sex-linkage in python regius (Serpentes: Boidae), with new insights into sex determination in Henophidia. *Phyllomedusa* 15: 29–42.
- du Manoir S., Speicher M.R., Joos S., Schröck E., Popp S., Döhner H., Kovacs G., Robert-Nicoud M., Lichter P., Cremer T.** (1993): Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Human Genetics* 90: 590–610.
- Matsubara K., Tarui H., Toriba M., Yamada K., Nishida-Umehara C., Agata K., Matsuda Y.** (2006): Evidence for different origin of sex chromosomes in snakes, birds, and mammals and step-wise differentiation of snake sex chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 18190–5.
- Matsubara K., Sarre S.D., Georges A., Matsuda Y., Marshall Graves J.A., Ezaz T.** (2014): Highly differentiated ZW sex microchromosomes in the Australian *Varanus* species evolved through rapid amplification of repetitive sequences. *PLoS ONE* 9: 1–9.
- Matsubara K., Uno Y., Srikulnath K., Seki R., Nishida C., Matsuda Y.** (2015): Molecular cloning and characterization of satellite DNA sequences from constitutive heterochromatin of the habu snake (*Protobothrops flavoviridis*, Viperidae) and the Burmese python (*Python bivittatus*, Pythonidae).

Chromosoma 124: 529–539.

Matsubara K., O’Meally D., Azad B., Georges A., Sarre S.D., Graves J.A.M., Matsuda Y., Ezaz T. (2016a): Amplification of microsatellite repeat motifs is associated with the evolutionary differentiation and heterochromatinization of sex chromosomes in Sauropsida. *Chromosoma* 125: 111–123.

Matsubara K., Nishida C., Matsuda Y., Kumazawa Y. (2016b): Sex chromosome evolution in snakes inferred from divergence patterns of two gametologous genes and chromosome distribution of sex chromosome-linked repetitive sequences. *Zoological Letters* 2: 19.

Matthey R., Brink J. van. (1960): Nouvelle contribution à la Cytologie comparée des Chamaeleontidae (Reptilia-Lacertilia). *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 67: 333–348.

Mengden G.A., Stock A.D. (1980): Chromosomal evolution in serpentes; a comparison of G and C chromosome banding patterns of some colubrid and boid genera. *Chromosoma* 79: 53–64.

Mengden G.A. (1981): Linear differentiation of the C-band pattern of the W chromosome in snakes and birds. *Chromosoma* 83: 275–287.

Meyne J., Ratliff R.L., Moyzis R.K. (1989): Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Evolution* 86: 7049–7053.

Meyne J., Baker R.J., Hobart H.H., Hsu T.C., Ryder O.A., Ward O.G., Wiley J.E., Wurster-Hill D.H., Yates T.L., Moyzis R.K. (1990): Distribution of non-telomeric sites of the (TTAGGG)_n telomeric sequence in vertebrate chromosomes. *Chromosoma* 99: 3–10.

Moritz C., Bi K. (2011): Spontaneous speciation by ploidy elevation: Laboratory synthesis of a new clonal vertebrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 9733–9734.

Mrosovsky N., Pieau C. (1991): Transitional range of temperature, pivotal temperatures and thermosensitive stages for sex determination in reptiles. *Amphibia-Reptilia* 12: 169–179.

Nanda I., Deubelbeiss C., Guttenbach M., Eppelen J.T., Schmid M. (1990): Heterogeneities in the distribution of (GACA)_n simple repeats in the karyotypes of primates and mouse. *Human Genetics* 85: 187–194.

Nergadze S.G., Santagostino M., Salzano A., Mondello C., Giulotto E. (2007): Contribution of telomerase RNA retrotranscription to DNA double-strand break repair during mammalian genome evolution. *Genome Biology* 8: R260.

Norris T.B., Rickards G.K., Daugherty C.H. (2004): Chromosomes of tuatara, *Sphenodon*, a chromosome heteromorphism and an archaic reptilian karyotype. *Cytogenetic and Genome Research* 105: 93–99.

Nowell P.C. (1960): Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Research* 20: 462–466.

Nur U. (1974): The expected changes in the frequency of alleles affecting the sex ratio. *Theoretical Population Biology* 5: 143–147.

O’Meally D., Patel H.R., Stiglec R., Sarre S.D., Georges A., Marshall Graves J.A., Ezaz T. (2010): Non-homologous sex chromosomes of birds and snakes share repetitive sequences. *Chromosome Research* 18: 787–800.

Oguiura N., Ferrarezzi H., Batistic R.F. (2009): Cytogenetics and molecular data in snakes: A phylogenetic approach. *Cytogenetic and Genome Research* 127: 128–142.

Ohno S. (1967): *Sex Chromosomes and Sex-linked Genes*. Springer-Verlag Berlin. Heidelberg. New York, Berlin.

