

Povoľujem zapožičanie svojej diplomovej práce pre študijné účely a prosím, aby bola vedená presná evidencia vypožičiavateľov. Prevzaté údaje je vypožičiavateľ povinný riadne citovať.

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Študijný program: Biologie
Študijný odbor: Genetika, molekulární biologie a virologie



Bc. Michaela Pappová

**Analýza pohlavních chromozómov a repetitívne usporiadaných génov u vybraných
vtáčkarovitých a araneomorfných pavúkov**

Analysis of sex chromosomes and gene clusters in selected mygalomorph and araneomorph spiders

Diplomová práca

Školiteľ: RNDr. Jiří Král, Dr.
Konzultant: Mgr. Martin Forman

Praha, 2019

Prehlásenie:

Prehlasujem, že som záverečnú prácu spracovala samostatne a že som uviedla všetky použité informačné zdroje a literatúru. Táto práca ani jej podstatná časť nebola predložená k získaniu iného alebo rovnakého akademického titulu.

V Prahe, 12.08.2019

Podpis

Pod'akovanie:

Rada by som poďakovala svojmu školiteľovi doc. RNDr. Jiřímu Královi, Dr. za odborné vedenie mojej diplomovej práce, trpezlivosť a cenné rady. Ďalej by som sa chcela poďakovať Mgr. Martinovi Formanovi za ochotu a pomoc v priebehu experimentálnej časti práce a za pomoc pri spracovaní a vyhodnocovaní výsledkov. Mgr. Alexandrovi Semberovi, PhD. rovnako za pomoc v priebehu experimentálnej časti práce a vyhodnocovaní výsledkov. Rada by som sa tiež poďakovala Mgr. Davidovi Sadílkovi a všetkým súčasným aj bývalým členom laboratória, za pomoc a poskytnuté rady. Poďakovanie patrí Dr. Petrovi Ngueynovi a kolegom z Laboratória molekulárnej cytogenetiky Entomologického ústavu AV ČR, České Budějovice za poskytnutie materiálu a informácií týkajúcich sa experimentálnej časti diplomovej práce.

Diplomová práca vznikla v rokoch 2015 – 2019 v rámci grantového projektu GAČR (16-10298S) a SVV (260314).

Abstrakt:

Diplomová práca sa zaoberá evolúciou pohlavných chromozómov a repetitívne usporiadaných génov u vybraných vtáčkarovitých a araneomorfných pavúkov. Pavúky sa vyznačujú značnou zložitou systémom pohlavných chromozómov, ich karyotypy obsahujú viacero pohlavných chromozómov X. Okrem toho obsahujú tiež pár alebo dokonca dva páry nediferencovaných pohlavných chromozómov X a Y. Použité metódy zahŕňujú metódy klasickej cytogenetiky (príprava chromozómových preparátov, C-pruhovanie) a molekulárnej cytogenetiky (fluorescenčná in situ hybridizácia a komparatívna genómová hybridizácia). U študovaných vtáčkarov boli odhalené zložité pohlavné systémy. U vtáčkarov *Atropothele socotrana* a *Poecilotheria vittata* sa jedná o neopohlavné chromozómy. Analýza molekulárnej diferenciácie pohlavných chromozómov naznačuje nízku diferenciáciu chromozómu Y u neopohlavných chromozómov a párov nediferencovaných pohlavných chromozómov XY. U haplogynného pavúka *Kukulcania aff. hibernalis* (X_1X_2Y) bol naopak Y značne diferencovaný, špecifický samčí signál pokrýval celý chromozóm. Detekcie 18S rDNA ukázala, že karyotypy väčšiny analyzovaných vtáčkarov a haplogynných pavúkov obsahujú nízky počet (1 alebo 2) nukleolárnych organizátorov jadierka lokalizovaných terminálne, čo odpovedá predpokladanému ancestrálnemu stavu u pavúkov. U niektorých vtáčkarov bol však počet NOR zvýšený. Z ďalších repetitívne usporiadaných génov boli detegované gény pre 5S rRNA a histón H3, a to u zástupcov rodu *Poecilotheria*. Jedná sa o jedny z prvých detekcií týchto génov u pavúkovcov.

Kľúčové slová: chromozóm, karyotyp, konštitutívny heterochromatín, vtáčkar, nukleolárny organizátor, haplogynný pavúk, pohlavný chromozóm, repetitívne usporiadané gény

Abstract:

The diploma thesis focuses on study of sex chromosomes evolution and repetitive organized genes of chosen mygalomorph and araneomorph spiders. Spiders are characterized by complexity of sex chromosome systems, their karyotypes contain multiple sex chromosomes X. Besides multiple X chromosomes they also contain a pair or two pairs of nondifferentiated sex chromosomes X and Y. The used methods include methods of classical cytogenetics (preparation of chromosome slides, C-banding) and methods of molecular cytogenetics (fluorescent *in situ* hybridization and comparative genome hybridization). Complex sex systems were discovered in the studied Theraphosidae spiders. In Theraphosidae spiders *Atropothele socotrana* and *Poecilotheria vittata* neo-sex chromosomes were found. Analysis of molecular differentiation of sex chromosomes suggests low differentiation of Y chromosome in neo-sex chromosomes and pair of nondifferentiated sex chromosomes XY. In haplogyne spider *Kukulcania aff. hibernalis* (X_1X_2Y), the Y chromosome was significantly differentiated, male specific signal covered the whole chromosome. Detection of 18S rDNA showed that karyotypes of majority of analysed Theraphosidae spiders and haplogyne spiders contain low number (1 or 2) of nucleolar organizing regions localized terminally, which corresponds with predicted ancestral state of spiders. Some Theraphosidae spiders showed increased numbers of NOR. Of another repetitively organized genes, genes for 5S rRNA and histon H3 were detected in members of *Poecilotheria* family. This is one of the first detections of these genes in arachnids.

Keywords: chromosome, constitutive heterochromatin, karyotype, mygalomorph, nucleolus organizer region, sex chromosome, spider, gene cluster

1	ÚVOD	8
1.1	CIELE PRÁCE	10
2	PREHĽAD LITERATÚRY	11
2.1	FYLOGENÉZA A BIOLÓGIA PAVÚKOV	11
2.1.1	<i>Fylogenéza a biológia vtáčkarov</i>	11
2.2	EVOLÚCIA POHLAVNÝCH CHROMOZÓMOV	12
2.3	EVOLÚCIA POHLAVNÝCH CHROMOZÓMOV U PAVÚKOV	15
2.4	EVOLÚCIA NEDIFERENCOVANÝCH POHLAVNÝCH CHROMOZÓMOV U PAVÚKOV	17
2.5	EVOLÚCIA MEIÓZY PAVÚKOV	18
2.6	REPETITÍVNE USPORIADANÉ GÉNY	20
2.6.1	<i>Jadierko a nukleolárne organizátory jadierka</i>	20
2.6.2	<i>Gény pre 5S rRNA</i>	23
2.6.3	<i>Histónové gény</i>	23
2.6.4	<i>Gény pre malé jadrové RNA</i>	24
3	MATERIÁL A METÓDY	26
3.1	MATERIÁL	26
3.2	PRÍPRAVA CHROMOZÓMOVÝCH PREPARÁTOV	28
3.3	C - PRUHOVANIE	29
3.4	FLUORESCENČNÁ <i>IN SITU</i> HYBRIDIZÁCIA (FISH)	30
3.4.1	<i>Vizualizácia génových markerov</i>	30
3.4.2	<i>Príprava sond pre génové markery</i>	31
3.4.3	<i>FISH s nepriamo značenou sondou</i>	34
3.5	KOMPARATÍVNA GENÓMOVÁ HYBRIDIZÁCIA (CGH)	37
3.5.1	<i>Izolácia DNA</i>	37
3.5.2	<i>Príprava sond</i>	37
3.5.3	<i>Príprava kompetitorovej DNA</i>	38
3.5.4	<i>CGH</i>	40
4	VÝSLEDKY	41
4.1	MYGALOMORPHAE	41
4.1.1	<i>Barychelidae</i>	41
4.1.2	<i>Theraphosidae</i>	45
4.2	ENTELEGYNAE	68
4.2.1	<i>Agelenidae</i>	68
4.3	HAPLOGYNAE	69
4.3.1	<i>Filistatidae</i>	69
5	DISKUSIA	73
5.1	EVOLÚCIA POHLAVNÝCH CHROMOZÓMOV	74
5.2	REPETITÍVNE USPORIADANÉ GÉNY	79
6	ZHRNUTIE	82
7	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	84

Zoznam skratiek

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	páry báz (z angl. base pair)
Brij	neiónový polyoxyetylénový surfaktant
BSA	hovädzí sérový albumín (z angl. bovine serum albumine)
CGH	komparatívna genómová hybridizácia (z angl. comparative genome hybridization)
Cot-1 DNA	frakcia DNA (použitá pre blokovanie nešpecifických hybridizácií)
CTAB	hexadecyltrimethylammonium bromid
Cy3	fluorescenčné farbivo cyanine dye 3
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]oktan
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindol
DOP PCR	polymerázová reťazová reakcia s využitím oligonukleotidov z čiastočne degenerovaných sekvencií (z angl. degenerate oligonucleotide – primed PCR)
dNTP	zmes štyroch deoxynukleosid trifosfátov (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
ETS	vonkajší prepisovaný medzerník (z angl. external transcribed spacer)
FITC	fluoresceín isotiokyanát (angl. fluorescein isothiocyanate)
FISH	fluorescenčná in situ hybridizácia (angl. fluorescent in situ hybridization)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina (z angl. messenger RNA)
ITS	vnútorné transkribované medzerníky (z angl. internal transcribed spacer)
NCBI	National Center for Biotechnology Information (USA)
NOR	nukleolárny organizátor (z angl. nucleolus organizer region)
PBS	pufor obsahujúci NaCl, KCl, KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O
PCR	polymerázová reťazová reakcia, metóda amplifikácie DNA
rDNA	úseky DNA kódujúce gény pre ribozomálnu RNA
rRNA	ribozomálna RNA
SCP	pár pohlavných chromozómov (z angl. sex chromosome pair)
snRNA	malá jadrová RNA (z angl. small nuclear RNA)
SSC	tzv. SSC puffer, 1x SSC obsahuje 0,15 mol/l chloridu sodného, 0,015 mol/l citrátu sodného
T_m	teplota topenia (z angl. melting temperature)
UBF	protein zúčastňujúci sa transkripcie 45S rDNA (z ang. upstream binding factor)

1 Úvod

Rad pavúky (Araneae) patrí medzi najviac diverzifikované skupiny živočíchov. Pavúky sú z evolučného hľadiska užitočné modely vďaka ich početnosti a rôznorodosti (Buchar a Kúrka 1998). Z hľadiska genetiky sú pavúky veľmi zaujímavé hoci majú veľmi komplikovaný a málo preštudovaný systém pohlavných chromozómov. Systémy sú najčastejšie tvorené niekoľkými rôznymi pohlavnými chromozómami X, táto situácia je u ostatných skupín organizmov vzácna. Za fylogeneticky pôvodný pohlavný systém chromozómového určenia pohlavia u pavúkov je považovaný systém X_1X_20 (0 = neprítomnosť pohlavného chromozómu Y). Samci nesú 2 nehomologické chromozómy X (X_1X_2). Samice majú 2 páry X ($X_1X_1X_2X_2$). Doterajšie štúdie ukazujú, že chromozómové určenie pohlavia pavúkov môže byť omnoho zložitejšie. Okrem pohlavných chromozómov X, zahŕňa aj pár primitívnych, morfológicky nediferencovaných pohlavných chromozómov proto – X a proto – Y. Podľa tejto hypotézy vznikajú chromozómy X nondisjunkciou chromozómu proto – X (Král *et al.* 2013).

Morfológicky diferencované pohlavné chromozómy môžeme identifikovať analýzou ich správania počas meiózy heterogametického pohlavia, a to ako metódami klasickej, tak molekulárnej cytogenetiky. Metódami klasickej cytogenetiky sledujeme správanie pohlavných chromozómov a ich morfológiu v mitóze a meióze. Tieto prístupy sú na pavúky aplikované už takmer storočie (Král *et al.* 2013). Oproti tomu aplikácia molekulárno cytogenetických metód je u pavúkov veľmi zriedkavá. V rôznych oblastiach by mohla významne napomôcť k lepšiemu pochopeniu evolúcie zložitých systémov pohlavných chromozómov tejto skupiny. Fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH) nám umožňuje lokalizovať repetitívne usporiadané gény v oblasti nukleolárneho organizátoru jadierka (NOR) a iné sekvencie a vylúčiť alebo naopak potvrdiť ich prítomnosť na pohlavných chromozómoch. Diferenciáciu primitívnych chromozómových párov X a Y na molekulárnej úrovni je možné stanovovať špecifickou variantou FISH tzv. komparatívnou genómovou hybridizáciou (CGH). Správne pochopenie molekulárnej stavby systémov pohlavných chromozómov u pavúkov môže mať význam pri analýze karyotypovej evolúcie radu, ale taktiež môže mať dopad na lepšie pochopenie všeobecných aspektov biológie pohlavných chromozómov a ich evolúciu.

Predložená práca sa zaoberá evolúciou pohlavných chromozómov u vybraných skupín pavúkov, a to práve aplikáciou metód klasickej a molekulárnej cytogenetiky. Je zameraná hlavne na skupiny pavúkov, ktoré sú málo preštudované, konkrétne na infrarad

Mygalomorphae – vtáčkare a haplogynné pavúky. Zástupcovia vtáčkarov žijú prevažne v trópoch, u nás žijú iba tri druhy čeľade Atypidae. Čo sa týka haplogynných pavúkov, žijú u nás len zástupcovia niekoľkých čeľadí. Ako modelové skupiny figurujú v práci čeľade, ktoré sa v strednej Európe nevyskytujú, nieje však ťažké ich získať.

1.1 Ciele práce

Moja diplomová práca bola zameraná na analýzu pohlavných chromozómov u vybraných pavúkov. Hlavným cieľom práce bolo lepšie objasniť evolúciu pohlavných chromozómov u pavúkov metódami klasickej a molekulárnej cytogenetiky. V rámci práce na tejto komplexnej téme boli vytýčené tri čiastkové ciele:

- stanoviť základné karyotypové charakteristiky a distribúciu NOR u doteraz neštudovaných druhov mygalomorfných a haplogynných pavúkov
- otestovať prítomnosť vybraných, bežne používaných molekulárno cytogenetických znakov na neobvyklých pohlavných chromozómoch rodu *Poecilotheria*
- analyzovať diferenciaciu pohlavných chromozómov na molekulárnej úrovni

2 Prehľad literatúry

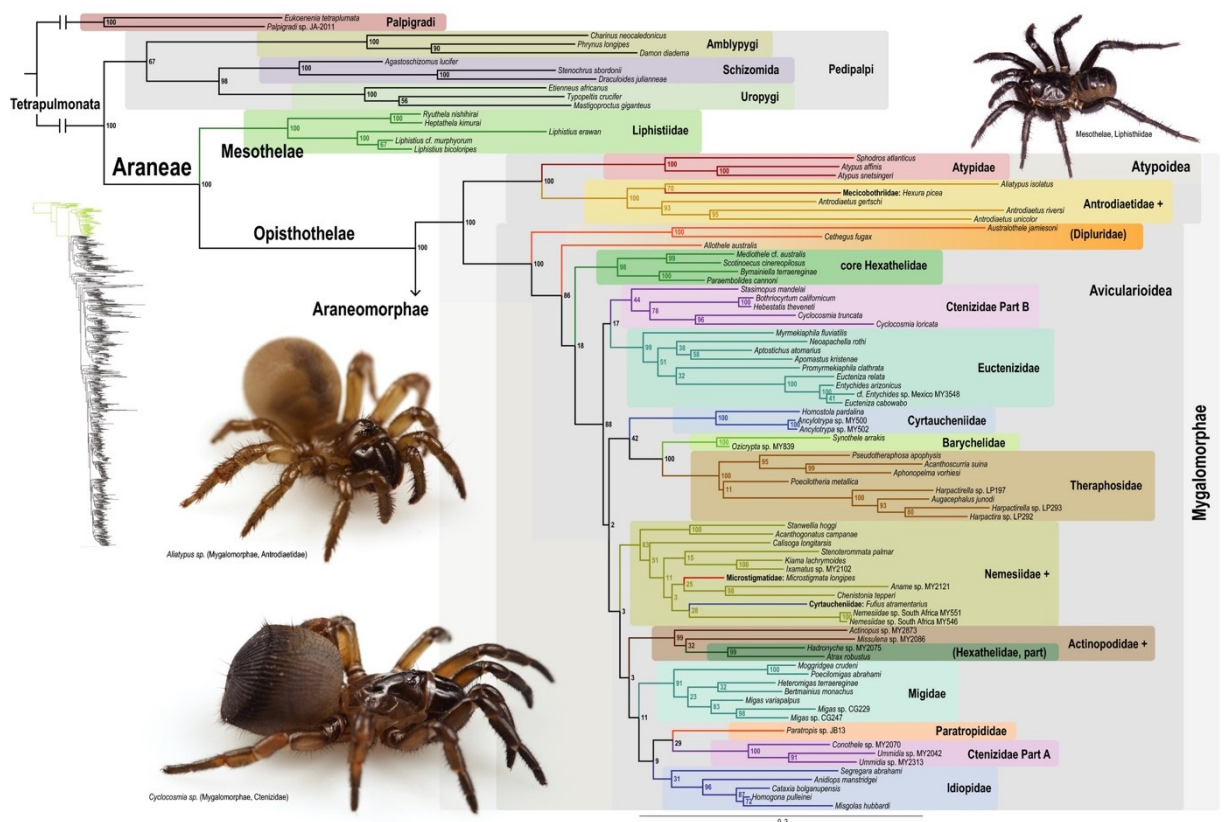
2.1 Fylogenéza a biológia pavúkov

Pavúky (Araneae) patria medzi najviac diverzifikované skupiny živočíchov, ktoré obývajú takmer všetky terestriálne ekosystémy Zeme. Začiatok taxonomickej a ekologickej diverzifikácie sa datuje od karbónu, viac ako 380 miliónov rokov (Dunlop *et al.* 2019). Dodnes bolo popísaných 48 088 druhov (World Spider Catalog 2019). Okrem pozoruhodnej ekológie, rôznorodosti a početnosti sú pavúky vďaka pomerne jednoduchému zberu a identifikácii veľmi užitočné modely pre behaviorálnu a evolučnú biológiu. Napriek tomu ich evolučné vzťahy stále nie sú uspokojivo vysvetlené napríklad medzi vtáčkarmi (Lüddecke *et al.* 2018). Táto rozsiahla skupina je rozdelená do dvoch hlavných skupín Mesothelae a Opisthothelae. Mesothelae patria medzi najprimitívnejšie žijúce pavúky a sú považované za evolučne pôvodné. V súčasnosti do tejto skupiny patrí jediná čeľaď Liphistiidae, ktorá je rozdelená na dve podčeláde Liphistiinae a Heptathelinae (Xu *et al.* 2015, 2016). Podrad Opisthothelae je tvorený dvoma vetvami, Mygalomorphae (vtáčkare) a Araneomorphae (dvojpľúcne). Araneomorfné pavúky zahŕňajú viac ako 90% známych druhov pavúkov (Hendrixson a Bond 2007). Skupina Araneomorphae sa vetví na Entelegynae a Haplogynae a niekoľko menších skupín nejasnej pozície. Skupina Entelegynae zahŕňa okolo 30 000 druhov, pričom Haplogynae len 2500 (Coddington a Levi 1991).

2.1.1 Fylogenéza a biológia vtáčkarov

Mygalomorphae je menej rozmanitá než sesterská skupina Araneomorphae a zahŕňa asi 6% všetkých pavúkov (Selden a Gall 1992). Mygalomorphae zahŕňa mnoho ekologických foriem pavúkov napr. „trapdoor spiders“ (pavúky, ktoré si tvoria nory uzavreté padacími dvierkami), „funnel web spiders“ (pavúky, tvoriace sítě so vstupným tubulovitým otvorom, pripomínajúci lievik), „purse web“ (Atypidae) (nora vyúsťuje do uzavretej trubice, ležiacej na povrchu). Vtáčkare patria medzi veľké, dlho žijúce pavúky, ktoré sú považované za starobylú monofyletickú skupinu. Zachovali si niekoľko znakov typických pre primitívne pavúky, napr. dva páry pľúcnych vakov a rovnobežne usporiadané koncové články klepietok. Aj napriek svojej bohatej evolučnej histórii, ktorá siaha do obdobia druhohôr (250 mil. rokov) je táto skupina málo prebádaná (Bond *et al.* 2012). Bezpochýb najznámejšou skupinou sú zástupcovia čeľadi Theraphosidae, do ktorej je zaradených viac ako 1000 druhov obsiahnutých v 147 rodoch. Tieto druhy obývajú tropické a subtropické oblasti po celom svete (World Spider Catalog 2019). Pavúky z čeľade Theraphosidae patria medzi stredne veľké až veľké druhy, vrátane najväčších (čo sa hmotnosti týka) pavúkov rodu *Theraphosa*. Vďaka

svojej veľkosti a rozšíreniu patria medzi najznámejšie pavúkovce na Zemi, známe tiež ako tarantuly (Foley *et al.* 2018). Zástupcovia tejto čeľadi sú tak populárnymi obyvateľmi vivárií (Kovářík 2006). V súčasnosti sa čeľaď delí do 12 podčeľadí (v zátvorke uvedený počet druhov príslušnej podčeľade): Acanthopelminae (2), Aviculariinae (31), Eumonophorinae (62), Harpactirinae (62), Ischnocolinae (85), Ornithoctoninae (27), Psalmopoeinae (27), Schismatothelinae (21), Selenocosmiinae (128), Selenogyrinae (10), Stromatopelminae (10), výrazne najpočetnejšou podčeľad'ou, do ktorej patrí prevažná väčšina druhov (radené do 68 rodov) je Theraphosinae (526), Thrigmopoeinae (9) (Tarantupedia 2019). Vnútorňa fylogenieza vtáčkarov dodnes nebola uspokojivo vysvetlená a aplikácia molekulárno fylogenetických postupov začala relatívne nedávno (Foley *et al.* 2018).



Obr. 1 Kladogram skupiny Mygalomorphae. Je zobrazené základné fylogenetické rozdelenie Araneae, so zreteľom na jednotlivé čeľade skupiny Mygalomorphae, prevzaté od Wheeler et al. 2016.

2.2 Evolúcia pohlavných chromozómov

Determinácia pohlavia je kontrolovaná rôznymi mechanizmami u rôznych druhov či skupín. Pohlavie môže byť určené na základe genetických alebo environmentálnych faktorov. Hlavným podnetom určujúcim pohlavie v prípade environmentálnej determinácie je vonkajší faktor (Rice 1996). V prípade genetickej determinácie, určenie pohlavia môže byť dané prítomnosťou pohlavných chromozómov. Pri enviromentálnej a rovnako aj genetickej

determinácii pohlavia existujú rôzne faktory a mechanizmy, ktorými je stanovené príslušné pohlavie. Najznámejším faktorom enviromentálnej determinácie pohlavia je teplota. Tento typ určenia pohlavia je pravdepodobne evolučne pôvodný a je dobre známy u niektorých skupín plazov (Gamble a Zarkower 2012).

Najznámejšími typmi chromozómového určenia pohlavia je systém so samčou heterogamiou ($\text{♀ XX}/\text{♂ XY}$), označovaný *Drosophila* a vyskytuje sa predovšetkým u cicavcov. Systém so samičou heterogamiou ($\text{♀ ZW}/\text{♂ ZZ}$), označovaný ako *Abraxas* sa vyskytuje u vtákov, hadov a motýľov. Pohlavné chromozómy prechádzajú v priebehu evolúcie špecifickou genetickou a štrukturálnou diferenciáciou. Pohlavné chromozómy, ktoré sú u homogametického pohlavia párové (X, Z) zostávajú väčšinou väčšie a génovo bohatšie, kým chromozómy Y popr. W (alozómy, špecifické pre heterogametické pohlavie) sú menšie, v priebehu evolúcie degenerujú a sú potom často heterochromatinizované a obsahujú len niekoľko génov (Matsubara *et al.* 2006). V prípade samčej heterogamie existuje niekoľko variant chromozómového určenia pohlavia. U cicavcov iniciuje determináciu samčieho pohlavia oblasť na Y chromozóme (SRY, z angl. sex determining region). U *Drosophily melanogaster* pohlavie určuje pomer chromozómov X k počtu sád autozómov (X : A). Chromozóm Y nie je priamo zodpovedný za určenie pohlavia, obsahuje gény dôležité pre samčiu fertilitu. Rovnako určenie pohlavia na základe pomeru X : A, možno pozorovať u *Caenorhabditis elegans*, kedy pomer určuje vznik samcov alebo hermafroditov. V tomto prípade však nie je prítomný Y chromozóm (Gamble a Zarkower 2012).