- Olmo E.** (2005): Rate of chromosome changes and speciation in reptiles. *Genetica* 125: 185–203.
- Olmo E.** (2008): Trends in the evolution of reptilian chromosomes. *Integrative and Comparative Biology* 48: 486–493.
- Olmo E., Signorino G.G.** (2005): Chromorep: a reptile chromosomes database. Dostupné z <http://chromorep.univpm.it>. (Accessed 06/05/2017).
- Ota H., Kamezaki N., Hikida T., Matsui M., Mori A., Hayashi T., Tanabe S.** (1991): Karyotype of *Achalinus spinalis* from Japan: The first karyological description of a xenodermine snake (Colubridae). *Japanese Journal of Herpetology* 14: 12–14.
- Perrin N.** (2009): Sex reversal: A fountain of youth for sex chromosomes? *Evolution* 63: 3043–3049.
- Pokorná M., Kratochvíl L.** (2009): Phylogeny of sex-determining mechanisms in squamate reptiles: Are sex chromosomes an evolutionary trap? *Zoological Journal of the Linnean Society* 156: 168–183.
- Pokorná M., Kratochvíl L., Kejnovský E.** (2011): Microsatellite distribution on sex chromosomes at different stages of heteromorphism and heterochromatinization in two lizard species (Squamata: Eublepharidae: *Coleonyx elegans* and Lacertidae: *Eremias velox*). *BMC Genetics* 12: 90.
- Pokorná M., Rens W., Rovatsos M., Kratochvíl L.** (2014): A ZZ/ZW sex chromosome system in the Thick-tailed gecko (*Underwoodisaurus milii*; Squamata: Gekkota: Carphodactylidae), a member of the ancient gecko lineage. *Cytogenetic and Genome Research* 142: 190–196.
- Poltronieri J., Marquioni V., Bertollo L.A.C., Kejnovsky E., Molina W.F., Liehr T., Cioffi M.B.** (2013): Comparative chromosomal mapping of microsatellites in Leporinus species (Characiformes, Anostomidae): Unequal accumulation on the W chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* 142: 40–45.
- Pyron R.A., Burbrink F.T., Colli G.R., de Oca A.N.M., Vitt L.J., Kuczynski C.A., Wiens J.J.** (2011): The phylogeny of advanced snakes (Colubroidea), with discovery of a new subfamily and comparison of support methods for likelihood trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 58: 329–342.
- Pyron R.A., Burbrink F.T., Wiens J.J.** (2013): A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evolutionary Biology* 13: 93.
- Pyron R.A., Hendry C.R., Chou V.M., Lemmon E.M., Lemmon A.R., Burbrink F.T.** (2014): Effectiveness of phylogenomic data and coalescent species-tree methods for resolving difficult nodes in the phylogeny of advanced snakes (Serpentes: Caenophidia). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 81: 221–231.
- de Queiroz A., Lawson R., Lemos-Espinal J.A.** (2002): Phylogenetic relationships of North American garter snakes (*Thamnophis*) based on four mitochondrial genes: How much DNA sequence is enough? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 22: 315–329.
- Ray-Chaudhuri S.P., Singh L., Sharma T.** (1971): Evolution of sex-chromosomes and formation of W-chromatin in snakes. *Chromosoma* 33: 239–251.
- Reddon A.R., Hurd P.L.** (2013): Water pH during early development influences sex ratio and male morph in a West African cichlid fish, *Pelvicachromis pulcher*. *Zoology* 116: 139–143.
- Rice W.R.** (1987): The accumulation of sexually antagonistic genes as a selective agent promoting the evolution of reduced recombination between primitive sex chromosomes. *Evolution* 41: 911–914.
- Rovatsos M., Kratochvíl L., Altmanová M., Pokorná M.J.** (2015a): Interstitial telomeric motifs in squamate reptiles: When the exceptions outnumber the rule. *PLoS ONE* 10: 1–14.
- Rovatsos M., Johnson Pokorná M., Kratochvíl L.** (2015b): Differentiation of sex chromosomes and karyotype characterisation in the dragonsnake *Xenodermus javanicus* (Squamata: Xenodermatidae).

Cytogenetic and Genome Research 147: 48–54.

Rovatsos M., Vukić J., Lymberakis P., Kratochvíl L. (2015c): Evolutionary stability of sex chromosomes in snakes. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 282: 20151992.

Rovatsos M., Johnson Pokorná M., Altmanová M., Kratochvíl L. (2015d): Female heterogamety in Madagascar chameleons (Squamata: Chamaeleonidae: *Furcifer*): differentiation of sex and neo-sex chromosomes. *Scientific Reports* 5: 13196.