Vznik a evolučný vývoj pohlavných chromozómov zahŕňa niekoľko špecifických mechanizmov (Charlesworth *et al.* 2005). Pohlavné chromozómy vznikajú z autozómového páru. Hlavným krokom pri vývoji pohlavných chromozómov bol vznik mutácie na jednom alebo oboch génoch, spojených s rozmnožovaním, na autozómovom páre (Charlesworth *et al.* 2005). Autozómový pár získal gén pre určenie pohlavia (Graves 2006). Dôležitým krokom pre vznik pohlavných chromozómov bola akumulácia alel výhodných pre jedno z pohlavie na jednom chromozóme a následná supresia rekombinácie v tejto oblasti (Rice 1996, Charlesworth *et al.* 2005). Výsledkom tejto prvej etapy evolúcie boli morfológicky homomorfné pohlavné chromozómy proto-X a proto-Y. Následné mutácie v nerekombinujúcej oblasti spôsobili degradáciu nepárového pohlavného chromozómu (Graves 2006). Na morfológickej a molekulárnej diferenciacii Y sa podieľali procesy genetický hitchhiking alebo proces označovaný ako Müllerova rohatka. V procese označovanom genetický hichhiking dochádza vplyvom genetickej väzby k fixácii menej

škodlivej alely so selekčne výhodnou alelou. Významný je tento proces v prípade, že nastane na pohlavnom chromozóme, ktorý nepodlieha rekombináciám (Clark a Wall 1996, Engelstädter 2008). Supresia rekombinácie medzi pohlavnými chromozómami viedla k nahromadeniu škodlivých mutácií na alozóme v procese Müllerovej rohatky (Muller 1964; Charlesworth 1978).

V evolučnom procese vývoja pohlavných chromozómov dochádzalo i ku vzniku neo-pohlavných chromozómov. Ku ich vzniku dochádza translokáciou, často centrickou fúziou autozómov s pohlavnými chromozómami. Jedným zo základných príkladov je fúzia Y chromozómu s autozómom u *Drosophila Miranda* (Charlesworth 1996). Pomerne zložitý systém tandemových fúzií sa objavil u vtákov, kde samci majú 5 X a 5 Y chromozómov (Gruetzner *et al.* 2006).

Ako bolo uvedené, v skorých štádiách vývoja sú pohlavné chromozómy homomorfné, po akumulácii konštitutívneho heterochromatínu a strate euchromatických oblastí môže dôjsť ku degradácii alozómov (Jetybayev *et al.* 2017). Tento proces môže viesť až k zániku (Graves 2006). Týmto mechanizmom sa predpokladá vznik systému $XX^{\ominus} / X0^{\ominus}$ alebo $ZZ^{\ominus} / Z0^{\ominus}$.

Nižší počet kópií pohlavných chromozómov Y (W) u heterogametického pohlavia by mohol mať negatívne dôsledky (Ohno 1967). Rovnovážnu expresiu génov u oboch pohlaví zabezpečuje epigenetický mechanizmus kompenzácie genetickej dávky. S týmto procesom úzko súvisí modifikácia štruktúry chromatínu. U rôznych organizmov vznikli alternatívne molekulárne mechanizmy daného procesu (Conrad a Akhtar 2012). U samíc cicavcov na párových pohlavných chromozómoch dochádza k procesu inaktivácie jedného z X chromozómov, zvanému lyonizácia (Lyon 1974). U *Drosophily melanogaster* proces kompenzácie dávky, súbor niekoľkých krokov, zahŕňa dvojnásobne zvýšenú transkripciu génov samčieho X chromozómu (Conrad a Akhtar 2012). Za tento proces zodpovedá DCC komplex (z angl. ribonucleoprotein dosage compensation complex), známy aj ako MSL komplex (male-specific lethal complex), súčasťou tohto procesu je acetylácia histónu H4 na lyzíne 16 (H4K16ac) (Hallaceli a Akhtar 2009). U *Caenorhabditis elegans* samci nesú jeden pohlavný chromozóm X, pričom hermafroditi nesú dva pohlavné chromozómy X. Preto musí nastať odlišná situácia kompenzácie dávky. Predpokladá sa, že doteraz neznámy mechanizmus najskôr zvýši expresiu génov na X chromozóme u oboch pohlaví. Neskôr u hermafroditov pomocou známeho komplexu DCC dôjde k potlačeniu transkripcie na polovicu na oboch X chromozómoch, z dôvodu vyrovnania expresie génov viazaných na X chromozóme voči expresii u samcov (Conrad a Akhtar 2012; Jordan *et al.* 2019).

2.3 Evolúcia pohlavných chromozómov u pavúkov

Za pôvodný pohlavný systém u pavúkov je považovaný systém X_1X_20 (Suzuki, 1954), ktorý bol prvý krát popísaný u cvrčka *Cycloptiloides americanus*. Symbol „ X_1X_2 “, predstavuje prítomnosť dvoch nehomologných pohlavných chromozómov X a „0“ absenciu Y chromozómu, konštitúcia pre pohlavie je teda $\sigma^7X_1X_2/\text{♀}X_1X_1X_2X_2$. Okrem Orthoptera a niektorých skupín ďalších bezstavovcov ako pavúkov je tento systém určenia pohlavia pre eukaryota veľmi neobvyklý (White 1973; Forman *et al.* 2013; Palacios-Gimenez a Cabral-de-Mello 2014; Maddison a Leduc-Robert 2013; Zefa *et al.* 2014).

Systém určenia pohlavia bol objavený u väčšiny analyzovaných pavúkov (Araújo *et al.* 2005) a existuje niekoľko hypotéz, ktoré popisujú vznik pohlavného systému X_1X_20 . Jednou z nich je, že pohlavný systém X_1X_20 vznikol nondisjunkciou jedného X chromozómu a následnou diferenciáciou druhého X (Postiglioni a Brum-Zorrilla 1981). Ďalšia z pôvodných hypotéz tvrdila, že tento systém mohol vzniknúť centrickým rozštiepením veľkého X chromozómu zo systému X0. Nešlo však o jednoduché centrické rozštiepenie, ale tento proces bol tvorený niekoľkými krokmi, ktorého výsledkom bol dicentrický chromozóm, z ktorého vznikli dva akrocentrické chromozómy X s podobnou veľkosťou (Pätau 1948).

Doterajšie karyotypové analýzy odhalili, že systémy pohlavných chromozómov u pavúkov sú veľmi rozmanité. U entelegynných araneomorfov sa predpokladá prevaha pohlavného systému X_1X_20 . Vyskytujú sa však aj omnoho zložitejšie pohlavné systémy, hlavne u mygalomorfov. Systém X_1X_20 sa síce vyskytuje u mygalomorfných pavúkov, omnoho častejšie je ale u samcov tejto skupiny pozorovaný vyšší počet pohlavných chromozómov. Počet pohlavných chromozómov X sa môže pohybovať v rozmedzí od dvoch až po viac ako desať X. S vývojom mnohopočetných pohlavných chromozómov X súvisia procesy duplikácie chromozómov, štiepenie a fúzie X s autozómami (Král *et al.* 2010, Král *et al.* 2013).

Pohlavný systém X0 bol prvýkrát pozorovaný u entelegynného pavúka *Oxyopus ramosus* (Oxyopidae) a predpokladalo sa, že bol odvodený zo systému X_1X_20 fúziou (Hackman 1948). Metacentrický chromozóm X systému X0 mohol vzniknúť centrickou fúziou chromozómu X_1 a X_2 (Král *et al.* 2011). Systém X_1X_20 bol u entelegynných pavúkov považovaný za pôvodný aj v prípade prítomnosti akrocentrického chromozómu X v systéme X0, kedy sa predpokladalo, že systém X0 vznikol elimináciou jedného z X chromozómov (Suzuki 1954) príp. (Bole-Gowda 1950). Systém X0 s akrocentrickým chromozómom X bol pozorovaný u druhov entelegynných čeľadí Thomisidae, Oxyopidae, Philodromidae, Salticidae,

Zodariidae, s pohlavným systémom X_0 (The spider cytogenetic database 2019). Karyotyp tvorený akrocentrickými chromozómami je typickým znakom entelegyných pavúkov (Araújo *et al.* 2005). Predpokladá sa, že fúziami mohli vzniknúť i ďalšie systémy pavúkov, napr. systém $X_1X_2_0$ mygalomorfov zo systému so štyrmi pohlavnými chromozómami X (evolučne pôvodný systém týchto pavúkov bol zjavne $X_1X_2X_3X_4_0$, Král *et al.* 2013). S takýmto prípadom sa môžeme stretnúť napríklad u skupiny pavúkov Theraphosidae, kedy pôvodný počet štyroch pohlavných chromozómov klesol na dva (Král *et al.* 2013).

U vtáčkara *Macrothele gigas* bol doposiaľ odsledovaný najvyšší počet chromozómov X u pavúkov, konkrétne trinásť pohlavných chromozómov X. Taktiež u ďalších zástupcov rodu je značne vysoký počet chromozómov X, napr. u *Macrothele yaginumai* s deviatimi pohlavnými chromozómami X (Král *et al.* 2013). U bazálnych Araneomorphae je výskyt viacnásobných pohlavných chromozómov X menej častý. U týchto skupín sa rozvinul tiež odvodený pohlavný systém X_1X_2Y s achiasmatickým párovaním pohlavných chromozómov počas meiózy. Tento pohlavný systém je typický pre skupiny pavúkov Drymusidae, Hypochilidae, Filistatidae, Sicariidae a Pholcidae (Král *et al.* 2006). U niektorých týchto pavúkov sa pôvodne predpokladal pohlavný systém $X_1X_2_0$ v dôsledku príliš malej veľkosti Y chromozómu, ktorý takto unikol detekcii. Vzhľadom k malej veľkosti je ťažké určiť morfológiu Y, pokiaľ to bolo možné, jednalo sa o metacentrický chromozóm. U X_1 a X_2 chromozómov, morfológia bola jasná, patrili medzi veľké metacentrické chromozómy (Král *et al.* 2006). V niektorých prípadoch zo systému X_1X_2Y vznikli ďalšie pohlavné systémy, napr. X_0 alebo XY. Tento proces zahŕňal sled niekoľkých mechanizmov. Jedným z nich bola konverzia metacentrického chromozómu X pericentrickou inverziou na subtelocentrický alebo akrocentrický. V ďalšom vývoji nastala pericentrická inverzia aj na druhom X chromozóme a následná Robertsonova translokácia medzi oboma X chromozómami v závere viedla k vytvoreniu pohlavného systému XY (Král *et al.* 2006).

Pohlavné systémy $X_1X_2X_3_0$ a $X_1X_2X_3X_4_0$ sa okrem mygalomorfných pavúkov vyskytujú aj u entelegynných pavúkov (Kořínková a Král 2013). Pohlavný systém $X_1X_2X_3_0$ bol prvýkrát objavený u entelegyna zástupcu *Tegenaria domestica* (Sokolska 1925). U *Lycosa sp.* sa predpokladá vznik pohlavného systému $X_1X_2X_3_0$ zo systému $X_1X_2_0$. Hypotéza hovorí o nondisjunkcii jedného X chromozómu a následnej strate homológie (Postiglioni a Brum-Zorrilla 1981).

U vtáčkarov bol pohlavný systém $X_1X_2X_3X_4_0$ pozorovaný u rady zástupcov nadčel'adi *Avicularioidea*. Na základe pozorovaní sa zistilo, že vždy dva páry zo štyroch párov pohlavných chromozómov vykazovali podobnú štruktúru. To naznačuje, že systém vznikol

duplikáciou z pohlavného systému X_1X_20 (Král *et al.* 2011). U mygalomorfných pavúkov bol pohlavný systém $X_1X_2X_3X_40$ popísaný napr. u druhov *Diplura cf. petrunkevitchi* (Dipluridae) a *Poecilotheria formosa* (Theraphosidae) (Král *et al.* 2011). U entelegynných pavúkov bol tento systém pozorovaný len u dvoch druhov čeľade Sparassidae a Tetragnathidae (Swan 2012).

Zložité pohlavné systémy, ktoré obsahujú viac ako štyri pohlavné chromozómy X, pravdepodobne vznikli nondisjunkciou alebo štiepením X chromozómov, prípadne kombináciou oboch mechanizmov. Z hľadiska morfológie sú pohlavné chromozómy vzniknuté štiepením dvouramenných chromozomů, ktoré u vtáčkarov prevažujú, väčšinou malé, akrocentrické chromozómy. Táto morfológia pohlavných chromozómov bola pozorovaná u mygalomorfa *Linothele*, kde dva najväčšie pohlavné chromozómy X boli dvojramenné a mohli predstavovať pôvodné pohlavné chromozómy, ktoré nepodľahli štiepeniu (Král 2007, Král *et al.* 2013).

U niektorých skupín pavúkov sa stretávame s neopohlavným systémom chromozómov. Jedná sa napr. o pohlavný systém $X_1X_2X_3Y$ niektorých skákaviek, ktorý vznikol z pôvodného systému X_1X_20 , pri tomto procese nastala tandemová fúzia medzi X chromozómom a jedným chromozómom z autozómového páru, za vzniku neo-X chromozómu, pričom druhý chromozóm z autozómového páru sa diferencoval na neo-Y (Král 2007). Tento jav bol pozorovaný u rodov *Habronattus* a *Evarcha* (Salticidae) (Maddison 1982, Maddison a Leduc-Robert 2013). Pomerne zložitý systém tandemových fúzií sa objavil u druhu *Delena cancerides* (Sparassidae) s pohlavným systémom $X_1X_2X_3X_4X_5Y_1Y_2Y_3Y_4$ (Sharp a Rowell 2007). Neopohlavné systémy XY boli identifikované napr. u zástupcov vtáčkarov rodu Barychelidae a Dipluridae (Král *et al.* 2013). U zástupcu *Paratropis sp.*, rodu Paratropididae sa objavil pohlavný systém s vyšším počtom pohlavných chromozómov, $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7Y$. Tento systém pravdepodobne vznikol z pohlavného systému $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_70$ fúziou medzi X chromozómom a autozómom (Král *et al.* 2013).

2.4 Evolúcia nediferencovaných pohlavných chromozómov u pavúkov

Pri štúdiách meiózy pavúkov bola odhalená zložitosť ich systému pohlavných chromozómov. Okrem mnohopočetných X chromozómov sú prítomné nediferencované pohlavné chromozómy X a Y, tvoriaci tzv. SCP (sex chromosome pair), ktoré sú považované za evolučne pôvodné pohlavné chromozómy pavúkov (Král *et al.* 2013). SCP boli pozorované u entelegynných pavúkov (Král 2007), haplogynných a tiež mygalomorfných pavúkov (Král *et al.* 2006, 2011). Boli pozorované rozdiely v správaní SCP u jednotlivých línií pavúkov.

Jeden z rozdielov je v heterochromatinizácii, ktorá bola pozorovaná len u niektorých mygalomorfných a haplogynných pavúkov (Král *et al.* 2013). Ďalším z pozorovaných rozdielov je, že u mygalomorfných pavúkov sú detekovateľné na základe špecifického správania už v spermatogoniálnej profáze, kým u haplogynných pavúkov až v premeiotickej interfáze (Král *et al.* 2006; Král *et al.* 2011). U Entelegynae SCP nie je možné detegovať pod svetelným mikroskopom, čo môže byť spôsobené ich značne nediferencovaným stavom, v tomto prípade sú detekovateľné na základe špecifického správania iba elektronovým mikroskopom (Král 2007; Král *et al.* 2013).

Najlepšie sú SCP preštudované u vtáčkarov, u ktorých je často možné detekovať ich cytologicky. Vo väčšine prípadov sú tvorené veľkými dvojramennými chromozómami (Král *et al.* 2006). U niektorých zástupcov čeľade Hexathelidae, Nemesiidae a Theraphosidae sa vyskytujú dva páry SCP. U oboch pároch je zachovaná štandardná segregácia v anafáze I, z čoho vyplýva, že každý pár je tvorený chromozómom X a Y. Predpokladá sa, že druhý pár mohol vzniknúť duplikáciou prvého. Keďže oba páry sú vždy dvojramenné a značne veľké, vznik rozštiepením prvého páru je veľmi nepravdepodobný (Král *et al.* 2013). V samčej meióze je správanie SCP u mygalomorfných pavúkov podobné ako správanie pohlavných chromozómov X. Rovnako bola zaznamenaná pozitívna heteropyknóza v jednotlivých fázach cyklu a ich migrácia do stredu jadra spolu s X chromozómami. Medzi ďalšie podobné znaky patrí asociácia s univalentmi X počas premeiotickej interfázy a profázy I, pričom táto asociácia nemusí byť na preparátoch zachovaná, pravdepodobne v dôsledku slabej väzby medzi chromozómami X a SCP. Spôsob párovania SCP s chromozómami viedol k hypotéze, že pohlavné chromozómy X mohli vzniknúť nondisjunkciou pôvodných SCP chromozómov (Král 2007). U vtáčkarov rodu *Diplura* bol pozorovaný SCP, ktorý vykazoval neobvyklé správanie počas samčej meiózy. Na začiatku, ramená pozoruhodne veľkého dvojramenného páru zostávali spojené. Tento jav by mohol odrážať vznik SCP fúziou dvoch SCP (Král *et al.* 2011).

2.5 Evolúcia meiózy pavúkov

Zaujímavým aspektom chromozomálnej biológie pavúkov, je prítomnosť rôznych modifikácií meiotického delenia. Ako u väčšiny živočíchov je lepšie študovaná samčia meióza a informácie o oogenéze sú veľmi vzácne. U bazálnych araneomorfných pavúkov sa modifikácie týkajú hlavne neskorej profázy prvého meiotického delenia, kedy po pachyténnej fáze nastáva rozsiahla dešpiralizácia autozómových párov. Narozdiel od pohlavných chromozómov, ktoré sa vyznačujú tzv. pozitívnou heteropyknózou a sú lokalizované na

periférii jadra (Král *et al.* 2006). Táto fáza je označovaná ako difúzne štádium vyskytuje sa nielen u samičieho pohlavia ale aj u samčieho rôznych organizmov (Benavente a Wettstein 1980). Po uplynutí skorého difúzneho štádia, pri ktorom dochádza k dešpiralizácii chromozómov, prechádzajú chromozómy do tzv. neskorého difúzneho štádia, pri ktorom nastáva ich postupná rekondenzácia (Král *et al.* 2006). Pozitívna heteropyknóza pohlavných chromozómov je jav, ktorý je pozorovateľný pod svetelným mikroskopom, je spôsobený fakultatívnou heterochromatinizáciou chromozómov, ktoré sú viac kondenzované a lepšie farbiteľné (Král *et al.* 2011). Heterochromatinizácia odráža inaktíváciu chromatínu (Summer 2003), predpokladá sa jej úloha v supresii nehomológnych rekombinácií medzi pohlavnými chromozómami (Král *et al.* 2011).

Jednou z ďalších modifikácií meiotického delenia je tzv. invertovaná meióza. Názov vyplýva z charakteru príslušného delenia. Na rozdiel od štandardnej meiózy, v danom prípade dochádza k rozchodu sesterských chromatíd už v prvom meiotickom delení. Je typická pre holokinetické chromozómy a bola pozorovaná u niektorých pavoukov s holokinetickou stavbou chromozómov, napríklad u *Dysdera crocata* (Dysderidae) (Benavente a Wettstein 1980; Král *et al.* 2006).

Samčia meióza u niektorých mygalomorfných pavúkov je achiazmatická a zahŕňa difúzne štádium. Počas štádia nenastáva crossing over, čo sa prejaví neprítomnosťou chiazmat (White 1973). Difúzne štádium bolo pozorované u troch taxónov mygalomorfných pavúkov, konkrétne *Antrodiaetus*, *Macrothele* a *Ischnothelinae* (Král *et al.* 2013). Ďalšou modifikáciou meiotického delenia, ktorá sa môže vyskytovať u mygalomorfných pavúkov je tzv. kryptochiazmatická meióza. Tento jav je typický pre samcov a rovnako sa vyznačuje potlačením chiazmat (Král *et al.* 2011). Z evolučného hľadiska je chápaná ako prechod medzi chiazmatickou a achiazmatickou meiózou (White 1973).

Pohlavné chromozómy vykazujú počas meiózy špecifické správanie. V prípade systému X_1X_20 pohlavné chromozómy heterogametického pohlavia počas profázy I navzájom párujú. Na rozdiel od autozomálnych bivalentov nie je ich párovanie chiazmatické. Najčastejšie spôsoby párovania pohlavných chromozómov sú paralelné párovanie prostredníctvom štruktúry tzv. junction lamina, ktoré je typické pre entelegynné pavúky (Král *et al.* 2011). Párovanie v telomerických oblastiach, tzv. end-to-end párovanie u mygalomorfných pavúkov v priebehu evolúcie postupne prechádzalo v párovanie v centromerických oblastiach akrocentrických chromozómov u Entelegynae (Král *et al.* 2013).

2.6 Repetitívne usporiadané gény

Eukaryotické genómy obsahujú veľmi komplexné frakcie repetitívne usporiadaných génov. Príslušné gény často vytvárajú tandemovo usporiadané opakovania alebo môžu vznikajú multigénové rodiny rozptýlené po genóme. Veľkosť a zloženie sekvencií príslušných opakovaní sa môže líšiť medzi jednotlivými druhmi ale aj vyššími taxónmi. Keďže sa predpokladá, že tieto gény majú dôležitú funkciu v genóme, medzi súčasné prístupy molekulárnej cytogenetiky patrí ich mapovanie (Macas *et al.* 2015). Medzi najsledovanejšie repetitívne usporiadané gény patria tie, ktoré sú druhovo vysoko konzervované, predovšetkým gény nukleolárnych organizátorov jadierka. Menej často sa vizualizujú histónové gény a gény pre malé jadrové RNA. Existuje množstvo iných repetitívne usporiadaných génov, napríklad gény pre tRNA, ktoré sa však v metódach komparatívnej cytogenetiky nepoužívajú (Sochorová *et al.* 2017).

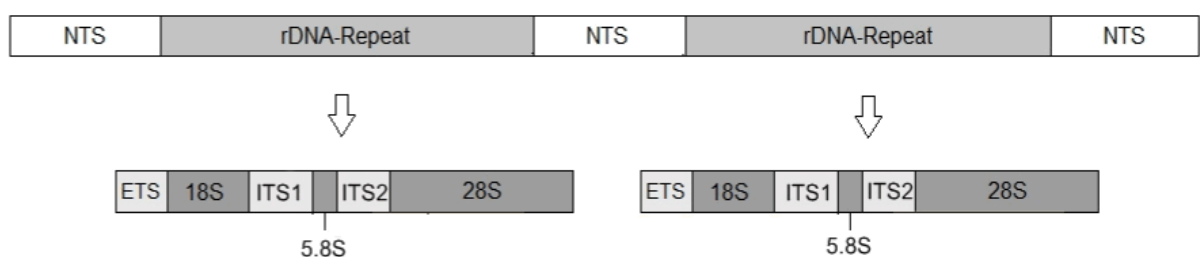
2.6.1 Jadierko a nukleolárne organizátory jadierka

Jadierko (*nucleolus*) patrí medzi najväčšie a najviditeľnejšie jadrové kompartmenty. Vyskytuje sa prakticky u všetkých eukaryotických buniek (Pederson 2011). Jadierko je pozorovateľné počas interfázy (Warner 1979). Oblasti obklopujúce vonkajšie časti jadierka vytvárajú perinukleolárny chromátin, ktorý je tvorený predovšetkým heterochromátinom. Hlavnou funkciou jadierka v eukaryotických bunkách je biogenéza ribozómov. Okrem spracovania a maturácie rRNA, je funkciou jadierka spracovanie bunkových ribonukleoproteínov (RNP) (Boisvert *et al.* 2007). Jadierko úzko súvisí s rRNA, podieľa sa však aj na spracovaní a dozrievaní ďalších rodín RNA, napr. RNA malých jadrových RNP, RNA telomerázy a tiež malé RNA prepisované RNA polymerázou III, ako sú 5S rRNA, niektoré tRNA, miRNA alebo RNA účinkujúce v SRP (signál rozpoznávajúce častice) (Gerbi *et al.* 2003). Okrem týchto funkcií, jadierko zohráva dôležitú rolu aj pri kontrole bunecného cyklu a pri snímaní enviromentálneho stresu (Németh a Grummt 2018).

Pomocou elektrónovej mikroskopie boli u vyšších eukaryotov odhalené tri hlavné komponenty jadierka: fibrilárne centrum, hustá fibrilárna zložka a granulárna zložka (Raska *et al.* 2006). Hlavnými markrami hustej fibrilárnej zložky sú proteíny nukleolin a fibrillarin (Summer 2003). Fibrilárne centrá obsahujú netranskribované rDNA sekvencie a faktory asociujúce s rDNA ako UBF (Upstream binding factor). Transkribcia rDNA génov RNA polymerázov I počas interfázy prebieha na rozhraní fibrilárnej a hustej fibrilárnej zložky (Summer 2003). Proces, ktorého výsledkom je prekurzorová ribozomálna RNA (pre-RNA), prebieha v granulárnej zložke (Pederson 2010). Zostavovanie ribozómových podjednotiek

a následné spracovanie rRNA prebieha v granulárnej zložke. Markrom granulárnej zložky je nukleofosmin, multifunkčný proteín podieľajúci sa na biosyntéze ribozómov (Yoshikawa 2015).

Jadierko sa formuje v oblasti génov pre rRNA - nukleolárnych organizátoroch jadierka (NOR). Tieto oblasti sú miestom transkripcie rDNA (Raska *et al.* 2006; Hernandez-Verdun *et al.* 2011; Pederson 2011). Eukaryota majú stovky až tisíce identických kópií ribozomálnych RNA (rRNA) génov, ktoré sú transkribované v jadierku RNA polymerázou I. Tieto gény sú zoskupené na chromozómoch do dlhých tandemových repetíc. Veľkosť primárneho transkriptu rRNA génov je od 35S do 48S, pričom obsahuje gény pre 18S, 5,8S a 28S rRNA (Turowski a Tollervey 2015). Gény pre 5S rRNA, ktoré sú transkribované RNA polymerázou III sa vyskytujú na odlišných lokusoch (Fedoriw *et al.* 2012). Okrem rDNA génov sa na oboch koncoch primárneho transkriptu rRNA z nukleolárnych organizátorov nachádzajú spacery: 5'-ETS a 3'-ETS (external transcribed spacers) a ITS1 a ITS2 (internal transcribed spacer). Transkripčné jednotky nukleolárnych rRNA génov sú oddelené tzv. NTS (non-transcribed spacer, neprepisované medzerníky) (Henras *et al.* 2014). Jednotlivé rDNA repetície majú odlišnú transkripčnú aktivitu. Transkripčne neaktívne NOR naznačujú, že práve transkripcia RNA polymerázou I je dôležitým faktorom pre formovanie jadierka (Németh a Grummt 2018). Molekuly rRNA jsou modifikované malými jadrovými ribonukleoproteínmi (snoRNP) a ďalšími faktormi. Výsledné modifikovaná rRNA sú transportované do cytoplazmy, kde spolu s množstvom ribozomálnych proteínov tvoria malú a veľkú podjednotku ribozómu (Henras *et al.* 2014).



Obr. 2 Schématické znázornenie rDNA transkripčnej jednotky a jej tandemové usporiadanie u vyšších eukaryotov. NTS – neprepisované medzerníky (z angl. non-transcribed spacer), ETS – vonkajšie prepisované medzerníky (z angl. external transcribed spacer), ITS1 a ITS2 – vnútorné prepisované medzerníky (z angl. internal transcribed spacer), gény pre 18S, 5,8S a 28S rRNA. Prevezaté a upravené z Chandrasekera *et al.* 2017.

NOR sú uložené v achromatických úsekoch chromozómov nazývaných sekundárne

konstrikcie (McStay 2016). Doterajší výskum ukázal, že NOR sú lokalizované v blízkosti heterochromatinových oblastí (Nemeth a Langst 2011). U ľudí sú NOR lokalizované na krátkych ramienkach akrocentrických chromozómov (konkrétne na chromozómových pároch 13, 14, 15, 21 a 22) (McStay 2016). U myši bola zistená vysoká diverzita umiestnenia NOR, ich lokalizácia bola zistená na všetkých autozómoch v blízkosti centromerických oblastí, okrem dvoch NOR, ktoré boli v telomerických oblastiach (Britton-Davidian *et al.* 2012). U *Drosophila* sú lokalizované na pohlavných chromozómoch v oblastiach obsahujúcich heterochromatín a predpokladá sa ich úloha pri meiotickom párovaní XY (McStay 2016). Vo veľkosti DNA NOR je vysoký stupeň medzidruhovej variability, ktorá sa pohybuje v rozsahu od 50 kb do > 6 Mb (Stults *et al.* 2009).

Jadierko je veľmi dynamická štruktúra, ktorá sa rozpadá, v prípade, že bunka vstupuje do mitózy a opätovne sa formuje po bunecnom delení. Na tomto procese sa podieľajú komplexné a vysoko regulované molekulárne mechanizmy (Németh a Grummt 2018). Jadierko obsahuje približne 4000 proteínov (Boisvert *et al.* 2007).

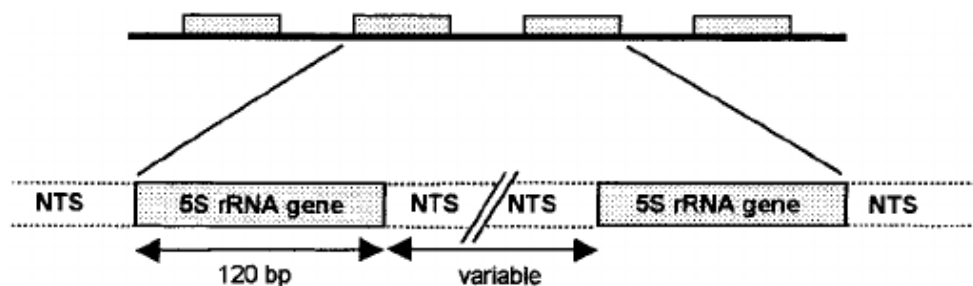
Jednou z metód, ktorá sa využívala na detekciu NOR bola metóda s využitím dusičnanu strieborného (AgNO_3). Dnes používanou metódou detekcie, ktorá je viac špecifickejšia, je metóda fluorescenčnej *in situ* hybridizácie (Summer 2003).

U mygalomorfných pavúkov sa najčastejšie vyskytuje jeden alebo dva páry NOR v terminálnej oblasti na autozómoch. Metódou striebrenia bol detegovaný terminálny NOR u zástupcu *Pterinochilus murinus*. U zástupcu *Idiothele mira* bol NOR detegovaný v pericentrickej oblasti. Metódou FISH bol detegovaný terminálny NOR na metacentrickom chromozómovom páre u *Brachypelma albopilosum*. U araneomorfných pavúkov je počet a výskyt na autozómoch rovnaký ako u mygalomorfných pavúkov (Král *et al.* 2013). U živočíchov sa NORy môžu vyskytovať aj na pohlavných chromozómoch (Artoni a Bertollo 2002). V prípade mygalomorfov bol výskyt týchto NOR preukázaný u dvoch rodov, *Ischnothele* a *Linothele* (Král *et al.* 2013). U niektorých araneomorfných pavúkov bol taktiež detegovaný NOR na pohlavných chromozómoch (Král *et al.* 2006; Král *et al.* 2011). U entelegynných pavúkov je prítomnosť na pohlavných chromozómoch menej častá ako u haplogynných, NORy boli detekované len u zástupcov skupiny Nephilidae (Paula-Neto *et al.* 2008). Zaujímavý výsledok pochádza z analýzy druhu *Wadicosa fidelis* (Lycosidae), kedy počet NOR lokusov vykytujúcich sa v distálnej oblasti autozómov sa môže pohybovať od 9 do 10 (Forman *et al.* 2013). Analýza NOR pomocou FISH bola prevedená aj u ďalších skupín pavúkovcov. U pavúkovcov radu Opiliones, konkrétne u šiestich druhov podradu Cyphophthalmi, bol zistený terminálny NOR lokus na jednom chromozómovom páre

(Svojanovská *et al.* 2016). Iným príkladom je vizualizácia NOR u škorpiónov čeľade Buthidae. V tomto prípade boli analyzované štyri geograficky vzdialené druhy s holokinetickými chromozómami. U všetkých sledovaných druhov bol preukázaný jeden intersticiálny NOR lokus na najväčšom chromozómovom páre (Sadílek *et al.* 2015).

2.6.2 Gény pre 5S rRNA

U eukaryotov sú rRNA ribozómov kódované nie len transkripčnými jednotkami uloženými v NOR, ale aj génmi pre 5S rRNA. Gény pre 5S rRNA sú rovnako repetitívne usporiadané, klastry týchto génov sa môžu nachádzať na rôznych miestach genómu (Rooney a Ward 2005). Gény 5S rRNA kódujú rRNA, ktorá sa podieľa na vytvorení malej podjednotky ribozómu (Simon *et al.* 2018). Klastry 5S rDNA sú tvorené vysoko konzervovanými viacnásobnými kópiami 5S rRNA génov, ktoré sú oddelené variabilným netranskribovaným medzerníkom (NTS, z angl. non-transcribed spacer) (Eickbush a Eickbush 2007). Gény môžu mať rôznu polohu a organizáciu na úrovni chromozómov. Rovnako sa môže líšiť počet a poloha klastrov, a to i v rámci rovnakého druhu (Martins a Wasko 2004). Príslušné oblasti rDNA môžu byť uložené v blízkosti iných viacgénových rodín, ako sú gény pre históny alebo gény pre malé jadrové RNA (snRNA gény) (Vierna *et al.* 2012). Táto situácia bola pozorovaná napr. u pavúka druhu *Oxyopes sertatus*, kde gén 5S rRNA bol vo väzbe so sekvenciou podobnou génu pre histón H2B (Suzuki a Kubota 2011).



Obr. 3 Schématické znázornenie transkripčnej jednotky pre 5S rRNA. NTS - neprepisované medzerníky (z angl. non-transcribed spacer), prevzaté od Martins a Galetti 2001.

2.6.3 Histónové gény

Históny sú najhojnejšie proteíny chromatínu. Sú to pomerne malé proteíny, ktorých základnou funkciou u eukaryotov je väzba na DNA v chromatíne. Podieľajú sa na stavbe nukleozómu, ktorý pozostáva z DNA, ktorá sa obtáča okolo histónového oktaméru. Histónový oktamér je tvorený štyrmi typmi jadrových histónov (H2A, H2B, H3 a H4) a histónom H1, ktorý spája dva nukleozómy (Simpson 1978).

Organizácia histónových génov bola prvýkrát popísaná u *Drosophily melanogaster* (Lifton et al. 1978), avšak poradie, orientácia i zastúpenie jednotlivých génov v klastroch môže byť druhovo špecifická (Maxson et al. 1983). U väčšiny organizmov sú histónové gény usporiadané v tandemových repetíciách, avšak môžu byť usporiadané aj do zhlukov. O organizácií histónových génov u pavúkov informácie dodnes chýbajú. Vo väčšine prípadov sú histónové gény rozptýlené na niekoľkých chromozómoch. Histónové gény sú klasifikované do troch základných podskupín: históny závislé na replikácii, nezávislé od replikácie a tkanivovo špecifické históny (Lyons et al. 2016). Klasifikácia vznikla na základe genómovej organizácie a expresie. Do príslušnej klasifikácie však nespadá histón H4. Históny nezávislé od replikácie sú usporiadané do génových klastrov, vyskytujú sa na špecifických miestach v genóme a môžu obsahovať intróny. Na rozdiel od tejto skupiny históny závislé na replikácii sú usporiadané do zhlukov a ich štruktúra neobsahuje intróny (Maxson et al. 1983). Histónové gény, vďaka svojmu usporiadaniu do klastrov, sú vhodným materiálom pre mapovanie chromozómov pomocou *in situ* hybridizácie (Old et al. 1997). Pri analýze bolo zistené, že tieto gény sú uložené na chromozóme značne konzervatívne (Ranz et al. 2003). U článkonožcov boli gény pro históny lokalizované u niektorých zástupcov hmyzu. Gény pre histón H3 boli vizualizované pomocou FISH u motýľov rodu *Leptidae*. U druhu *L. reali* bol pozorovaný jeden intersticiálny klaster na bivalente počas pachyténnej fázy, ktorý bol lokalizovaný v blízkosti malého bloku heterochromatínu (Šíchová et al. 2015). Klastry pre gény histónov H3 a H4 boli vizualizované ďalej na jednom konci X chromozómu u druhu *Diuraphis noxia* (Hemiptera: Aphididae). V tomto prípade bola preukázaná kolokalizácia histónových markerov s markerom pre 18S rRNA v príslušnej oblasti na X chromozóme (Novotná et al. 2011).

2.6.4 Gény pre malé jadrové RNA

Do skupiny multigénových rodín patria aj gény pre malé jadrové RNA (snRNAs) (Nei a Rooney 2005). Malé jadrové RNA sú nekódujúce riadiace RNA, ktoré sú prítomné vo všetkých mnohobunkových organizmov. Ich veľkosť sa pohybuje v rozmedzí od 90 – 300 nukleotidov. Štúdie poukazujú na ich významnú rolu v regulácii zostrihu RNA a remodelácii chromatínu. Na základe funkcie sa snRNA rozdeľujú do niekoľkých tried (Warner et al. 2015). Pri zostrihu pre-mRNA sú dôležité proteíny obsiahnuté v intrónoch, kódované génmi pre U1, U2, U4, U5, U11 a U12 snRNA. Malé jadrové RNA, ktoré sa podieľajú na zostrihu, sa spájajú s proteínmi za vzniku jadrových ribonukleoproteinových častíc (snRNP) (Tarn a Steitz 1997). Gény pre hlavné snRNA (U1, U2, U4 a U5) sú značne konzervované a často

prítomné vo viacerých kópiach (Jawdekar 2008). Počet kópií U snRNA génov sa druhovo líši a tandemovo usporiadané repetície, tvorené niekoľkými kópiami môžu byť rozptýlené po genóme alebo spojené s inými multigénovými rodinami (Marz *et al.* 2008).

Cytogenetické mapovanie génov U snRNA nie je veľmi rozšírené u pavúkov. U ďalších článkonožcov boli tieto gény mapované napr. u kobyľky *Abraxis flavolineata* (Bueno *et al.* 2013). U cvrčka *Cycloptiloides americanus* leží klaster na najväčšom autozómovom páre (Palacios-Gimenez and Cabral-de-Mello 2015). Gény pre U snRNA boli mapované také u obratolců, veľmi často mapované rýb napríklad u druhu *Oreochromis niloticus* (Cabral de Mello 2012) alebo u rýb rodu *Astyanax* (Silva *et al.* 2015).

3 Materiál a metódy

3.1 Materiál

Moja diplomová práca bola zameraná na analýzu karyotypov pavúkov s rôznymi systémami pohlavných chromozómov. Jednalo sa o Mygalomorphae (7 druhov z čeľadi Theraphosidae, 1 druh z čeľadi Barychelidae) a zástupcu entelegynných (1 druh z čeľade Agelenidae) a haplogynných araneomorfov (1 druh z čeľade Filistatidae) (tab.1). Prevažná väčšina druhov bola získaná od chovateľov, z dlhodobých kultúr, pričom presný pôvod nebolo možné určiť. Chov príslušných jedincov bol zabezpečený v laboratóriu, v plastových krabiciach s terárijným substrátom. Prevažne sa jednalo o veľké jedince, ako krmivo boli použité cvrčky s vhodnou veľkosťou. Samci v subadultnom a adultnom vývojovom štádiu boli následne použité na prípravu chromozómových preparátov. Rozlíšenie adultných samcov bolo prevedené podľa morfológie pedipalp, u vtáčkarov tiež podľa prítomnosti tibiálnych hákov na prvom páre končatín. Subadultní samci vtáčkarov boli odlišení na základe neprítomnosti spermatéky v exuvii, ktorá je prítomná iba u samíc. Na prípravu preparátov sa využívali prevažne gonády, prípadne črevo alebo srdce, ktoré majú vysokú frekvenciu deliacich sa buniek. Cieľom bolo získať spermatogoniálne mitózy a jednotlivé fázy meiotického delenia. Chromozómové preparáty boli využité pri aplikácii vybraných metód klasickej a molekulárnej cytogenetiky.

Druh	Areál rozšírenia resp. lokalita	Použité metódy
Mygalomorphae		
<i>Atrophothele socotrana</i> (Barychelidae)	Firmihin plateau, Sokotra (Jemen)	Giemsa, CGH
<i>Cyriocosmus perezmilei</i> (Theraphosidae)	Rurrenabaque, Bolívia	Giemsa, 18S
<i>Neoholothele incei</i> (Theraphosidae)	NZ (Trinidad a Tobago, Venezuela)	Giemsa, C pruhovanie, 18S
<i>Nhandu chromatus</i> (Theraphosidae)	NZ (Brazília)	Giemsa
<i>Lasiadora striatipes</i> (Theraphosidae)	NZ (Brazília)	Giemsa, 18S
<i>Poecilotheria formosa</i> (Theraphosidae)	NZ (India)	Giemsa, 18S, H3, 5S, CGH,
<i>Poecilotheria vittata</i> (Theraphosidae)	NZ (India, Srí Lanka)	Giemsa, 18S, H3, 5S, CGH
<i>Psalmopoeus irminia</i> (Theraphosidae)	NZ (Venezuela, Guayana, Brazília)	Giemsa, 18S, CGH
Entelegynae		
<i>Tegenaria ferruginea</i> (Agelenidae)	Praha, Česká republika	CGH
Haplogynae		
<i>Kukulcania aff. hibernalis</i> (Filistatidae)	NZ (USA, Mexiko, Stredná Amerika, Karibik, Južná Amerika)	Giemsa, 18S, CGH

Tab. 1 Zoznam študovaných druhov, ich areál rozšírenia a použité metódy. NZ – narodený v zajatí, presná lokalita pôvodu jedincov neznáma, v zátvorke uvedený areál rozšírenia podľa World Spider Catalog (2019). Giemsa – vyhodnotenie základných karyotypových charakteristík. FISH markery: 18S a 5S – gény pre 18S a 5S rRNA, H3 – gény pre histón H3. CGH – komparatívna genómová hybridizácia.

Zoznam použitých chemikálií

- Modifikovaný Sørensenov pufor: 0.033M KH_2PO_4 ; 0.013M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$; pH= 6.8
- 2x SSC: 0.3M NaCl; 0.03M $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; pH=7.0
- 50x Denhartov reagens: 1% (w/v) Ficoll (typ 400); 1% (w/v) polyvinylpyrolidin; 1% (w/v) BSA
- 1x PBS: 0.015M NaCl; 0.015 M KCl; 0.015M KH_2PO_4 ; 0.015M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$; pH= 7.3
- Antifade DABCO: 0,21M 1,4- diazabicyclo[2.2.2]oktan; 1M Tris- HCl (pH= 8.0); 0.9% (v/v) glycerol
- Fyziologický roztok: 0.15M NaCl; 5.6mM KCl, 2.4mM NaHCO_3 ; 3mM CaCl_2 ; pH=7.0
- Fluormix: 0.25mM dATP; 0.25mM dCTP; 0.25mM dGTP; 0.17mM dTTP; 0.2mM značených dUTP (Biotin-16-dUTP (Roche), Fluorescein-12-dUTP (Roche), Cy3-dUTP (GE Healthcare))

Použité komerčné kity

- DNeasy Blood & Tissue (Qiagen)
- Wizard® SV Gel and PCR Clean – Up System (Promega)
- Bionick Labeling System (Invitrogen, Life technologies)
- CGH Nick Translation Kit (Abbott)
- Illustra GenomiPhi HY amplification Kit

3.2 Príprava chromozómových preparátov

Na prípravu chromozómových preparátov bola použitá tzv. plate spreading metóda (Traut, 1976). Vybrané druhy pavúkov boli najskôr usmrtené v mrazničke, pričom dĺžka zmrazenia závisela od veľkosti pavúka (v našom prípade priemerne 15 minút). Následne bola odstrihnutá hlavohruď s končatinami, ktorá bola uskladnená v 96% etanole v chladničke pre ďalšie využitie. Abdomen bol umiestnený do fyziologického roztoku pre motýle rodu *Ephestia* (Lockwood, 1961) na pitevnú misku. Následne boli pod binokulárnou lupou (Nikon) vypitvané samčie gonády, prípadne črevo či srdce. Tkanivá boli umiestené do 0,075 M roztoku KCl (Sigma-Aldrich) pre hypotonizáciu, na dobu 20 - 30 minút. Po hypotonizácii prebehla fixácia v čerstvo pripravenej zmesi jednosýtného alkoholu metanolu (Merck) alebo

etanolu (Merck) spolu s ľadovou kyselinou octovou (Merck), v pomere 3:1. Tkanivá boli fixované postupne v troch fixáciách, a to 6, 10 a 20 minút.

Po fixácii bola na čisté podložné sklíčko prenesená primeraná časť gonády a pasterkou bolo prikvapnutých niekoľko kvapiek 60% kyseliny octovej. Následne bola vytvorená pod binokulárnou lupou suspenzia buniek, za pomoci wolfrámových ihliel. Podložné sklíčko so suspenziou bolo prenesené na histologickú platničku 40°C. Suspenzia buniek bola pomocou wolfrámovej ihly rovnomerne rozťieraná po sklíčku až do odparenia. Zvyšok kvapky, obsahujúci nečistoty bol sklepnutý na filtračný papier. Rovnakým spôsobom sa postupne spracoval všetok nafixovaný materiál. Kontrola kvality preparátu (správnosť rozprestretia figúr, hustota buniek) bola overená pod mikroskopom s fázovým kontrastom.

Farbenie preparátov prebiehalo v 5% roztokom Giemsey v modifikovanom Sørensenovom pufré (pH = 6,8), najskôr v nasledujúci deň. Po uplynutí stanovenej doby farbenia 25 minút a oschnutí boli preparáty uskladnené v chladničke. Sklá pre metódu FISH a CGH boli najskôr odvodnené vo vzostupnej etanolevej rade (70%, 80%, 96%) a uložené v hlboko mraziacom boxe pri -75°C.

Pripravené preparáty obarvené Giemsou boli pozorované pod mikroskopom Olympus BX 50 s využitím imerzného objektívu 100x. Vybrané figúry boli fotografované pod CCD kamerou DP71 s použitím programu Cell[^]D (Olympus). Určenie dĺžky jednotlivých chromozómov a ich ramien prebiehalo v programe ImageJ. Následne bol pre jednotlivé chromozómy stanovený centromerický index, a to ako pomer dlhého a krátkeho ramienka daného chromozómu. Klasifikácia chromozómov prebehla podľa Levana et al. (1964) do nasledujúcich upravených kategórií: metacentrik (m), submetacentrik (sm), subtelocentrik (st), akrocentrik (a). Pre sestavenie karyogramu bola stanovená tiež relatívna chromozómová dĺžka, ktorá sa určuje ako percentuálny podiel chromozómu alebo chromozomového páru na celkovej dĺžke všetkých chromozómov. U jednotlivých druhov bolo premeraných 5-10 figúr. Z vybraných dostatočne kvalitných figúr (preferenčne z figúr tvorených sesterskými metafázami II) boli vytvorené karyogramy v programe Corel PHOTO-PAINT verzia X5.