Ruiz-Herrera A., Nergadze S.G., Santagostino M., Giulotto E. (2008): Telomeric repeats far from the ends: Mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenetic and Genome Research* 122: 219–228.

Ruiz García J.A., Hernando A. (2007): Standard karyotype and nucleolus organizer region of Neotropical blindsnake *Typhlops brongersmianus* (Serpentes: Typhlopidae). *Acta Herpetologica* 2: 117–120.

Rutkowska J., Badyaev A. V. (2008): Meiotic drive and sex determination: molecular and cytological mechanisms of sex ratio adjustment in birds. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological sciences* 363: 1675–86.

Sarre S.D., Georges A., Quinn A. (2004): The ends of a continuum: Genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles. *BioEssays* 26: 639–645.

Shine R., Bull J.J. (1977): Skewed sex ratios in snakes. *Copeia* 2: 228–234.

Schmid M., Evans B.J., Bogart J.P. (2015): Polyploidy in Amphibia. *Cytogenetic and Genome Research* 145: 315–330.

Singh L., Sharma T., Ray-Chaudhuri S.P. (1970): Multiple sex-chromosomes in the common Indian krait, *Bungarus caeruleus* Schneider. *Chromosoma* 31: 386–391.

Singh L. (1972a): Evolution of karyotypes in snakes. *Chromosoma* 38: 185–236.

Singh L. (1972b): Multiple W chromosome in a sea snake, *Enhydrina schistosa* Daudin. *Experientia* 28: 95–97.

Singh L., Purdom I.F., Jones K.W. (1980): Sex chromosome associated satellite DNA: evolution and conservation. *Chromosoma* 79: 137–57.

Slowinski J.B., Lawson R. (2002): Snake phylogeny: evidence from nuclear and mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 24: 194–202.

Solórzano A., Gutiérrez J.M., Cerdas L. (1989): Notes on the natural history and karyotype of the colubrid snake, *Hydromorphus concolor* Peters, from Costa Rica. *Journal of Herpetology* 23: 314–315.

Steinemann S., Steinemann M. (2005): Retroelements: Tools for sex chromosome evolution. *Cytogenetic and Genome Research* 110: 134–143.

Subramanian S., Mishra R.K., Singh L. (2003): Genome-wide analysis of *Bkm* sequences (GATA repeats): Predominant association with sex chromosomes and potential role in higher order chromatin organization and function. *Bioinformatics* 19: 681–685.

Sumner A.T. (1972): A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research* 75: 304–306.

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. (2013): MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.

Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. (1994): ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix

choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680.

Tiersch T.R., Figiel C.R. (1991): A triploid snake. *Copeia* 1991: 838–841.

Trask B.J. (1991): Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends in Genetics* 7: 149–154.

Uetz P., Freed P., Hošek J. (eds) (2016): The Reptile Database. Dostupné z <http://www.reptile-database.org> (Accessed 06/05/2017).

Ventura K., Silva M.J.J., Fagundes V., Christoff A.U., Yonenaga-Yassuda Y. (2006): Non-telomeric sites as evidence of chromosomal rearrangement and repetitive (TTAGGG)_n arrays in heterochromatic and euchromatic regions in four species of *Akodon* (Rodentia, Muridae). *Cytogenetic and Genome Research* 115: 169–175.

Viana P.F., Ribeiro L.B., Souza G.M., Chalkidis H.D.M., Gross M.C., Feldberg E. (2016): Is the karyotype of neotropical boid snakes really conserved? Cytotaxonomy, chromosomal rearrangements and karyotype organization in the Boidae family. *PLoS ONE* 11: 1–16.

Vicoso B., Emerson J.J., Zektser Y., Mahajan S., Bachtrog D. (2013): Comparative sex chromosome genomics in snakes: Differentiation, evolutionary strata, and lack of global dosage compensation. *PLoS Biology* 11: e1001643.

Viets B.E., Ewert M.A., Talent L.G., Nelson C.E. (1994): Sex-Determining Mechanisms in Squamate Reptiles. *The Journal of Experimental Zoology* 270: 45–56.

Wiens J.J., Hutter C.R., Mulcahy D.G., Noonan B.P., Townsend T.M., Sites J.W., Reeder T.W. (2012): Resolving the phylogeny of lizards and snakes (Squamata) with extensive sampling of genes and species. *Biology Letters* 8: 1043–1046.

Young M.J., O’Meally D., Sarre S.D., Georges A., Ezaz T. (2013): Molecular cytogenetic map of the central bearded dragon, *Pogona vitticeps* (Squamata: Agamidae). *Chromosome Research* 21: 361–374.

Zheng Y., Wiens J.J. (2016): Combining phylogenomic and supermatrix approaches, and a time-calibrated phylogeny for squamate reptiles (lizards and snakes) based on 52 genes and 4162 species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 94: 537–547.