3.3 C - pruhovanie

Pomocou C - pruhovania bol vizualizovaný konštitutívny heterochromatín. Podľa skúseností nášho laboratória sú najlepšie výsledky dosiahnuté u 3 až 5 dní starých preparátov pripravovaných pri teplote histologickej platničky 35°C methanolactovou fixáciou. Takto pripravené, neofarbené preparáty sa nechali starnúť v sušiarňi pri teplote 60°C 1 hodinu. Po uplynutí tejto doby a po ochladnutí na izbovú teplotu boli ponorené do 0,2N roztoku HCl na

45 minút. Potom boli opláchnuté destilovanou vodou a schli minimálne 2 hodiny pri izbovej teplote. V ďalšom kroku prebiehala inkubácia preparátov v nasýtenom roztoku Ba(OH)₂ po dobu 3 – 5 minút (50°C). Ponáranie a vynáranie skiel bolo potrebné robiť rýchlo, aby sa vznikajúca zrazenina uhličitanu bárnateho neprichytila na ich povrch. Preparáty boli následne prepláchnuté destilovanou vodou, v nádobe s teplotou 30 - 32°C a následne v inej nádobe pri izbovej teplote. Vyššia teplota umožnila lepšie zmytie povlaku uhličitanu z povrchu skiel. Preparáty sa nechali uschnúť pri izbovej teplote cca 3 hodiny. Renaturácia predstavovala ďalší krok. Preparáty boli ponorené do roztoku 2xSSC pri 60°C na 75 minút. V poslednom kroku boli preparáty opäť opláchnuté v destilovanej vode, pri izbovej teplote a potom cez noc schli. V nasledujúci deň mohli byť preparáty ofarbené Giemsou, rovnakým spôsobom ako pri príprave bežných preparátov. Jediným rozdielom bola doba farbenia, ktorá bola pri C – pruhovaní predĺžená na 75 minút.

3.4 Fluorescenčná *in situ* hybridizácia (FISH)

Princípom tejto molekulárno-cytogenetickej metódy je hybridizácia značenej DNA (sondy) s cieľovou komplementárnou DNA. V prípade správnej hybridizácie značenej sondy k cieľovej sekvencii na DNA, pozorujeme pod fluorescenčným mikroskopom farebný signál na cieľové DNA (jadrová DNA interfáznych buniek alebo kondenzovaných chromozómov), fixované na mikroskopickom sklíčku. Pre hybridizáciu sa využívajú sondy, ktoré sú značené priamo alebo nepriamo. Pri priamom značení sa využíva fluorescenčné farbivo (fluorochrom). Pri nepriamom značení sa využíva molekula s naviazaným hapténom, ktorú možno detegovať pomocou protilátky značenej fluorochromom. V mojich experimentoch boli použité metódy FISH s nepriamo značenou sondou pre vizualizáciu génových markerov a CGH (komparatívna genómová hybridizácia) s využitím priameho značenia sondy.

Dôležitou súčasťou hybridizačného mixu pre FISH je mimo sondy kompetitorová DNA. Jej hlavnou funkciou je vyviazanie repetitívnych sekvencií, ako prevencia nešpecifických hybridizácií (Uberla *et al.* 1991). V našom prípade sme používali ako nešpecifického kompetitora sonikovanú DNA lososích spermii (Sigma aldrich). Pre experimenty CGH boli navyše použité špecifické kompetitory odvodené od celogenómovej DNA samíc, ktoré slúžili k vyviazaniu samičích (hlavne repetitívnych) sekvencií, čím malo dôjsť k zvýrazneniu Y špecifických signálov.

3.4.1 Vizualizácia génových markerov

Metóda FISH bola použitá na vizualizáciu génových markerov organizovaných v rDNA v repetíciách. Pro väčšinu druhov bola použitá iba sonda pre 18S rDNA. Pre rod *Poecilotheria*

som sa pokúsila vyvinúť sondy i pre iné markery. Testované boli primery pre nasledujúce gény: 18S rRNA, 5S rRNA, histónu H1 a H3, U1 snRNA a U2 snRNA. Jedná sa o relatívne často používané markery, aj keď ich použitie pre mygalomorfné pavúky ešte neboli publikované. Testovala som sety primerov používaných v predchádzajúcich diplomových prácach nášho pracoviska (Hrubá 2017, Pajpach 2018, Prokopcová 2018). Hoci nie u všetkých sa podarilo pripraviť cieľový fragment pro FISH sondu (tab. 2). Pred aplikáciou samotnej metódy, proces zahŕňal niekoľko dôležitých krokov prípravy sond platných pre všetky vizualizované markery: izolácia DNA, príprava sond amplifikáciou špecifických úsekov DNA pomocou PCR a jej optimalizácia. V prípade pozitívneho výsledku po PCR, nasledovali kroky platné pre markery: sekvenovanie, značenie sond pomocou PCR (okrem 18S rRNA vid' nižšie).

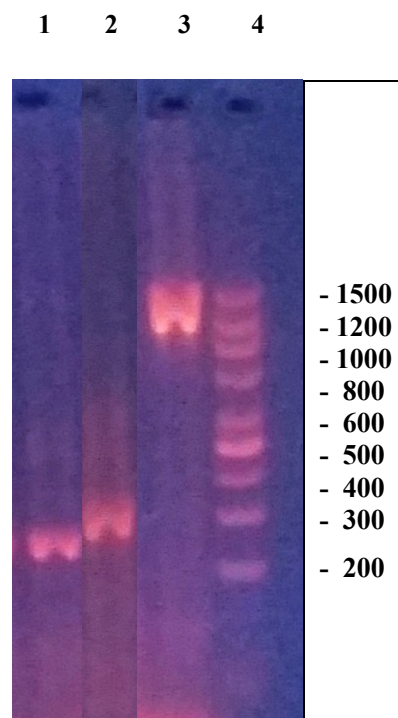
3.4.2 Príprava sond pre génové markery

Za účelom detekcie nukleolárnych organizátorov jadierka bola využitá vopred pripravená sonda z celogenómovej DNA haplogynného pavúka *Dysdera erythrina* (Dysderidae) izolovanej pomocou kitu DNeasy Blood & Tissue (Qiagen). Príslušná DNA slúžila ako templát pre PCR reakciu, v ktorej bol amplifikovaný úsek 18S rDNA. Výsledný produkt danej reakcie o veľkosti cca 1400 bp bol značený pomocou biotin-14-dATP metódou nick translácie s využitím kitu Bionick Labeling System (Invitrogen, Life technologies) (Forman *et al.* 2013).

Na prípravu ďalších sond bola použitá genomová DNA z druhu *Poecilotheria formosa*, ktorá bola izolovaná pomocou kitu DNeasy Blood & Tissue (Qiagen). Kontrola kvality DNA prebehla pomocou gélovej elektroforézy na 2% agarózovom gély. Koncentrácia DNA bola stanovená na fluorometrii Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific).

Celogenómová DNA slúžila v ďalšom kroku ako templát pre polymerázovú reťazovú reakciu (PCR). V reakcii dochádzalo k amplifikácii konkrétnych úsekov DNA pomocou primerov používaných pre konštrukciu FISH sond u iných organizmov. Tieto sondy boli syntetizované na zakázku spoločnosťou Generi Biotech (tab. 2). V danej reakcii bol zachovaný objem 20 µl, jednalo sa o nasledujúce reagenty: 10 µl PPP Master mix (Top Bio), 1 µl forward primeru o koncentracii 10 µM, 1 µl reverse primeru s rovnakou koncentraciou, 100 ng templátovej DNA, objem bol doplnený PCR H₂O (Top Bio). Reakcia prebiehala v PCR cykléry (LifeEco, Bioer) a mala presne stanovený teplotný profil: najprv iniciačná denaturácia (95°C, 3 min), nasledovala denaturácia v 35 cykloch, ktorá prebiehala pri 95°C (30s), nasadenie primerov s teplotným gradientom 50°C, 54°C, 58°C a 60°C (30s) a predĺžovanie reťazca pri teplote 72°C (2min) zakončené predĺžovaním reťazca po dobu 15

minút pri 72°C. Po dokončení reakcie prebehla kontrola kvality a veľkosti produktov pomocou gélovej elektroforézy na 2 % agarózovom gélu (obr. 4). Podľa výsledkov z elektroforézy, bolo možné vybrať produkty pre ďalšie kroky. Týmto kritériám zodpovedali produkty pre 5S rDNA a pre histón H3. U ostatných produktov amplifikácia nenastala ani po opakovaných testoch. U vybraných dvoch produktov bola zistená najvhodnejšia teplota pre nasadenie primerov 50°C (pre 5S rRNA, histón H3) a 54°C (pre 5S rRNA, histón H3). V ďalšom kroku boli výsledné produkty purifikované pomocou kitu Wizard® SV Gel and PCR Clean – Up. Po purifikácii bola určená presná koncentrácia DNA fluorometricky, a to pomocou prístroja Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific).



Obr. 4 Agarózová gélová elektroforéza PCR produktov detegovaných po amplifikácii DNA za použitia špecifických primerov. 1 - 4 – číselné označenie jamiek s výslednými produktami DNA pomenovaných podľa použitých špecifických primerov. 1 – fragment génu pro 5S rRNA, 2 – H3, 6 – kontrola, 3 – fragment génu pro 18S rRNA, 4 – ladder (vpravo veľkosť fragmentov v pb). Teplotný gradient pre nasadenie primerov H3, 5S rRNA 50°C, 54°C, 58°C a 60°C, nanášané z prava do ľava.

Gén	Označenie forward a reverse primerov / Sekvencia primerov	Ideálna T _m (°C)	Veľkosť produktu (pb)	Referencie
H3 histón	H3_F: 5'-TANGCACGYTCNCCNCGGAT - 3' H3_R: 5'-ATGGCNCGTACNAARCARAC - 3'	50°C, 54°C	300 pb	Institute of Entomology, České Budějovice
H1 histón	H1_F: 5'-ATGGCAGAARYCGCMCCAGC - 3' H1_R: 5'-TACTTCTTCTTGGGSGCTGC - 3'		BDP	Hashimoto <i>et al.</i> 2011
U1 snRNA	U1 snRNA_F: 5'- CTTACCTGGCGTRGRGGWY- 3' U1 snRNA_R: 5'- CAKCCCRRCTACCAAAAATT - 3'		BDP	Cabral de Mello <i>et al.</i> 2012
U2 snRNA	U2 snRNA_F: 5'- TCTCGGCCTWWTGGCTAA - 3' U2 snRNA_R: 5'- GMGGTASTGCAATACCGG - 3'		BDP	Colgan <i>et al.</i> 1998
U2 snRNA	U2 snRNA_F_1: 5'- ATCGCTTCTCGGCCTTATG - 3' U2 snRNA_R_1: 5'- TCCCGGCGGTACTGCAATA - 3'		BDP	Bueno <i>et al.</i> 2003
5S rRNA	5S rRNA_F: 5'-GCCAACGTCCATACCAAYGYTGA- 3' 5S rRNA_F: 5'-AAGCCAACGNCACGYGGT- 3'		BDP	Institute of Entomology, České Budějovice
5S rRNA	5S rRNA_F_1: 5'- AACACAAGTCCGGAGAACG - 3' 5S rRNA_R_1: 5'- GACCACTGAGAGGGTTCGAT- 3'	50°C, 54°C	300 pb	Suzuki a Kubota 2011
18S rRNA	18S rRNA_F: 5'- CGAGCGCTTTTAGACCA -3' 18S rRNA_R: 5'-GGTTACCTACGGAAACCTT- 3'		1400 pb	Forman <i>et al.</i> 2013

Tab. 2 Zoznam primerov a ich sekvencií použitých na prípravu sond pre konkrétne úseky DNA metódou PCR. Tabuľka zobrazuje konkrétne sekvencie forward (F) a reverse (R) primerov, ideálnu teplotu nasadenia primerov (T_m – teplota topenia), veľkosť produktu a zdroje, odkiaľ boli čerpané informácie o sekvencii primerov. V prípade degenerovaných primerov: N= A/G/T/C, Y= T/C, R= A/G, W= A/T, M= A/C, S= G/C. BDP – bez detegovaného produktu, na agarózovej gélovej elektroforéze po amplifikácii metódou PCR.

Pre určenie presných sekvencií DNA úspešne amplifikovaných produktov (fragmenty génov pre 5S rRNA a histón H3) boli jejich vzorky zaslané na sekvenovanie. Sekvenovanie prebiehalo na zakázku v Laboratóriu sekvenace DNA, PřF UK (Biocev), prístrojom MiSeq Illumina. Pre zaslanie vzoriek bolo nutné vzorky správne pripraviť. Vzorky zaslané na sekvenáciu obsahovali: 1 µl primeru o koncentrácií 5 µM, množstvo DNA bolo 5 ng/ 100 pb. Zvyšok skúmavky bol doplnený PCR H₂O (Top-Bio). Celkový objem predstavoval 8 µl. Sekvence boli odčítané v smere „reverse“ a „forward“ a výsledná sekvence vznikla preložením. Po obdržaní boli sekvencie pomocou programu Chromas a Bioedit odčítané a upravené. Kontrola zhody výslednej sekvencie so sekvenciami úsekov 5S rDNA a génov pre histón H3, prebiehala pomocou programu BLAST (verzia 2.6.1). V prípade, že sa daná sekvencia zhodovala, mohli sme ju považovať za hodnovernú.

Na značenie sond génov H3 a 5S rDNA bola využitá PCR, značenie sondy prebiehalo nepriamo s využitím biotin-16-dUTP (Sigma-Aldrich). Pre reakciu bol stanovený objem 25 µl, ktorý obsahoval nasledujúce zložky: 5 µl LA pufru (Top Bio), 2,5 µl dNTP Fluormix, 1 µl forward primeru, 1 µl reverse primeru, 1 µl LA polymerázy (Top Bio), 100 ng PCR produktu a PCR H₂O, ktorou bol doplnený celkový objem reakcie do 50 µl. Objem bol rozdelený do dvoch skúmaviek po 25 µl. Reakcia prebiehala pri presne stanovenom teplotnom profile; podľa výsledného teplotného gradientu z predchádzajúcej PCR bola stanovená najvhodnejšia teplota nasadenia primerov 50°C (pre 5S rRNA, pre histón H3) a 54°C (pre 5S rRNA, pre histón H3). Kvalita výslednej nepriamo značenej sondy bola elektroforeticky zkontrolovaná a bola zameraná jej koncentrácia. Následne bola sonda použitá v metóde FISH.

3.4.3 FISH s nepriamo značenou sondou

Pre vizualizáciu 18S rDNA na jednom preparáte bol použitý hybridizačný mix, ktorý obsahoval 25ng sondy značenej biotínom a 2,5 µl DNA lososích spermii (Sigma-Aldrich). Pre vizualizáciu ostatných markerov bolo množstvo sondy upravené na 30-50 ng na sklo. Druhým krokom bola precipitácia vzniknutej zmesi pridaním takého objemu roztoku Na-acetátu (5M, pH 5,2; Top Bio), ktorý predstavoval 10% objemu vzorky a takého objemu predchladeného 96% etanolu (-20°C), ktorý predstavoval 2,5 x finálneho objemu vzorky. Zmes bola uložená minimálne na 1 hodinu do hlbokomraziaceho boxu pri -75°C. Po precipitácii nasledovala centrifugácia, a to 20 minút pri 20 000 x g a odstránenie supernatantu. Potom bol pridaný 70% etanol (min. štvornásobok objemu), ďalšia centrifugácia bola 15 minút pri 20 000 x g. Po centrifugácií bol dôkladne odsatý supernatant. Pre úplné odparenie etanolu bola hybridizačná zmes v skúmavke s otvoreným viečkom umiestnená do termomixu pri teplote 37°C. Po

dôkladnom vysušení bola sonda rozpustená v preinkubovanom (37°C) 100% deionizovanom formamide (Sigma-Aldrich), v objeme 5 µl na preparát. Skúmavka bola umiestnená do termomixu na 30 minút. Po úplnom rozpustení peletu bolo pridaných na preparát 5 µl 20% dextranu sulfátu, preinkubovaného na 37°C. Hybridizačná zmes bola denaturovaná vo vodnom kúpeli pri teplote 90°C, po dobu 5 minút a následne schladená okamžitým vložením na ľad (3 min), aby sa zabránilo renaturácii. Zmes bola potom aplikovaná na denaturované preparáty.

Neofarbené preparáty určené k hybridizácii boli uchovávané v hlboko mraziacom boxe pri teplote -75°C. Po vybratí boli preparáty ihneď odvodnené vo vzostupnej etanolovej rade (70%, 80%, 96%), potom oschli. Na každý preparát bolo pridaných 100 µl roztoku 2% RNázy A (Biotech) v 2x SSC pre odstránenie RNA. Následne boli preparáty prikryté krycím sklom a inkubované pri 37°C, 1 hodinu. Po inkubácii s RNázou boli preparáty dvakrát opláchnuté v kyvetách s 2x SSC, ktoré boli preinkubované vo vodnom kúpeli pri 37°C, po dobu 5 minút. Pre zabránenie ďalšej nešpecifickej hybridizácie boli sklá presunuté do kyviet s 5x Denhardtovým činidlom a inkubované vo vodnom kúpeli pri 37°C, 30 minút s trepaním. Na každý preparát bolo pridaných 100 µl 70% deionizovaného formamidu (Sigma-Aldrich) v 2x SSC, boli prikryté krycím sklom a denaturované v termomixe pri 68°C, 3 minúty. Z preparátov boli odstránené krycie sklá a boli umiestnené do podchladeného (-20°C) 70% etanolu. Potom boli preparáty odvodnené v 80% a 96% etanole. Približne po 2 – 3 minútach, po čiastočnom oschnutí preparátov sa na každý preparát pridalo 10 µl hybridizačnej zmesi, boli prikryté krycím sklom a okraje tohto skla boli zalepené Rubber cementom (Marabu). Hybridizácia preparátov prebiehala v hybridizačných komôrkach, ktoré obsahovali filtračný papier napustený roztokom 2x SSC, v termostate pri 37°C do nasledujúceho dňa.

Nasledujúci deň bol z preparátov odstránený Rubber cement pomocou pinzety a po vložení preparátov do prvého pracieho roztoku boli odstránené krycie sklá. Nasledovalo postupné pranie preparátov v jednotlivých pracích roztokoch:

- 3x5 minút v 50% formamide v 2xSSC, pri teplote 46°C, trepanie
- 5x2 minúty v 2xSSC, pri teplote 46°C, trepanie
- 3x5 minút v 0,1xSSC, pri teplote 62°C, trepanie

V poslednom kroku boli preparáty presunuté do kyvety s roztokom 4xSSC/0,1% Tween 20 na 5 minút, pri izbovej teplote, v úplnej tme.

Nasledovala detekcia biotínu a amplifikácia signálu. Prvým krokom bolo blokovanie nešpecifických väzbových miest pomocou 2,5% BSA/4xSSC. Na každý preparát bolo prikvapnutých 500 µl roztoku. Preparáty boli prikryté krycím sklíčkom a inkubované v

hybridizačnej komôrke, pri pokojovej teplote 20 minút. Po ukončení inkubácie boli odstránené krycie sklíčka a na každý preparát bolo pridaných 100 μ l 0,1% roztoku streptavidínu-Cy3 v 100 μ l 2,5% BSA/4xSSC. Nasledovala inkubácia preparátov po dobu 30 minút v hybridizačnej komôrke, v úplnej tme, pri izbovej teplote. Preparáty boli následne vložené do kyvety s roztokom 4xSSC/0,1% Tween 20, pranie preparátov prebiehalo 3x3 minúty pri 37°C spolu s trepaním. Pro väzbu streptavidínu bolo nutné blokovanie nešpecifických väzbových miest pomocou 2,5% BSA (Gerbu)/4x SSC. Na každý preparát bolo prikvapnutých 500 μ l roztoku, preparáty boli prikryté krycím sklíčkom. Boli vložené do hybridizačnej komôrky, inkubácia trvala 20 minút, pri izbovej teplote. Po odstránení krycích sklíčok bolo prikvapnutých 100 μ l 0,1% roztoku streptavidínu-Cy3 (Jackson Immuno Research Laboratories) v 100 μ l 2,5% BSA/4x SSC. Inkubácia prebiehala za rovnakých podmienok 30 minút. V ďalšom kroku bolo prikvapnutých opäť 500 μ l BSA/4x SSC. Inkubácia prebiehala opäť rovnako ako pri predchádzajúcej hybridizácii. Následne bolo pridaných 75 μ l roztoku 4% antistreptavidínu kojugovaného s biotínom (Vector) v 2,5% BSA/4x SSC, pre zosilnenie signálu. Po priložení krycích sklíčok nasledovala inkubácia v termostate pri 37°C. Bolo zopakované opätovné zablokovanie reakcie pomocou BSA a zosilnenie signálu pomocou streptavidínu-Cy3.

V poslednom kroku boli chromozómové preparáty inkubované v roztoku fluorescenčného farbiva DAPI (Sigma-Aldrich). Farbenie prebiehalo v kyvetách, ktoré obsahovali jednotlivé farbiace alebo premývacie roztoky, za stáleho trepania, pri izbovej teplote. Preparáty boli najskôr premyté v roztoku 1% Triton X (Sigma-Aldrich)/1x PBS, 5 minút. Nasledovalo farbenie v roztoku v 40 ml 1% Triton X/1x PBS s 0,02mg diamidino-2-phenylindolu (DAPI, Sigma-Aldrich). Chromozómové preparáty boli farbené 8 minút. Po farbení pokračovalo premývanie 2-5 minút v 1% PhotoFlo (Sigma-Aldrich)/1x PBS. Posledným krokom v tejto sérii bolo premývanie 1 minútu v roztoku 1% PhotoFlo/redestilovaná voda. Potom preparáty čiastočne uschli a prikvaplo sa 20 μ l antifade DABCO. Preparáty boli prikryté krycím sklíčkom, pomocou filtračného papiera bola vytlačená prebytočná tekutina a okraje preparátov boli zalakované lakom na nechty. Pripravené chromozómové preparáty boli pozorované pod fluorescenčným mikroskopom Olympus IX81, s využitím CCD kamery a programu Cell ^R (Olympus). Pre úpravu získaných snímok bol použitý program Corel PHOTO-PAINT X5.

3.5 Komparatívna genómová hybridizácia (CGH)

Komparatívna genómová hybridizácia je metóda založená na princípe fluorescenčnej in situ hybridizácie (FISH). Cieľom metódy bola v mojom prípade detekcia špecifických úsekov typických pre samčie pohlavie na pohlavných chromozómoch Y. Detekcia prebiehala na samčích chromozómoch fixovaných na sklíčku. Princíp metódy spočíval v hybridizácií samčej a samičej fluorescenčne značenej sondy na cieľovú samčiu DNA. Samčie a samičie sondy sú značené farbene odlišnými fluorochromami, ktoré po naviazaní vo výsledku umožnia detekciu špecifických signálov typických pre samcov na pohlavných chromozómoch. Metóda CGH obsahuje nasledujúce kroky: izoláciu DNA, prípravu sond, prípravu kompetitorovej DNA a samotnú aplikáciu sond.

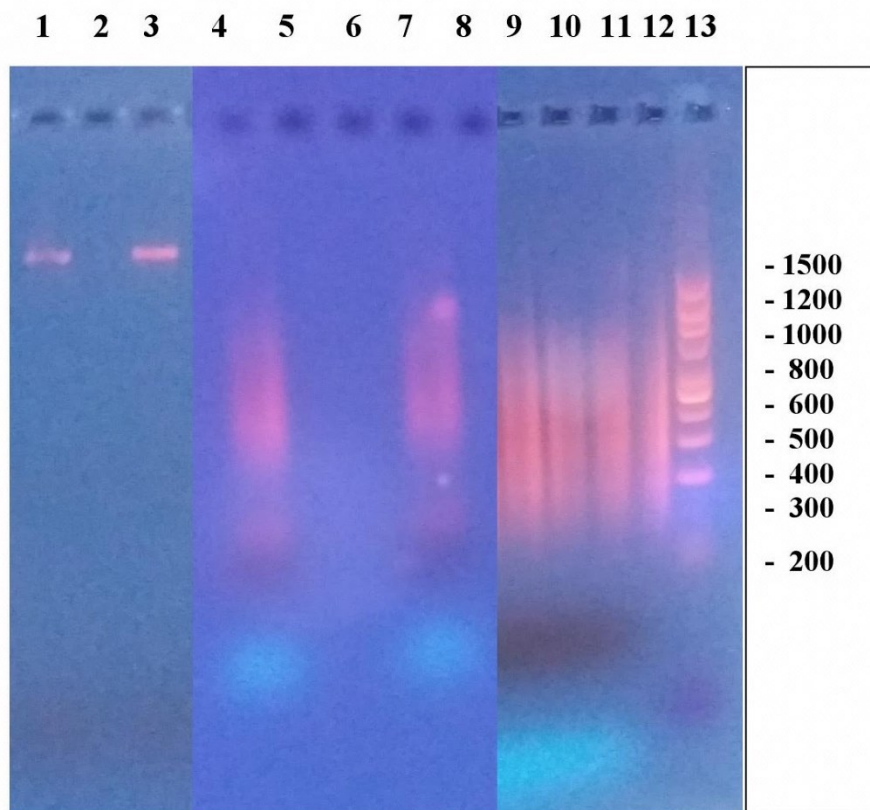
3.5.1 Izolácia DNA

Z vybraných vzoriek bola DNA izolovaná podľa protokolu DNeasy Blood & Tissue Kit firmy Qiagen. Kvalita DNA bola určená pomocou 2% agarózovej gélovej elektroforézy a vzorky boli uskladnené v chladničke. Koncentrácia DNA bola meraná fluorometricky pomocou Qubit® 3.0 (Thermo Fisher Scientific). V prípade nedostačujúcej koncentrácie boli vzorky precipitované. Pre izoláciu DNA bola tiež použitá modifikovaná CTAB metóda podľa protokolu Winnepenninck *et al.* (1993), tieto experimenty boli prevedené v Laboratóriu molekulárnej cytogenetiky na Entomologickom ústave AV ČR, České Budějovice. V metóde bol použitý CTAB pufer, detergent, ktorý sa využíva pri izolácii vysoko polymerizovanej genomickej DNA. Rozpúšťa lipidové membrány vnútorných organel a denaturuje proteíny.

3.5.2 Príprava sond

Samčia a samičia DNA bola značená pomocou nick translácie, ktorá slúži na inkorporáciu značených nukleotidov na voľné konce DNA (Pollock a kol. 2014). Pre značenie sme použili CGH Nick translation kit (Abbott). Metódou bol značený 1 µg genómovej DNA. Skúmavky pre samčie a samičie sondy obsahovali 5 µl nick translačného pufru, 5 µl fluormixu (Cy3 pre samca alebo FITC pre samičiu DNA), 10 µl enzýmu pro nick transláciu a genómovú DNA príslušného pohlavia (množstvo genómovej DNA bolo potrebné vopred vypočítať, na základe koncentrácie). Výsledný objem 50 µl bol získaný doplnením H₂O. Protokol je navrhnutý tak, aby jeho výsledkom bola zmes značených fragmentov genómovej DNA, ktorých veľkosť sa pri optimálnych podmienkach pohybuje v rozmedzí 300 až 3000 bp. Kontrolu správneho značenia sond bolo nutné vykonávať priebežne po 2 – 4 hodinách inkubácie (16°C, v termomixe alebo v cykléry), pomocou 2% gélovej agarózovej elektroforézy: v jej priebehu bola reakcia pozastavená vloženíím na ľad. V prípade, že bol pozorovaný smear (obr. 5)

zodpovedajúci príslušnej veľkosti fragmentov, a nezreteľný prúžok vysokomolekulárnej gDNA, reakcia bola zastavená zahriatím vzoriek na 70°C.



Obr. 5 Agarózová gélová elektroforéza. 1 - 13 – číselné označenie jamiek. **1-3** – kontrola, celogenómová DNA, **4-7** – fragmentovaná DNA po nick translácii, **9 – 12** – kompetitorová DNA po DOP2 PCR, **13** – ladder (vpravo veľkosť fragmentov v pb).

3.5.3 Príprava kompetitorovej DNA

Kompetitorová DNA sa využíva na vyviazanie repetitívnych sekvencií, ako prevencia nešpecifických hybridizácií. Kompetitorová DNA bola získaná metódou DOP PCR (degenerate oligonucleotide – primed PCR) podľa protokolu Telenius *et al.* (1992). Metóda sa skladá z dvoch po sebe nasledujúcich reakcií, pričom každá PCR reakcia má presne stanovený termálny profil. Každéj reakcii predchádza príprava master mixu. Master mix pre DOP1 PCR obsahoval: PPP master mix, Brij, MgCl₂ (50 mM), DOP2 primer (40 μM), Taq polymerázu, PCR H₂O a genómovú samičiu DNA. Master mix pre DOP2 reakciu obsahoval: Blue Buffer, primer DOP2, dNTP mix (Top-Bio), MgCl, Brij, La polymerázy (Top-Bio), PCR H₂O, produkt z DOP1 PCR. V oboch reakciách bol použitý primer so sekvenciou 5' - CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G - 3' a bol presne stanovený teplotný profil (tab. 3). Kontrola kvality kompetitorovej DNA bola po ukončení každej reakcie pomocou gélovej elektroforézy.

Správny kompetitor sa zobrazil ako smear v rozsahu 200 – 1000 bp, resp. 200 – 2000 bp (obr. 5).

Pre porovnanie, či použitý typ kompetitorovej DNA môže ovplyvniť výsledok experimentu, bol použitý v ďalšom experimente (s druhom *Poecilotheria vittata*) iný typ kompetitora, konkrétne cot-1 DNA amplifikovaná pomocou amplifikačného kitu Illustra GenomiPhi HY a sonikovaná celogenomová DNA. Obe kompetitorové DNA boli poskytnuté Dr. P. Ngueynem z Laboratória molekulárnej cytogenetiky Entomologického ústavu AV ČR, České Budějovice a boli pripravené zo samice druhu *Poecilotheria vittata*.

Teplotný profil pre DOP1 PCR reakciu	Teplotný profil pre DOP2 PCR reakciu
1. 96°C 5 min	1. 95°C 3 min
2. 96°C 1 min	2. 94°C 40 sec
3. 30°C 1 min	3. 56°C 40 sec
4. 0,1°/s to 72°C	4. 72°C 2 min
5. 72°C 2 min	5. Od kroku 2 (29 opakovaní cyklu)
6. Od kroku 2 (2 opakovania cyklu)	6. 72°C 5 min
7. 96°C 1 min	7. 10°C
8. 30°C 1 min	
9. 0,3°/s to 72°C	
10. 72°C 2 min	
11. Od bodu 7 (4 opakovania cyklu)	
12. 94°C 1 min	
13. 56°C 1 min	
14. 72°C 2 min	
15. Od kroku 12 (34 opakovaní cyklu)	
16. 72°C 5 min	
17. 10°C	

Tab. 3 Zobrazenie teplotných profilov pre prípravu kompetitora reakciou DOP PCR.

3.5.4 CGH

Samčia a samičia fluorescenčne značená sonda spolu s kompetitorovou DNA boli zmiešané v skúmavke v pomere 1:1:19 (pomer stanovený po konzultácií s kolegami). Na každý preparát bolo pridaných ako nešpecifický kompetitor 2,5 μ l DNA z lososích spermii, následovalo premiešanie vzorky (vortex). Potom bola prevedená precipitácia DNA vo vzorke a príprava hybridizačného mixu, ako bolo popísané v predchádzajúcej kapitole (3.4.3). Jediným rozdielom bol objem pridávaných roztokov do hybridizačného mixu, ktorý bol pri tejto metóde 7,5 μ l na preparát. Denaturácia hybridizačnej zmesi prebiehala vo vodnom kúpeli na ostrovčeku pri 90°C 5 minút. Nakoniec bola zmes rýchlo schladená jej vložením na ľad (3 min). V niektorých prípadoch bola zmes predhybridizovaná pri teplote 37°C, 30 minút (termobloček). Tento krok viedol k dokonalejšiemu vychytaniu Y nešpecifických sekvencií a k zvýrazneniu Y špecifických signálov.

Preparáty boli pripravené rovnakým spôsobom ako pri metóde FISH. Uskladnené boli v hlbokomraziacom boxe pri teplote -75°C. Po vybratí z hlbokomraziaceho boxu boli preparáty odvodnené. Po predpôsobení RNázou A a Denharthovým reagens boli preparáty denaturované, ako bolo popísané v metóde FISH (kapitola 3.4.3). Rovnakým spôsobom prebiehala denaturácia, pri teplote 68°C po dobu 3 minúty. Na každý preparát bolo pridaných 7,5 μ l hybridizačnej zmesi, hybridizácia preparátov prebiehala v hybridizačných komôrkach, v termostate pri 37°C, 3 dni. Po ukončení hybridizácie boli preparáty inkubované vo vodnom kúpeli, v jednotlivých pracích roztokoch. Po skončení inkubácie prebiehalo farbenie chromozómových preparátov fluorescenčným farbivom DAPI (Sigma-Aldrich), a to v roztoku 4xSSC/0,1% Tween 20 po dobu 5 minút (pri izbovej teplote, v úplnej tme), ako bolo popísané v predchádzajúcej kapitole (3.4.3).

4 Výsledky

4.1 Mygalomorphae

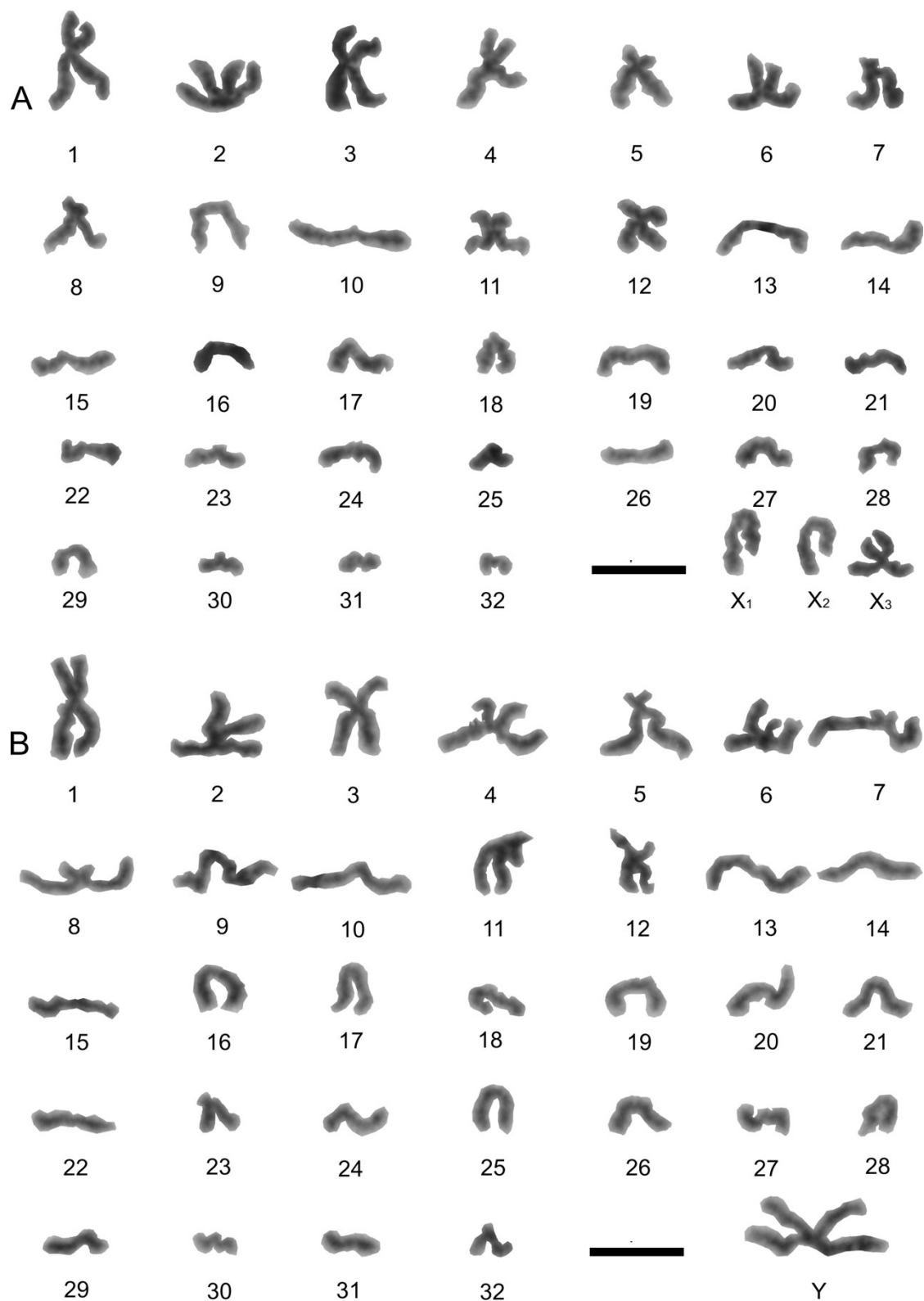
4.1.1 Barychelidae

Atrophothele socotrana

Diploidný počet chromozómov u samca daného druhu bol stanovený na 68. Samec nesie 3 pohlavné chromozómy X a jeden Y. Pohlavné chromozómy X_1 a X_2 sú akrocentrické chromozómy, kým pohlavný chromozóm X_3 je metacentrický chromozóm. Chromozóm Y je veľkosťou najväčší metacentrický chromozóm (tab. 4, obr. 6 A, B). V karyotype výrazne dominujú jednoramenné, akrocentrické chromozómové páry, ktorých počet je 25. Metacentrických chromozómových párov je 6. Zvyšné chromozómové páry sú submetacentrické a subteloцентриcké s rovnakým počtom 2 (tab. 4, obr. 6 A, B). Väčšina dvojramenných chromozómov patrí medzi veľké a stredne veľké chromozómové páry (tab. 4). V neskorej profázy bolo pozorovaných 34 chromozómových elementov, z ktorých jeden útvar tvorí trivalent (obr. 7 A, B). Trivalent sa skladá z metacentrického chromozómu a dvoch jednoramenných chromozómov. Z diploidného počtu teda vyplýva, že jeden z ďalších elementov vo figúre musí byť univalent, ktorý má ale podobnú morfológiu ako bivalenty s terminálnou chiazmou a není od nich odlišiteľný. Počas metafázy II, jedna sesterská figúra obsahuje 33 a druhá 35 chromozómov. Figúra s 35 chromozómami obsahuje 3 chromozómy X, figúra s 33 chromozómami chromozóm Y. Na základe počtu chromozómov v sesterských figúrach a ich segregácie predpokladáme, že trivalent tvoria 2 akrocentrické chromozómy X a jeden metacentrický Y chromozóm. Univalent tvorí metacentrický chromozóm X (obr. 7 C, D). Ďalším neobvyklým útvarom vo figurách je heteromorfný bivalent (obr. 7E)

Frekvencia chiazmiem je 1,05. Hodnota bola nameraná z 8 figúr v diploténnych štádiách a diakinéze. Bivalenty prevažne obsahovali jednu chiazmu, 2 – 3 bivalenty obsahovali dve chiazmy.

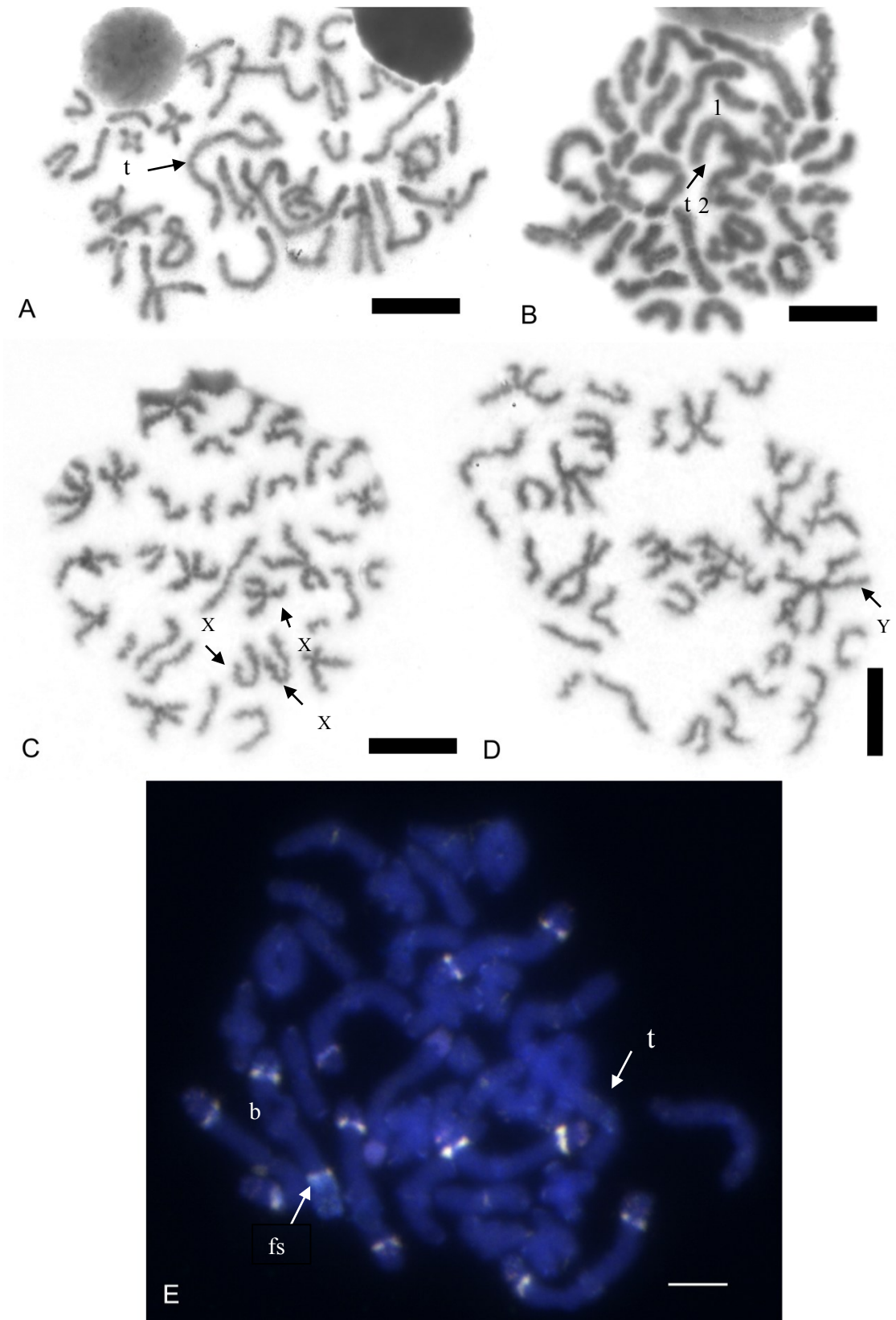
Metóda CGH odhalila slabý samičí signál na heteromorfnom páre. Signál je lokalizovaný na krátkom ramienku jedného chromozómu. Signály pozorované v centromerických oblastiach niektorých chromozómových párov, počas neskorej profázy I, vznikli pravdepodobne dôsledkom väzby samčej i samičej sondy do oblastí s konštitutívnym heterochromatínom, ktorý sa vyznačuje vyšším stupňom špiralizácie. Zvyšné chromozómové páry neboli značené samčou ani samičou sondou (obr. 7 E).



Obr. 6 Dva haploidné komplementy samca *Atropothele socotrana*, jeden s chromozómami X, druhý s chromozómom Y. Zostavené zo sesterských metafáz II. Merítka 10 μm .

Pár.č./ gonozóm	Priemerná relatívna chromoz. dĺžka	Priemerný centromer. index	Morfolog. typ
1.	4,46	1,50	m
2.	4,37	∞	a
3.	4,16	1,57	m
4.	3,80	1,26	m
5.	3,73	2,67	sm
6.	3,60	1,59	m
7.	3,47	6,72	st
8.	3,32	3,32	st
9.	3,19	∞	a
10.	3,17	∞	a
11.	3,10	2,40	sm
12.	3,07	1,48	m
13.	3,05	∞	a
14.	3,01	∞	a
15.	2,92	∞	a
16.	2,89	∞	a
17.	2,80	∞	a
18.	2,79	∞	a
19.	2,75	∞	a
20.	2,72	∞	a
21.	2,66	∞	a
22.	2,64	∞	a
23.	2,53	12,04	a
24.	2,43	∞	a
25.	2,42	∞	a
26.	2,32	∞	a
27.	2,22	∞	a
28.	2,20	∞	a
29.	1,95	∞	a
30.	1,85	∞	a
31.	1,65	∞	a
32.	1,55	∞	a
X ₁	1,96	∞	a
X ₂	1,69	∞	a
X ₃	1,17	1,20	m
Y	2,39	1,11	m

Tab. 4 Charakteristika karyotypu samca *Atrophothele socotrana*. Namerané z metafázy II, tvorenej sesterskými figúrami.



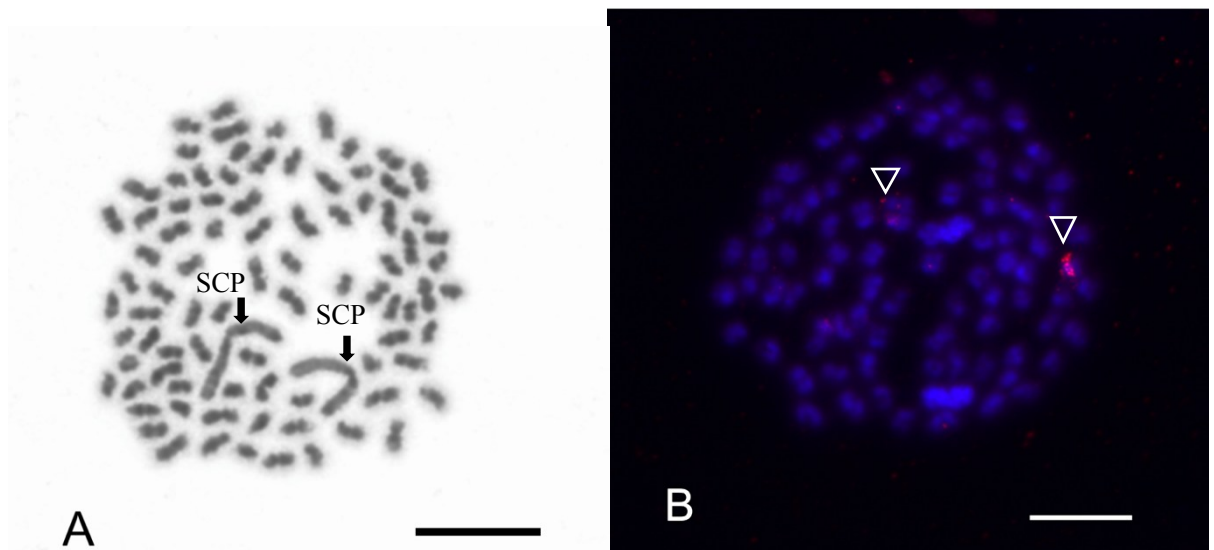
Obr. 7 Analýza meiózy a detekcia špecifických signálov na pohlavných chromozómoch metódou CGH u samca *Atropothele socotrana*. A – diploténe, šípka ukazuje na trivalent uprostred figúry (t); B – diakinéza, šípka ukazuje na trivalent uprostred figúry (t), číslami sú označené chiazmy medzi chromozómami trivalentu; C – metafáza II, figúra s pohlavnými chromozómami X (šípky); D – metafáza II, figúra s pohlavným chromozómom Y. E – neskorá profáza I, šípka označená fs ukazuje na

heteromorfný bivalent (b), mieri na samičí signál, šípka označená t ukazuje na trivalent. Merítko 5 (A-D) popř. 10 μm (E).

4.1.2 Theraphosidae

Cyriocosmus perezmilei

Diploidný počet samca je 86 chromozómov. Počas mitotickej metafázy je viditeľný jeden pár metacentrických SCP, ktorý je omnoho väčší, ako ostatné chromozómy (obr. 7 A). Z morfológického hľadiska prevažujú dvojramenné chromozómy nad jednoramennými (obr. 7 A). Metóda FISH odhalila NOR lokus na jednom páre chromozómov (obr. 7 B). Preparáty neobsahovali dostatočný počet figúr pre ďalšiu analýzu.

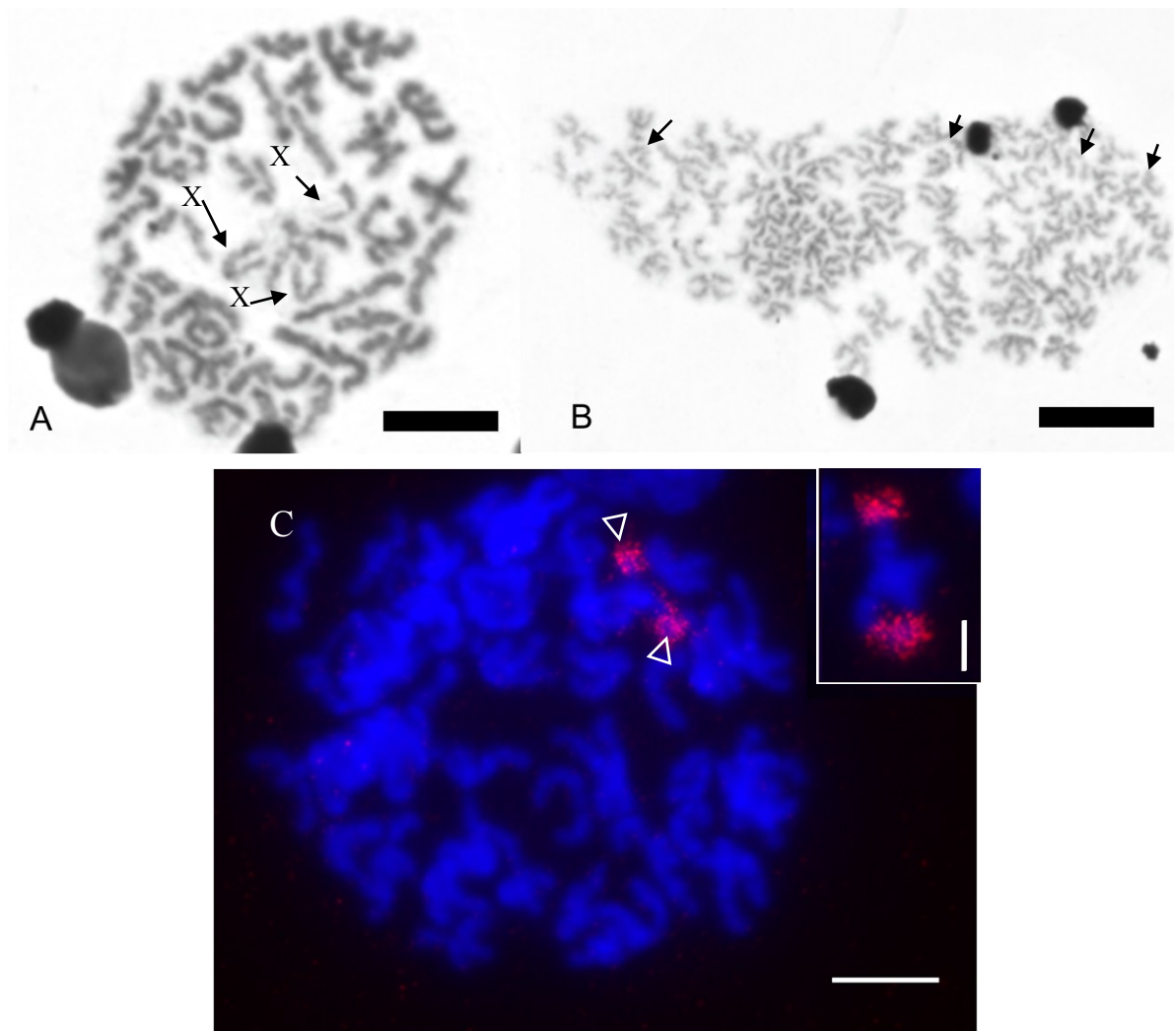


Obr. 8 Samec *Cyriocosmus perezmilei*. A – mitotická metafáza, šípky ukazujú na prítomnosť jedného páru SCP; B – detekcia 18S rRNA génov pomocou FISH, trojuholníkové šípky smerujú na dva chromozómy s NOR. Merítko 10 μm .

Neoholothele incei

Diploidný počet chromozómov u samca bol stanovený na 77. V diakinéze prvého meiotického delenia sa nachádza 37 bivalentov spolu s tromi pohlavnými chromozómami X, ktoré sú lokalizované uprostred jadra a dajú sa odlíšiť od ostatných bivalentov na základe špecifického achiazmatického správania, tzv. end-to-end párovanie (obr. 9 A). V druhom meiotickom delení sa vyskytujú prevažne dvojramenné chromozómy, ale bol pozorovaný aj výskyt dvoch párov jednoramenných chromozómov (obr. 9 B).

Metódou FISH boli detegované NOR v terminálnej oblasti dlhých ramien chromozómu submetacentrického páru (obr. 9 C).



Obr. 9 Priebeh meiózy a detekcia NOR metódou FISH u samca *Neoholothele incei*. A – diakinéza, pohlavné chromozómy X (šípky); B – spojené sesterské metafázy II, jednoramenné páry chromozómov (šípky); C – metafáza II, trojuholníkové šípky ukazujú na NOR v terminálnej oblasti dlhého ramena submetacentrického chromozómu. Merítka 10 μm . Výrez – submetacentrický chromozóm s NOR v terminálnej oblasti dlhých ramien. Merítka 5 μm .

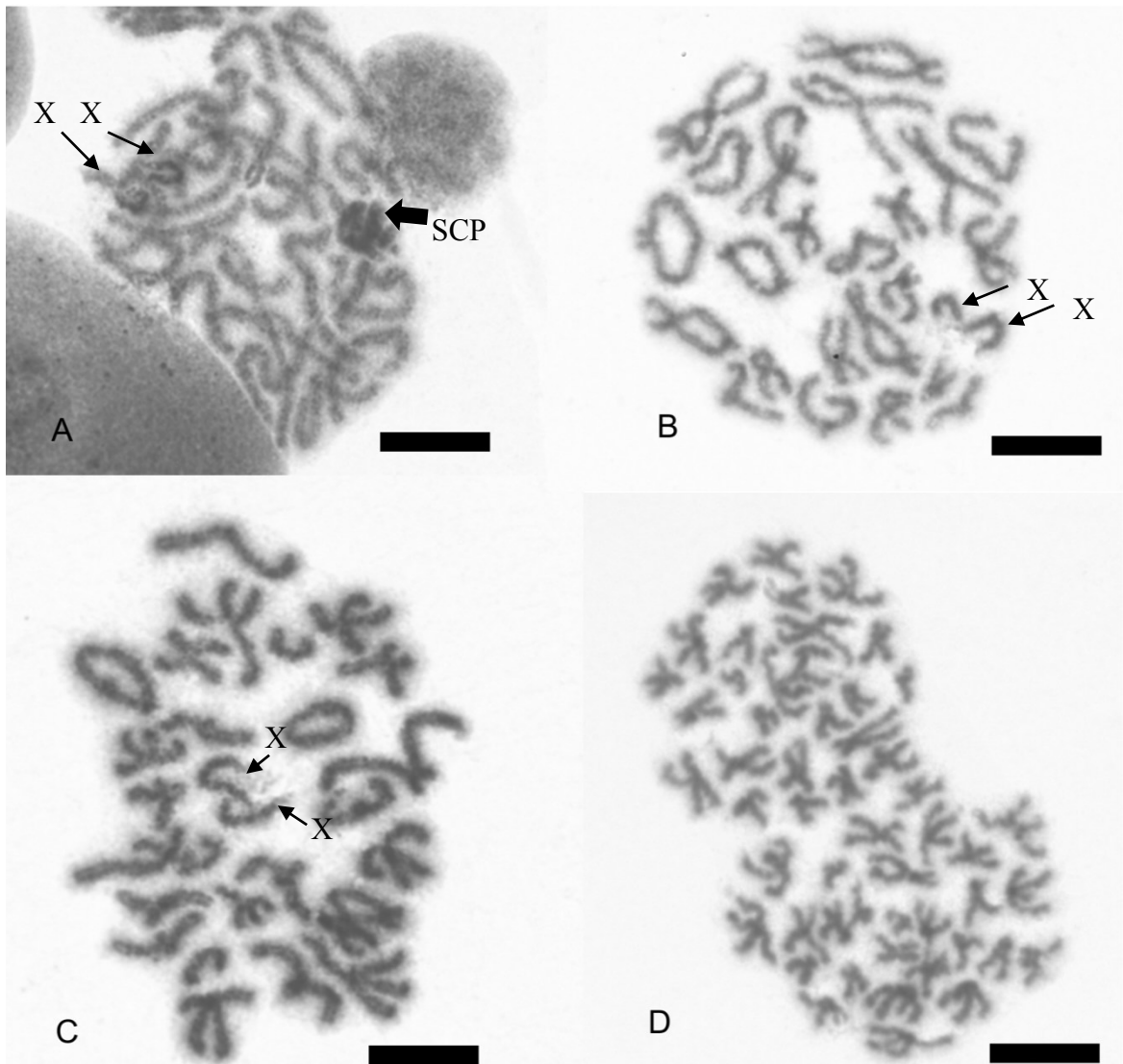
Nhandu chromatus

Diploidnú sadu samca *Nhandu chromatus* tvorí 52 chromozómov, z čoho dva sú pohlavné chromozómy X. Pohlavné chromozómy X sú stredne veľké až veľké metacentriky. V pachyténnom štádiu je u pohlavných chromozómov viditeľná slabá pozitívna heteropyknóza a sú asociované na periférii jadra (obr. 10 A). Na protíľahlej strane jadra je heteropyknotické teliesko tvorené SCP (obr. 10 A). V skorom diploténnom štádiu sa pohlavné chromozómy X nachádzajú na periférii jadra (obr. 10 B), v priebehu diploténneho štádia pohlavné chromozómy X migrujú do stredu jadra (obr. 10 C). V oboch prípadoch sú pohlavné chromozómy izopyknotické a asociujú svojimi koncami, tzv. end – to – end párovanie. Pohlavné chromozómy X sa v metafáze II vyskytujú vo figúre, ktorej počet chromozómov je

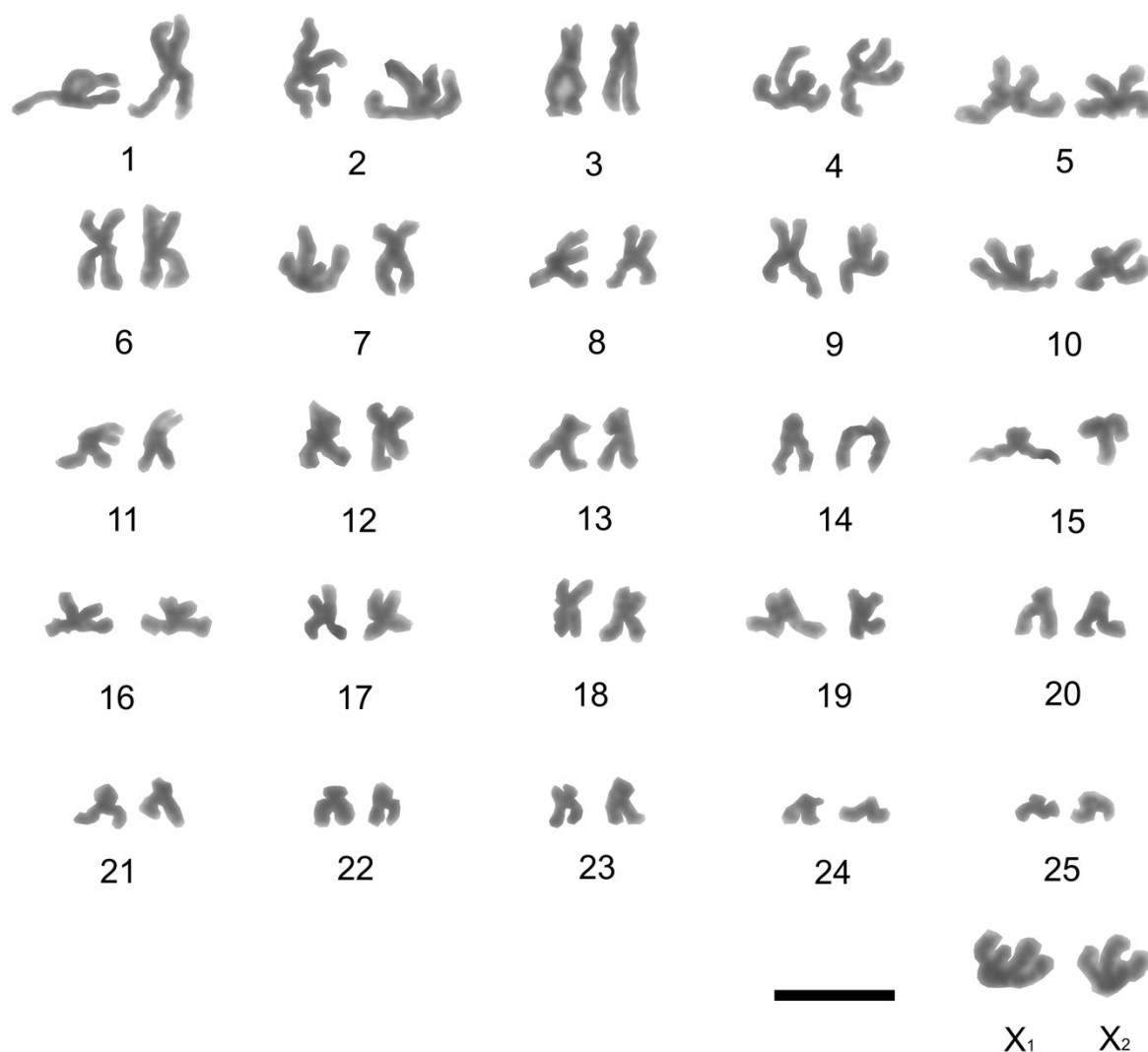
27. Počet chromozómov v sesterskej figúre, ktorá neobsahuje X chromozómy je 25 (obr. 10 D). Karyotyp samca je tvorený dvojramennými a jednoramennými chromozómami (obr. 11). Karyotyp obsahuje 12 metacentrických chromozómových párov. Počet submetacentrických chromozómových párov je 6, rovnaký počet je submetelocentrických chromozómových párov a 3 chromozómové páry sú akrocentrické. Dĺžka chromozómových párov sa znižuje pozvoľna (tab. 5, obr. 11). Frekvencia chiazmat je 1,15. Táto hodnota bola zistená z 8 figúr v diplotennom štádiu a v diakinéze. Vo figúrach sa vyskytovali predovšetkým bivalenty s jednou chiazmou, dve chiazmy boli pozorované u 3 – 4 bivalentov.

Pár.č./gonozóm	Priemerná relatívna chromoz. dĺžka/št.odchylka	Priemerný centromer. index	Morfolog. typ
1.	6,71 ($\pm 0,095$)	1,27	m
2.	6,37 ($\pm 0,081$)	1,12	m
3.	5,37 ($\pm 0,072$)	1,78	sm
4.	5,16 ($\pm 0,072$)	1,59	m
5.	5,05 ($\pm 0,064$)	2,63	sm
6.	4,77 ($\pm 0,063$)	1,28	m
7.	4,73 ($\pm 0,063$)	2,49	sm
8.	4,41 ($\pm 0,049$)	1,34	m
9.	4,38 ($\pm 0,042$)	1,38	m
10.	4,02 ($\pm 0,041$)	1,24	m
11.	3,97 ($\pm 0,038$)	1,15	m
12.	3,47 ($\pm 0,038$)	1,54	sm
13.	3,43 ($\pm 0,036$)	2,41	sm
14.	3,32 ($\pm 0,036$)	∞	a
15.	3,12 ($\pm 0,031$)	3,14	st
16.	3,07 ($\pm 0,028$)	1,42	m
17.	3,03 ($\pm 0,027$)	1,79	sm
18.	3,00 ($\pm 0,027$)	1,27	m
19.	2,95 ($\pm 0,023$)	4,76	st
20.	2,85 ($\pm 0,023$)	3,76	st
21.	2,81 ($\pm 0,022$)	4,09	st
22.	2,47 ($\pm 0,022$)	3,98	st
23.	2,28 ($\pm 0,02$)	4,23	st
24.	1,76 ($\pm 0,018$)	∞	a
25.	1,61 ($\pm 0,016$)	∞	a
X ₁	3,31 ($\pm 0,038$)	1,21	m
X ₂	2,58 ($\pm 0,057$)	1,12	m

Tab. 5 Charakteristika karyotypu samca *Nhandu chromatus*. Namerané z 5 figúr, tvorených dvoma sesterskými metafázami II.



Obr. 10 Analýza meiózy samca *Nhandu chromatus*. A – pachyténne, šípky ukazujú na pohlavné chromozómy X, tučná šípka ukazuje na SCP; B a C – diploténne, diakinéza, šípky ukazujú na X₁ a X₂ a ich lokalizáciu na periférii (B) a uprostred jadra (C); D – dve sesterské metafázy II. Merítok 5 μ m.



Obr. 11 Diploidný karyogram samca *Nhandu chromatus*. Zostavený zo sesterských metafáz II. Merítko 10 μm .

Lasiadora striatipes

Bol analyzovaný subadultný samec, ktorého počet chromozómov v diploidnej sade je 46. V karyotype prevládajú metacentrické páry, ktorých počet je 13. Štyri chromozómové páry sú submetacentrické, 4 subtelocentrické a 3 chromozómové páry sú akrocentrické (tab. 6, obr. 12). Karyotyp obsahuje dva metacentrické pohlavné chromozómy X. V mitóze nemožno odlíšiť jednotlivé chromozómy X, v premeiotickej interfáze sú fakultatívne heterochromatinizované. V pachyténnom štádiu, prvého meiotického delenia sú pozorovateľné 2 heteropyknotické telieska, jedno je tvorené pohlavnými chromozómami X a druhé SCP (pravdepodobne to väčšie) (obr. 13 A). V diakinéze sú pozorovateľné 2 pohlavné chromozómy X, ktoré sú lokalizované približne uprostred figúry (obr. 13 B). V metafáze II sú

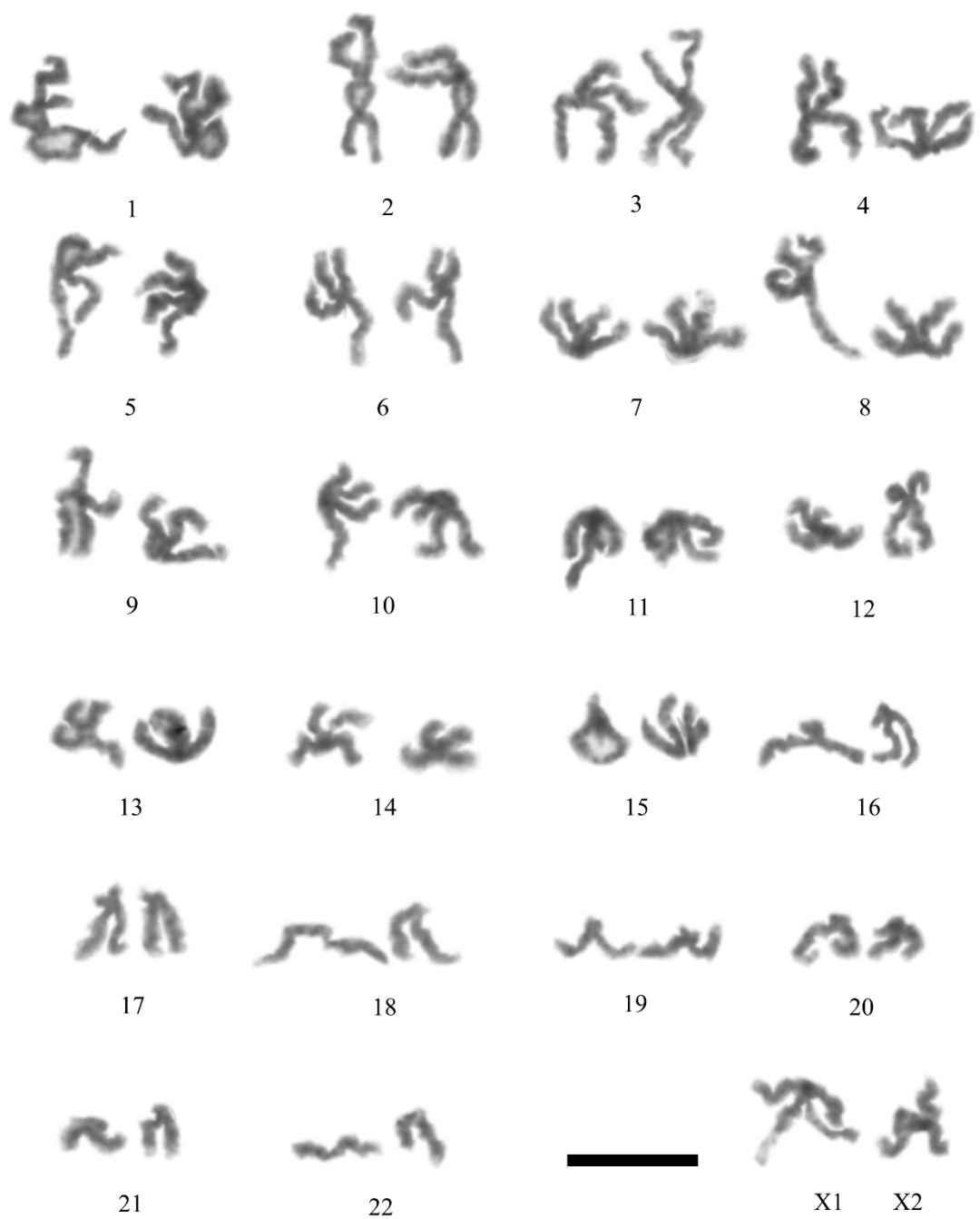
pohlavné chromozómy X izopyknotické a nie sú odlišiteľné od ostatných chromozómov (obr. 13 D).

Frekvencia chiazmat počas meiózy je pomerne nízka, nameraná hodnota 1,07 bola vypočítaná z 8 figúr v štádiu diakinézy. Vo figúrach prevažovali bivalenty s jednou chiazmou. Počet bivalentov s dvomi chiazmami bol 2 – 3 na figúru.

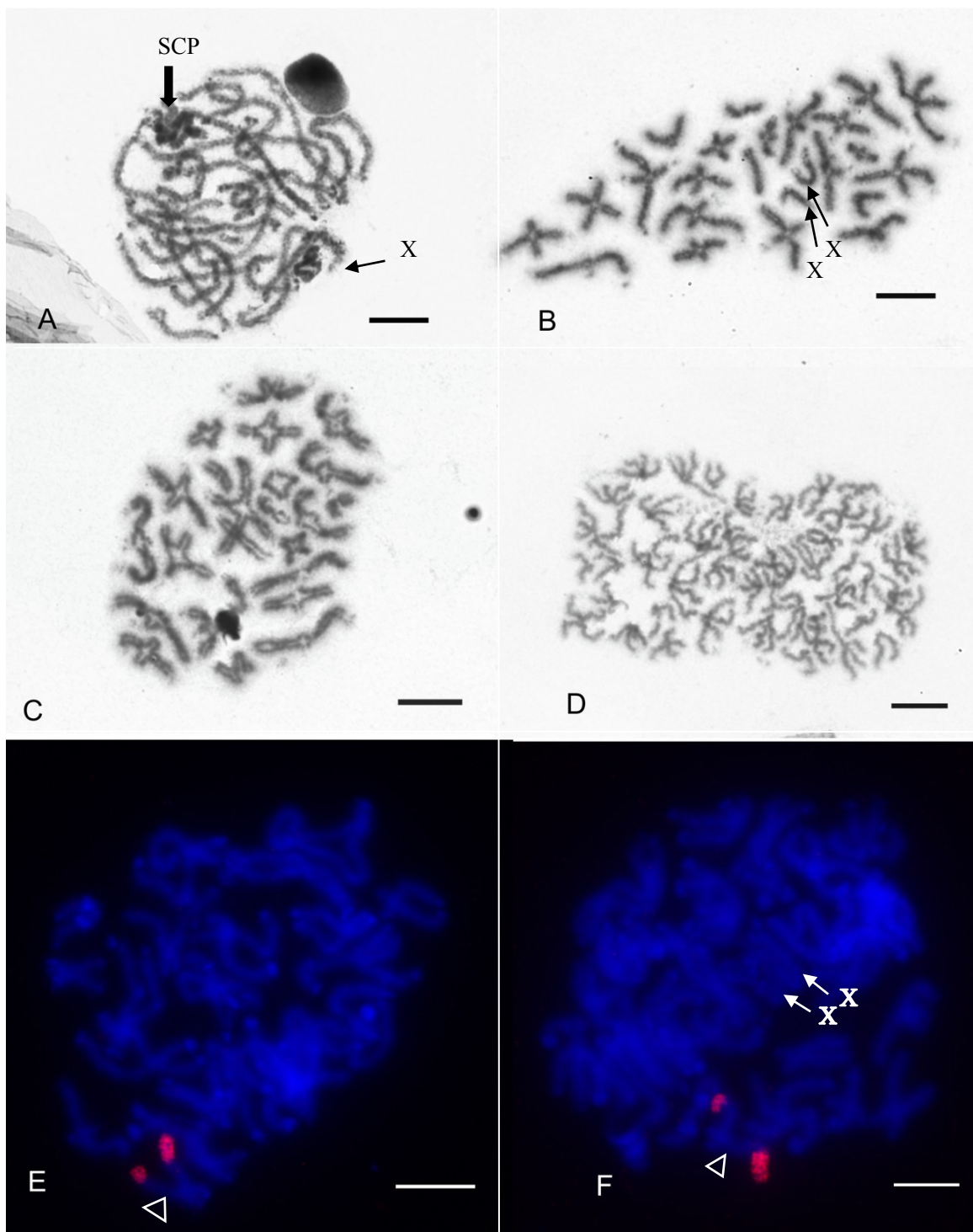
Metódou FISH bol detegovaný NOR v bivalente, tvoreného submetacentrickými chromozómami, na koncoch jeho dlhých ramienok (13 E, 13 F). Z analyzovaných figúr môžeme vyvrátiť prítomnosť NOR na pohlavných chromozómoch X (obr. 13 F).

Pár.č./gonozóm	Priemerná relatívna chromoz. dĺžka/ št. odchylka	Priemerný centromer. index	Morfolog. typ
1.	7,22 ($\pm 0,02$)	1,19	m
2.	6,55 ($\pm 0,036$)	1,39	m
3.	6,25 ($\pm 0,027$)	1,30	m
4.	5,84 ($\pm 0,038$)	1,32	m
5.	5,55 ($\pm 0,043$)	1,35	m
6.	5,4 ($\pm 0,04$)	2,09	sm
7.	5,2 ($\pm 0,039$)	1,25	m
8.	5,11 ($\pm 0,025$)	1,16	m
9.	4,8 ($\pm 0,017$)	1,32	m
10.	4,66 ($\pm 0,034$)	2,16	sm
11.	4,6 ($\pm 0,033$)	1,18	m
12.	4,37 ($\pm 0,045$)	2,63	sm
13.	4,01 ($\pm 0,028$)	1,39	m
14.	3,67 ($\pm 0,038$)	1,29	m
15.	3,52 ($\pm 0,023$)	2,69	sm
16.	3,3 ($\pm 0,019$)	4,66	st
17.	3,27 ($\pm 0,027$)	6,01	st
18.	2,84 ($\pm 0,032$)	10,87	a
19.	2,7 ($\pm 0,027$)	4,80	st
20.	2,59 ($\pm 0,025$)	4,17	st
21.	1,94 ($\pm 0,031$)	10,98	a
22.	1,88 ($\pm 0,027$)	10,80	a
X ₁	2,67 ($\pm 0,038$)	1,27	m
X ₂	2,08 ($\pm 0,057$)	1,30	m

Tab. 6 Charakteristika diploidnej sady samca *Lasiadora striatipes*. Namerané z 5 figúr, tvorených dvoma sesterskými metafázami II.



Obr. 12 Karyogram samca *Lasiadora striatipes*. Zostavený zo sesterských metafáz II. Merítok 10 μ m.



Obr. 13 Analýza meiózy a detekcia NOR pomocou FISH u samca *Lasiodora striatipes*. A – pachyténne, (tučná šípka) heteropyknotické teliesko tvorené SCP, (šípka) heteropyknotické teliesko tvorené pohlavnými chromozómami X; B – diakinéza, šípky ukazujú na X chromozómy uprostred figúry; C – neskorá metafáza I; D – figúra tvorená dvomi dotýkajúcimi sa sesterskými metafázami II; E – diploténne, FISH, trojuholníková šípka: NOR v terminálnych oblastiach ramienok jedného bivalentu; F – diploténne, trojuholníková šípka: NOR v terminálnych oblastiach jedného bivalentu, klasické šípky ukazujú na pohlavné chromozómy X. Merítka 10 μ m.

Poecilotheria formosa

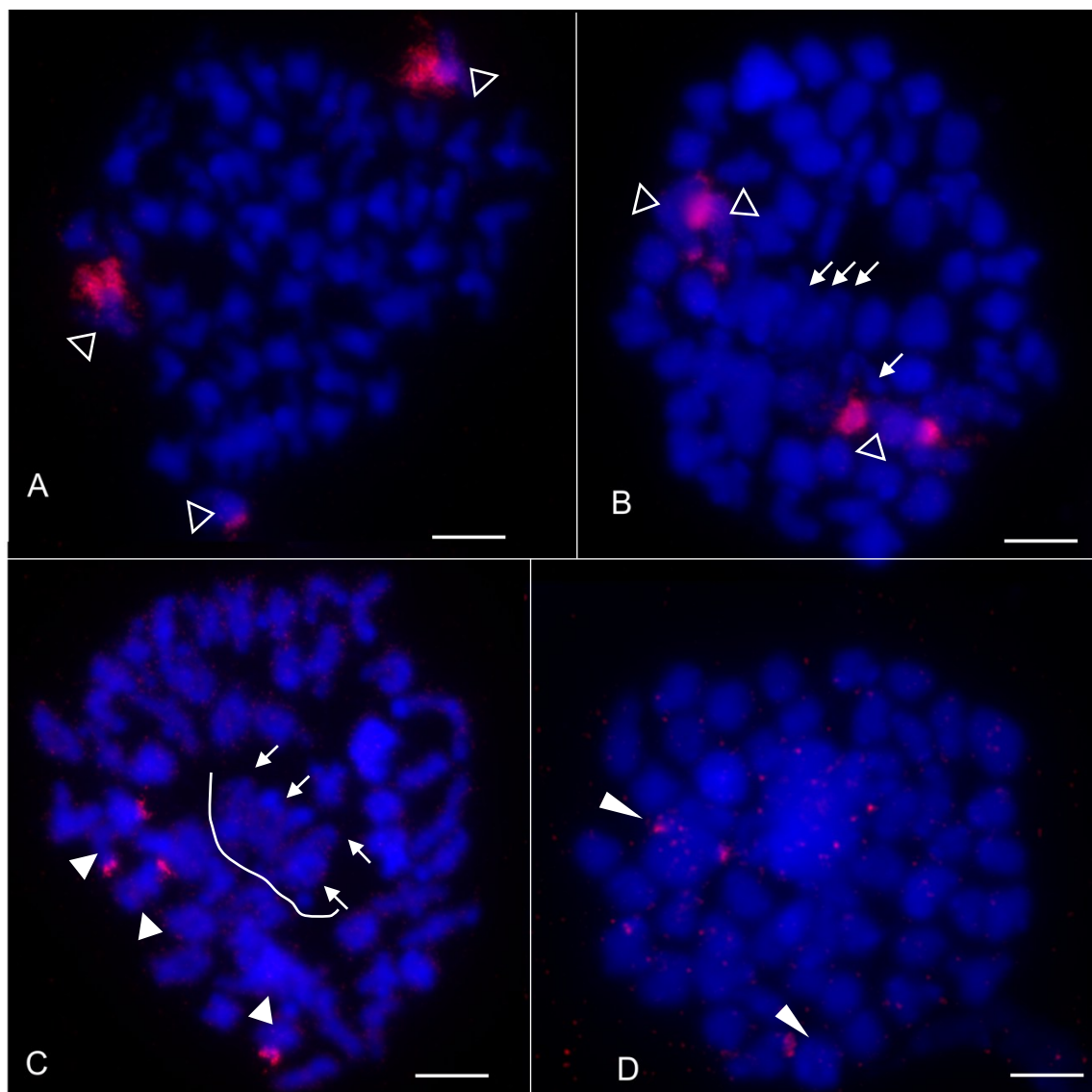
Král *et al.* (2011) uvádza diploidný počet samca 110 chromozómov, z čoho štyri chromozómy sú pohlavné chromozómy X ($X_1X_2X_3X_4$) a SCP. Zastúpenie dvojramenných a jednoramenných chromozómov je takmer rovnaké. Pohlavné chromozómy sú počas diakinézy umiestnené uprostred figúry, kde párujú achiazmaticky.

Moja analýza bola u daného druhu zameraná na vizualizáciu špecifických markerov metódou FISH a analýzu diferenciacie pohlavných chromozómov metódou CGH. Metódou FISH bol vizualizovaný NOR v terminálnej oblasti troch bivalentov v metafáze I (obr. 14 A) a počas diakinézy (obr. 14 B). NOR sa nevyskytuje na pohlavných chromozómoch $X_1 - X_4$ (obr. 14 B).

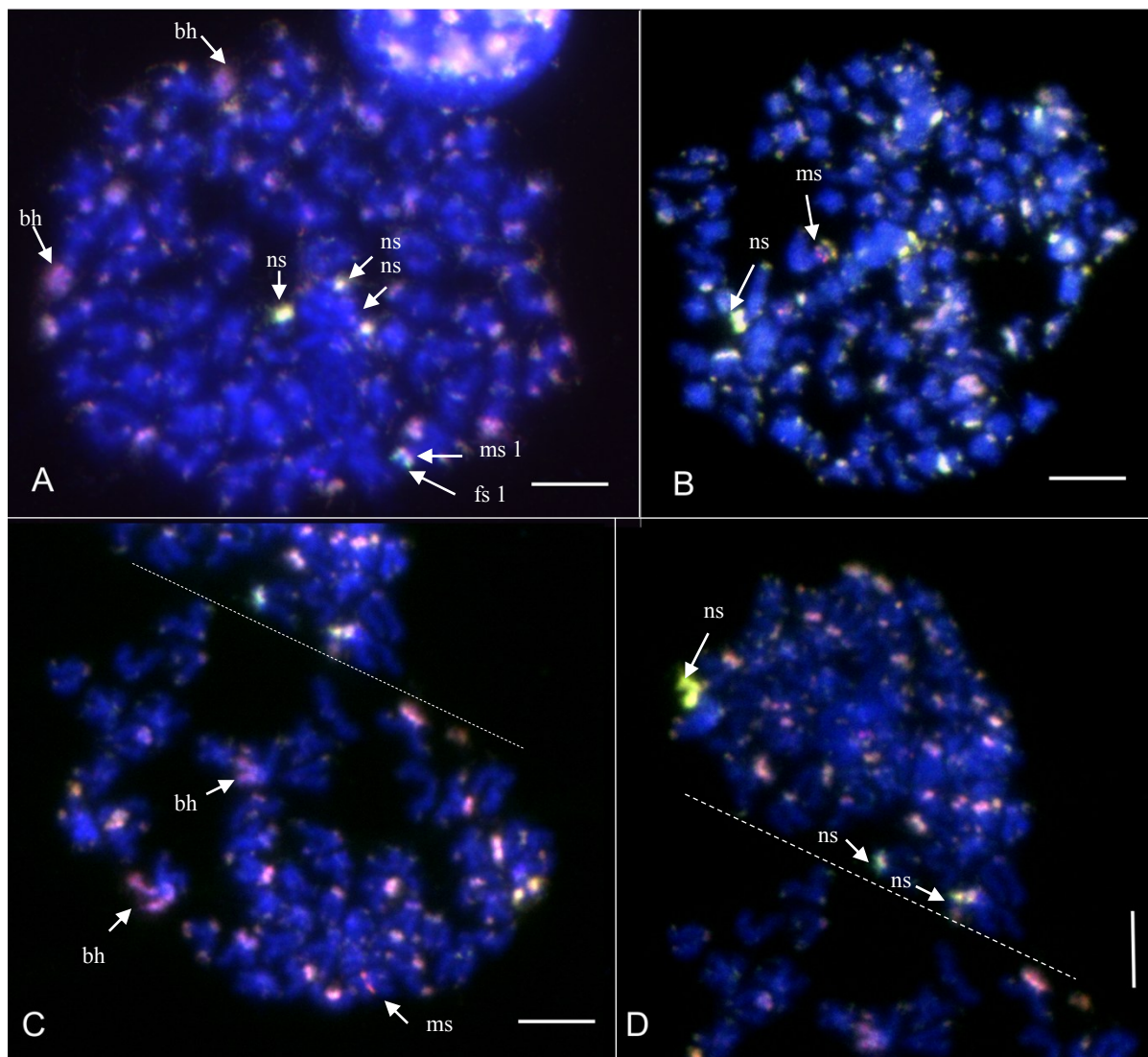
Ďalej bol metódou FISH vizualizovaný marker pre histón H3, ktorý sa v štádiu diakinézy nachádza na troch bivalentoch (obr. 14 C). Marker je v terminálnych oblastiach oboch ramien chromozómového páru a v terminálnej oblasti jedného ramena zvyšných dvoch bivalentov. Uprostred figúry sú pohlavné chromozómy X, na ktorých sa marker nenachádza (obr. 14 C).

Marker pre 5S rRNA sa nachádza na dvoch bivalentoch (obr. 14 D). V porovnaní s predchádzajúcimi markermi je veľkosť klastru podstatne menšia.

Metódou CGH boli vizualizované nešpecifické signály na jednom alebo oboch koncoch chromozómových párov, ktoré vznikli zrejme vyviazaním značného množstva sondy v oblastiach heterochromatínu a prevažuje u nich väčšinou značenie samčou sondou (obr. 15 A, C). Značné množstvo nešpecifických signálov, ktoré vznikli pravdepodobne z rovnakého dôvodu sa vyskytovali v centromerických oblastiach chromozómov (obr. 15 A, B). Počas diakinézy boli pozorované nešpecifické signály na univalentoch X uprostred figúry (obr. 15 A). Na periférii sa nachádza SCP s terminálnym samčím a samičím signálom tesne za sebou (obr. 15 A). Počas metafázy II, boli pozorované dva pohlavné chromozómy X, jeden s veľkým terminálnym nešpecifickým signálom a druhý so samičím signálom (obr. 15 B). Počas metafázy II, v polovici bez X chromozómov, sa nachádzal menší metacentrický chromozóm so samičím signálom (obr. 15 C). V druhej polovici s X chromozómami, tri chromozómy X niesli nešpecifický signál (obr. 15 D).



Obr. 14 Vizualizácia špecifických markerov metódou FISH u samca *Poecilotheria formosa*. A – metafáza II, trojuholníkové šípky: NOR v terminálnych oblastiach troch chromozómov; B – metafáza I, trojuholníkové šípky ukazujú na NOR v terminálnych oblastiach troch bivalentov, šípky uprostred figúry smerujú na pohlavné chromozómy X; C – diakinéza, trojuholníkové šípky: marker pre gény histónu H3 v terminálnych oblastiach troch bivalentov, šípky smerujú na pohlavné chromozómy X uprostred figúry; D – metafáza I, trojuholníkové šípky: marker pre 5S rRNA, šípky ukazujú na marker v terminálnych oblastiach dvoch bivalentov. Merítko 10 μ m.



Obr. 15 Detekcia samčích špecifických signálov na samčích pohlavných chromozómoch metódou CGH u *Poecilotheria formosa*. A – diakinéza; šípky ukazujú na tri nešpecifické signály na univalentoch X uprostred figúry (ns), šípka na periférii ukazuje na SCP s terminálnym samičím (fs 1) a samčím (ms 1) signálom. Chromozómy rady bivalentov nesú na jednom alebo oboch koncoch veľké bloky(bh), do ktorých sa viac vyvážuje samčia sonda; B – metafáza II, šípka ns ukazuje na chromozóm X s veľkým terminálnym nešpecifickým signálom, ďalší chromozóm X nesie samčí signál (ms) a vedľa neho je drobný nešpecifický terminálny signál. Rada chromozómov nesie centromerické alebo telomerické bloky s nešpecifickým signálom; C – metafáza II, polovica bez chromozómov X, so samčím signálom v centromerickej oblasti jedného menšieho metacentrického chromozómu (ms). Niektoré chromozómy nesú veľké terminálne bloky (bh), do ktorých sa viac viaže samčia sonda; D – metafáza II, s chromozómami X, tri chromozómy X nesú nešpecifický signál (ns). Merítko 10 μ m.

Poecilotheria vittata

Z rodu *Poecilotheria* bol analyzovaný tiež druh *Poecilotheria vittata*. Diploidný počet chromozómov u samca je 117. Karyotyp samca je tvorený približne rovnako jednoramennými a dvojramennými chromozómami, dĺžka chromozomových párov sa znižuje rovnomerne (obr. 16 A, B). V mitotickej metafáze bol pozorovaný SCP (obr. 17 A). V pachyténnom štádiu

prvého meiotického delenia boli pozorované dve pozitívne heteropyknotické telieska, pričom jedno je tvorené pohlavnými chromozómami X a druhé SCP (obr. 17 B). V diakinéze bolo pozorovaných 54 bivalentov a 5 univalentov, tvorených pohlavnými chromozómami X, ktoré sa v danej figúre nachádzajú uprostred. Pohlavné chromozómy X₁ až X₅ navzájom achiazmaticky párujú svojimi koncami, tzv. end – to - end párovanie. S pohlavnými chromozómami X asociujú jedným koncom dva heterobivalenty chromozómov (obr. 17 C, D). Morfológia elementov je dobre viditeľná na obr. 17 D: elementy sú tvorené každý jedným dvojamenným a jednoramenným chromozómom. Na elementoch je viditeľná 1 chizma a oblasť centroméry. Heterobivalenty asociujú svojimi koncami s chromozómami X, konce heterobivalentov sú tvorené značne kondenzovaným materiálom. Počas metafázy II, sú viditeľné pohlavné chromozómy X na periférii figúry, ktoré asociujú oboma svojimi koncami a sú značne heteropyknotické (obr. 17 E).

C – pruhovanie bolo prevedené u samca aj samice *Poecilotheria vittata*, u oboch pohlaví počas mitotickej metafázy boli u troch párov chromozómov pozorované obrovské bloky heterochromatínu, ktoré zaujíma celé rameno daných chromozómových párov (obr. 18 A, B). Metódou FISH boli vizualizované nektelé repetitívne usporiadané gény. NOR sa nachádza v terminálnych oblastiach dvoch bivalentov (obr. 19 A). Gény pre históny H3 sa nachádzajú v terminálnej oblasti troch chromozómových párov na jednom z ramien (obr. 19 B). Metódou FISH boli vizualizované aj gény pre 5S rRNA, ktoré sa nachádzajú na oboch koncoch dvoch bivalentov (obr. 19 C, D).

Sekvencia časti génu pre histón H3 *Poecilotheria vittata*, ktorá bola použitá ako sonda pri FISH, je z 95, 59 % zhodná so sekvenciou časti génu pre histón H3 vtáčkara *Poecilotheria subfusca*; GenBank: MG 273558.1 (Lüddecke *et al.* 2017).

Sekvencia úseku génu pre histón H3, ktorý bol použitý ako sonda pri FISH u samcov rodu *Poecilotheria*:

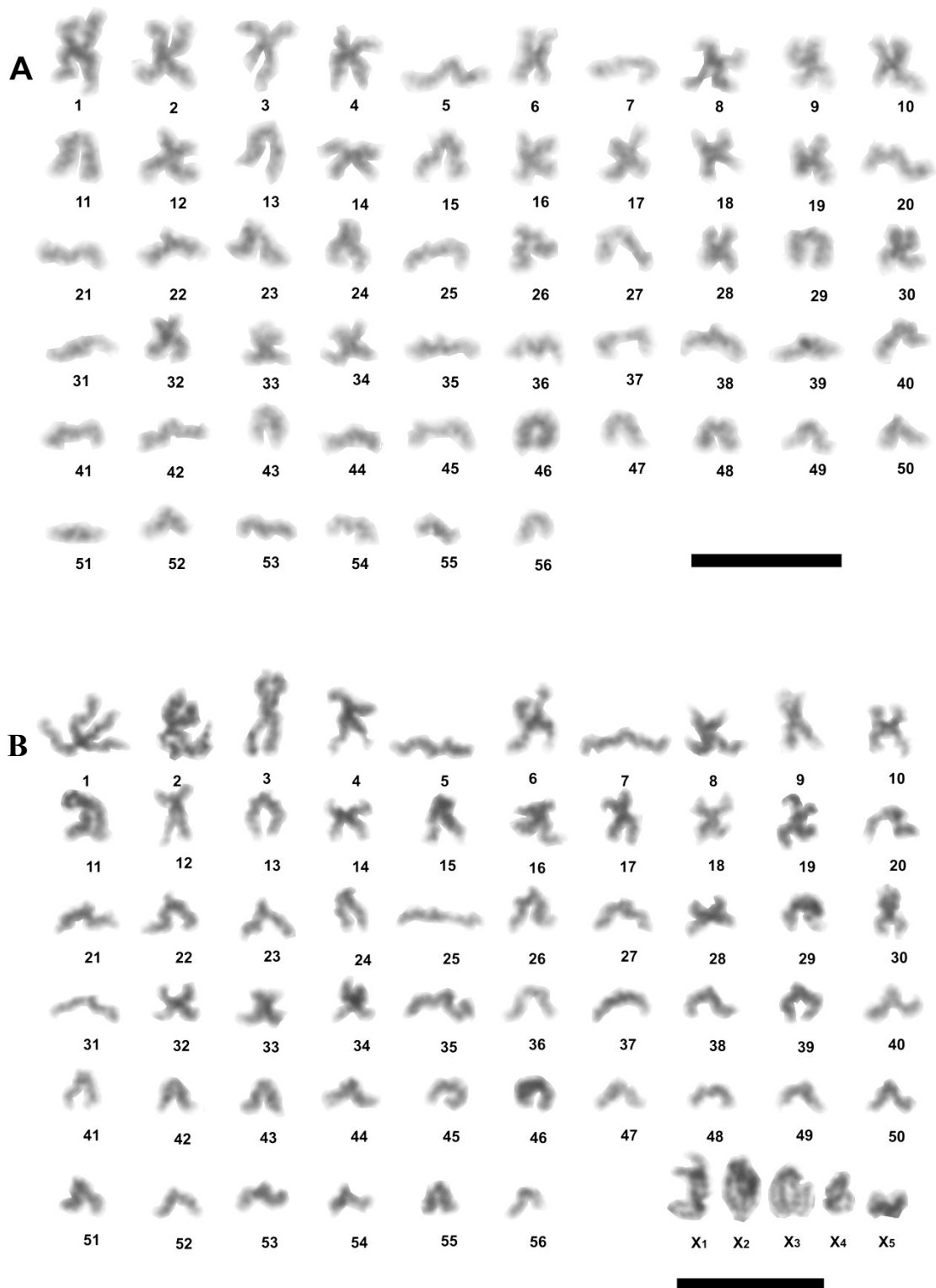
```
ACTCTCTGTGCGTGAATGAGCGMAGAGATTGRTGTCTTCKAAGAGGCCA
ACGAGGTAAGCMTCGCTAGCTTCTTGAAGTGCCATGACAGCAGAGCTCT
GGAAACGAAGATCAGTCTTAAAGTCTTGGGCGATTTCTCGGACCAAGCG
CTGGAAAGGTAGTTTCTGATGAGCAGWTCCGTGGATTTCTGGTAACGA
CGGATCTCACGAAGTGCCACAGTTCCGGGCCTGTAGCGATGAGGTTYTTT
TACGCCTCCAGTGGCACGGGGCACTTTTCTTGCTGCCTCGTGTGAGCT
```

Sekvencia časti génu pre 5S rRNA *Poecilotheria vittata*, ktorá bola použitá ako sonda pri FISH, je z 95, 16 % zhodná so sekvenciou časti génu pre 5S rRNA *Oxyopes sertatus*; GenBank: AB586890.1 (Suzuki a Kubota 2011).

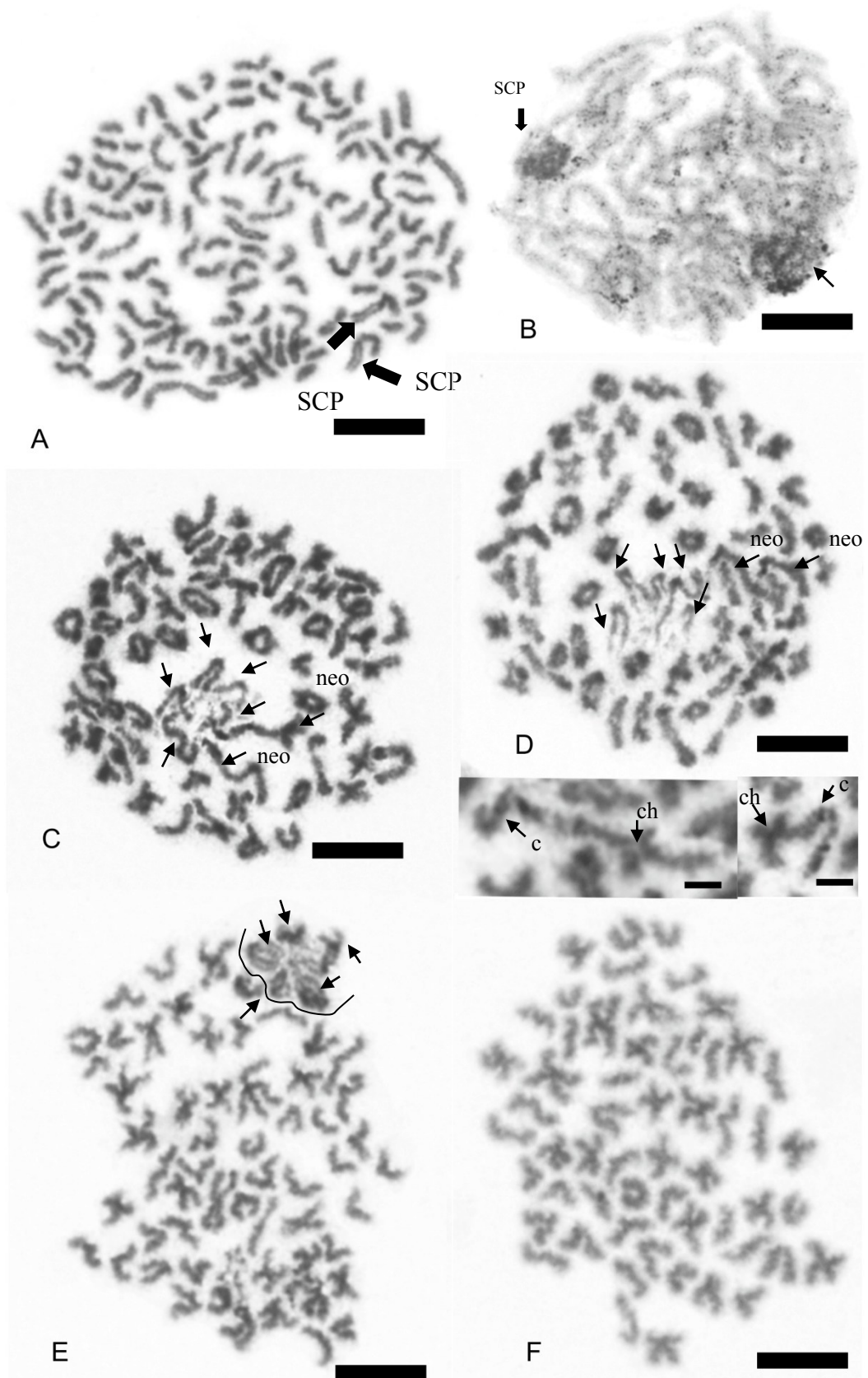
Sekvencia úseku génu pre 5S rRNA, ktorý bol použitý ako sonda pri FISH u samcov rodu *Poecilotheria*:

```
CAGCATCGGGCGCGGTCAGTACCTGGGAGGGTGACCACCTGGGAACAC
CGCGTGCCGTTGGCTTCGCTTCGGTGATCGGAACGAGAACCGGTGCTCT
CAACGTGGTATGGACGTTG
```

Metódou CGH bola študovaná diferenciácia pohlavných chromozómov u samca *Poecilotheria vittata*. Počas neúplnej mitotickej metafázy boli pozorované dva chromozómy s výrazným blokom heterochromatínu na jednom ramene, ktoré obsahovali rôzne zastúpenie samčej a samičej sondy. U jedného chromozómu bola väčšina tohoto úseku značená samičou sondou a malá časť slabou samčou sondou, u druhého chromozómu to bolo naopak (obr. 20 A). Počas mitotickej metafázy aj meiotickej metafázy I sa objavoval jeden chromozóm, ktorý niesol nešpecifický signál v centromerickej oblasti (obr. 20 A, B; b - bivalent). Počas pachyténneho štádia boli pozorované dve heteropyknotické telieska, jedno pravdepodobne tvorené pohlavnými chromozómami X a druhé SCP. V blízkosti jedného z nich sa nachádza útvar značený samičou sondou (obr. 20 C). Počas metafázy II sa chromozómy s výrazným samičím signálom nachádzajú vo figúre s chromozómami X (obr. 20 C). Metafáze II s chromozomy Y neobsahuje chromozómy so špecifickým samčím ani samičím signálom (obr. 20 D).

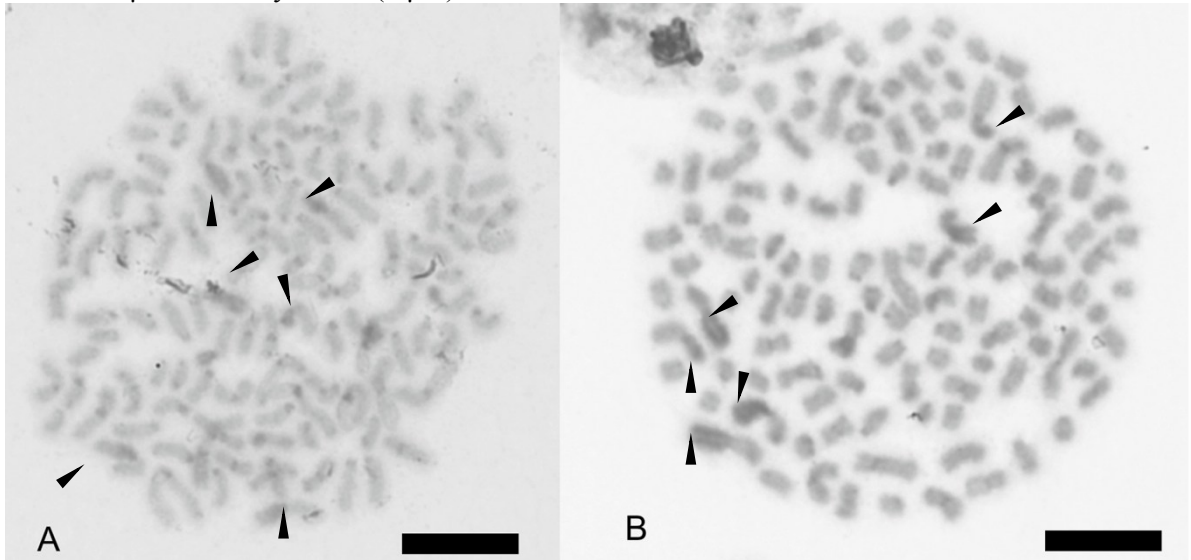


Obr. 16 Dva haploidné komplementy samca *Poecilotheria vittata*. Komplet neobsahuje pohlavný chromozóm Y (A) a dva pohlavné chromozómy X (B). Zostavený z dvoch sesterských metafáz II. Merítok 10 μ m.

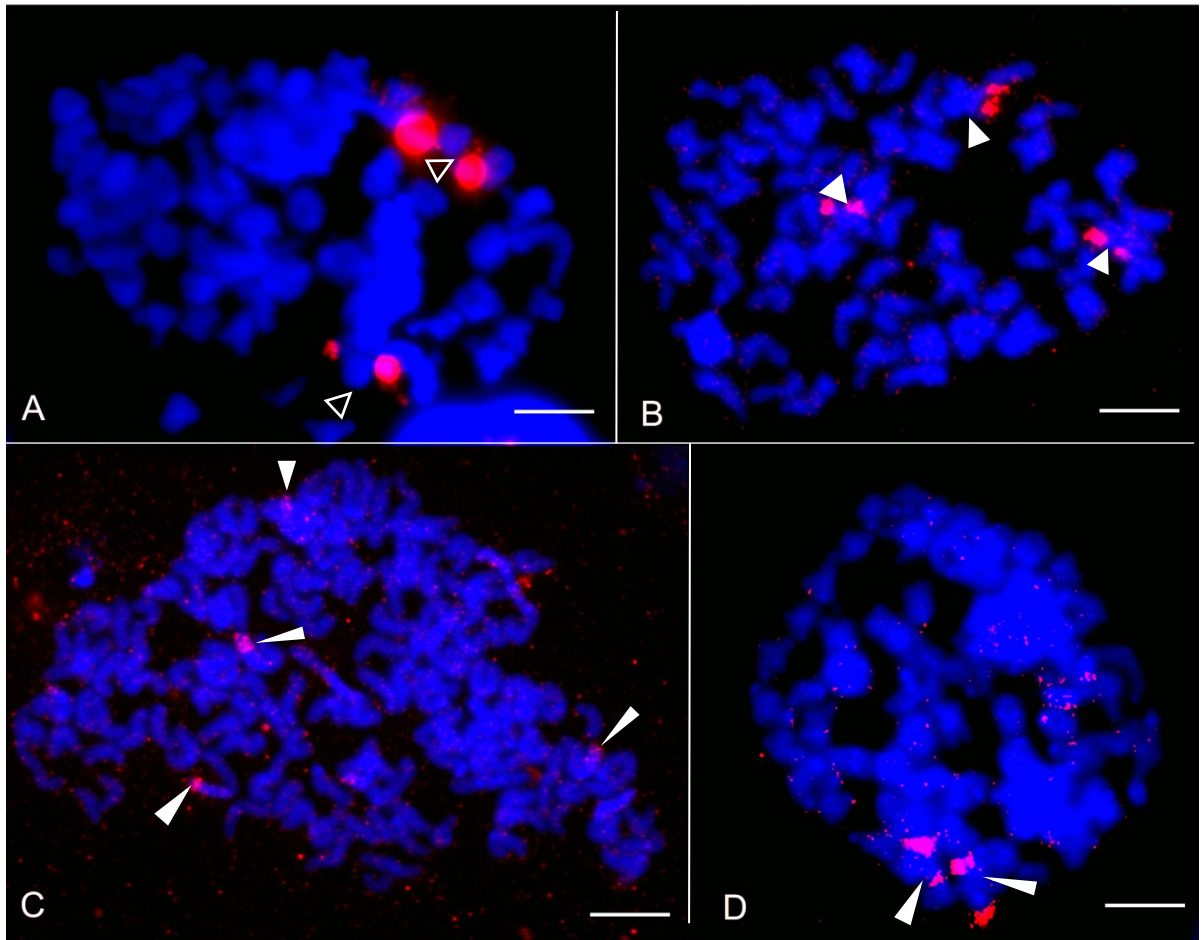


Obr. 17 Analýza mitózy a meiózy u samca *Poecilotheria vittata*. A – mitotická metafáza, tučná šípka – pravdepodobne chromozómy SCP; B – pachyténne, tučná šípka smeruje na heteropyknotické teliesko tvorené pravdepodobne SCP, šípka smeruje na heteropyknotické teliesko tvorené pravdepodobne pohlavnými chromozómami X; C – diploténne, šípky smerujú na univalenty X, šípky označené neo smerujú na heterobivalenty tvorené neo-pohlavnými chromozómami X a Y. Konce

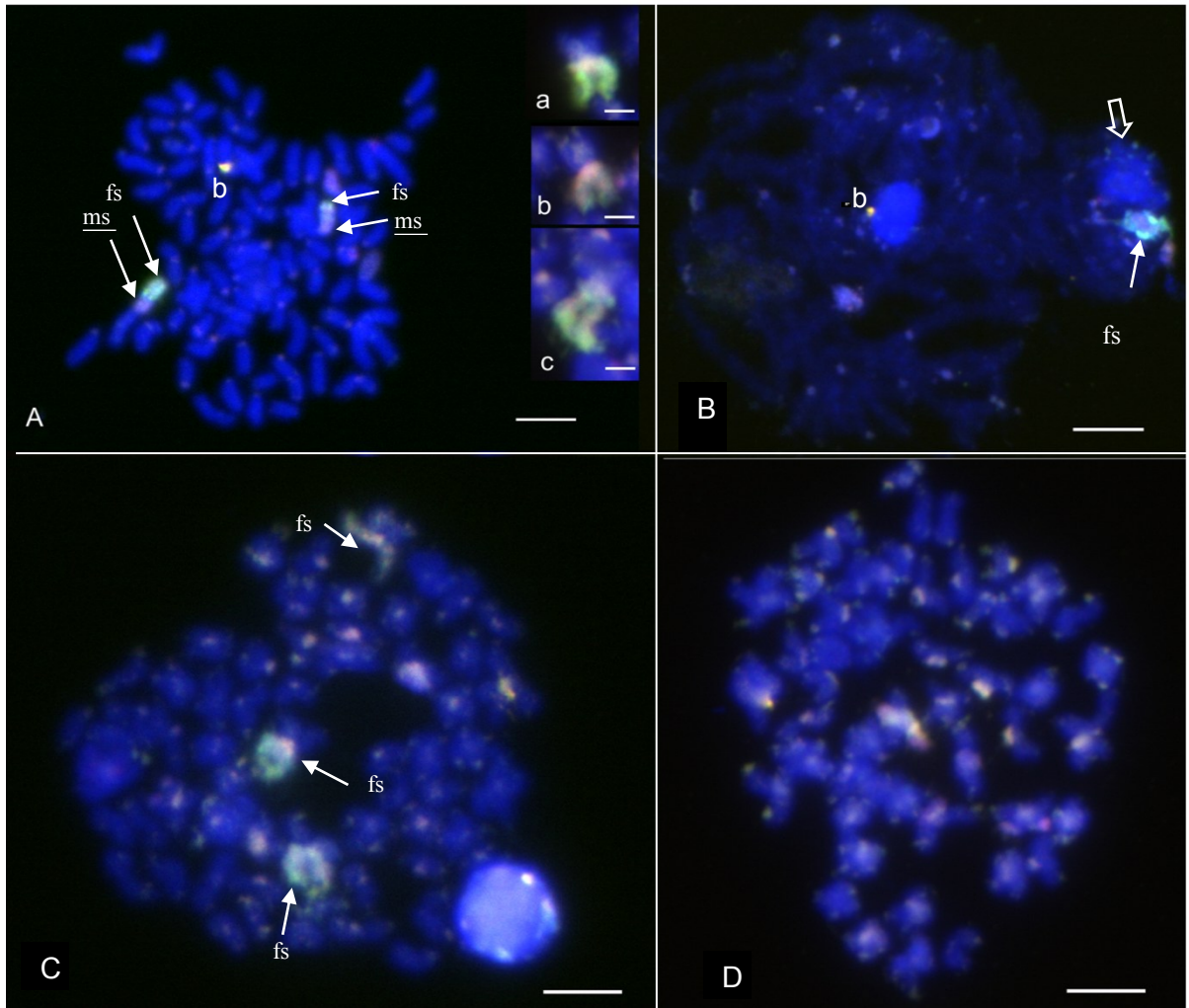
heterobivalentu asociujúce s chromozómami X sú sýtejšie zfarbené, čo odráža ich väčšiu kondenzáciu; D - diakinéza, šípky smerujú na univalenty X, šípky označené neo smerujú na heterobivalenty tvorené neo-pohlavnými chromozómami X a Y; Výrez: bivalenty tvorené neopohlavnými chromozómami z inej diakinézy, značenie: c - centromera, ch - chiazma, šípkami označený chromozóm X a Y; E - metafáza II, figúra s pohlavnými chromozómami X; F - metafáza II, figúra s chromozómami Y. Merítko 5 μm okrem výrezu D (2 μm).



Obr. 18 C – pruhovanie *Poecilotheria vittata*. A – mitotická metafáza, samec, šípky ukazujú na veľké bloky heterochromatínu; B – mitotická metafáza, samica, šípky ukazujú na veľké bloky heterochromatínu. Merítko 10 μm .



Obr. 19 Vizualizácia špecifických markerov metódou FISH u samca *Poecilotheria vittata*. A – marker pre 18S rRNA, diakinéza, trojuholníkové šípky ukazujú na dva signály, každý odpovedá jednému bivalentu s NOR lokusom; B – marker pre histón H3, metafáza II, trojuholníková šípka: lokusy pre H3 v terminálnych oblastiach troch chromozómov; C – marker pre 5S rRNA, mitotická metafáza, šípky ukazujú lokus v terminálnych oblastiach štyroch chromozómov; D – marker pre 5S rRNA, diakinéza, šípky ukazujú na dva bivalenty s NOR. Merítko 10 μ m.



Obr. 20 Detekcia špecifických signálov na pohlavných chromozómoch metódou CGH, samec *Poecilotheria vitata*. A – neúplná mitotická metafáza, dva chromozómy nesú bloky heterochromatínu so samičím (fs) a slabým samčím (ms) špecifickým signálom, vo figúre je tiež chromozóm s nešpecifickým centromerickým signálom (b). Výrezy z metafázy II s chromozómami X (a, b, c) – tri veľké metacentrické chromozómy s rôznym zastúpením samčieho a samičieho signálu na jednom ramienku; B – pachyténne, v blízkosti jedného heteropyknotického telieska (tučná šípka) leží zvláštne teliesko so samičími signálmi (fs); C - metafáza II s pohlavnými chromozómami X, u troch chromozómov na jednom ramienku prevažuje samičí signál (fs), všimnite si tiež chromozóm s nešpecifickým signálom v centromerickej oblasti (b); D – metafáza II s pohlavným chromozómom Y. Merítko 10 μm okrem výrezov v obr. A (merítko 5 μm).

Psalmopoeus irminia

Do čeľade Theraphosidae patrí i druh *Psalmopoeus irminia*, ktorého samčí diploidný počet je 82. V karyotype môžeme pozorovať 40 párov chromozómov a 2 pohlavné chromozómy X (obr. 21). V karyotype prevažujú dvojramenné chromozómy (21 metacentrických, 9 submetacentrických. Zvyšných 12 chromozómových párov sú jednoramenné chromozómy, 3 páry sú subtolocentrické, ostatné akrocentrické (tab. 7, obr. 21).

Počas mitózy môžeme detegovať dva páry metacentrických SCP približne rovnakej veľkosti (obr. 22 A). Jedno SCP je pozitívne heteropyknotické v prvom meiotickom delení (diploténne – metafáza I, vid' obr. 22 B, C, D). Pohlavné chromozómy X sú od seba morfológicky rozlišiteľné. Chromozóm X₁ patrí medzi metacentrické chromozómy a je podstatne väčší ako chromozóm X₂, ktorý je submetacentrický (tab. 7, obr. 21). Pozitívna heteropyknóza týchto chromozómov nie je zjavná vo všetkých meiotických etapách. Možno ich odlíšiť od ostatných chromozómov počas diakinézy, kedy sú lokalizované uprostred jadra (obr. 22 B, C). V tejto fáze párujú achiazmaticky svojimi koncami, jedná sa o typický prípad tzv. end-to-end párovania.

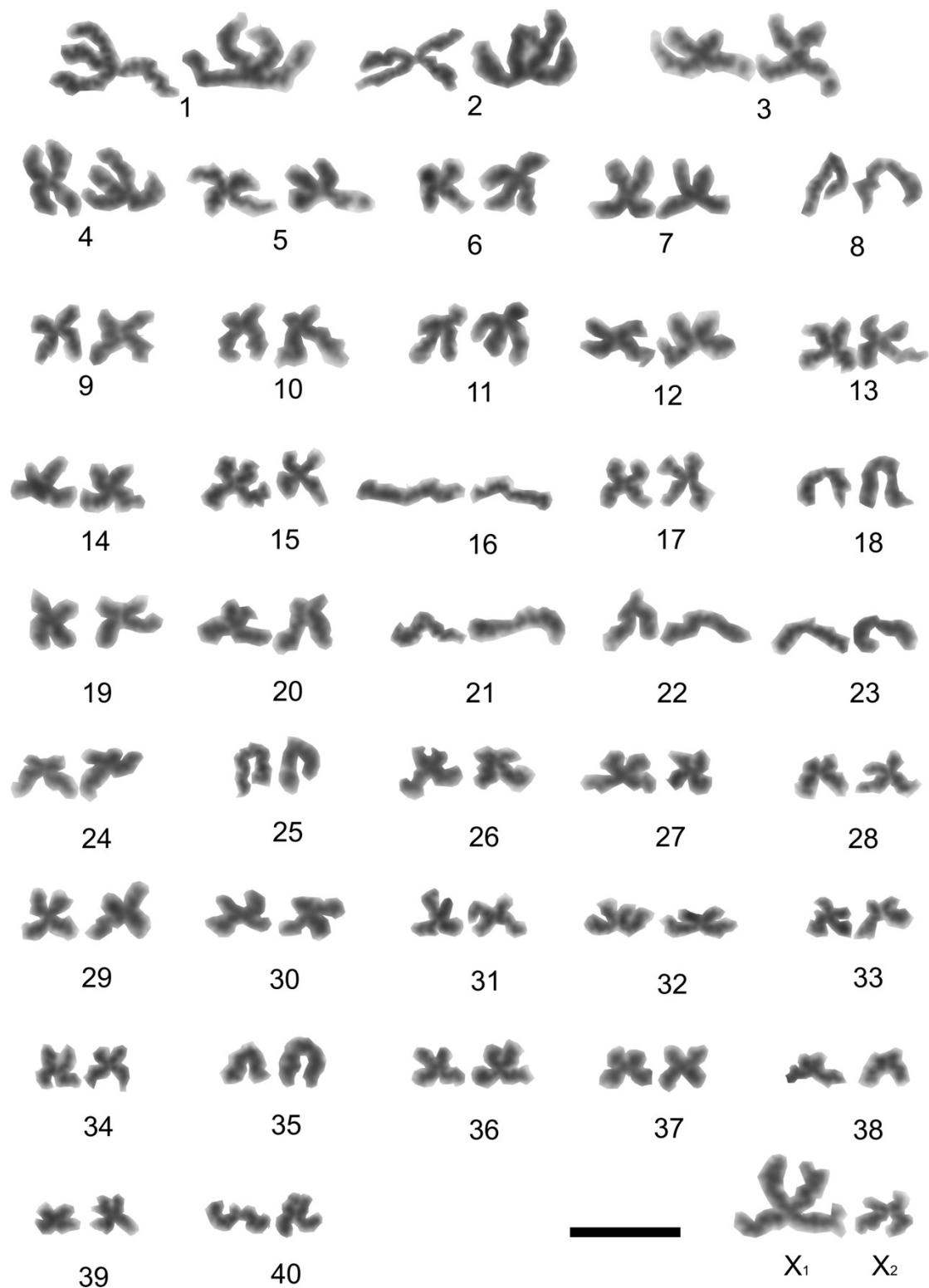
Frekvencia chiazmat je 1, 09 a bola nameraná z 8 figúr v diploténnom štádiu a diakinéze. Vo figúrach sa vyskytovali bivalenty s jednou alebo dvomi chiazmami.

Metódou FISH bol detegovaný NOR na konci metacentrického chromozómového páru (obr. 23 C, D).

Metódou CGH boli detegované slabé samičie signály v centromerických oblastiach pohlavných chromozómov X (obr. 23 A). Výrazný samičí signál sa objavil v terminálnej oblasti SCP (obr. 23 A, B).

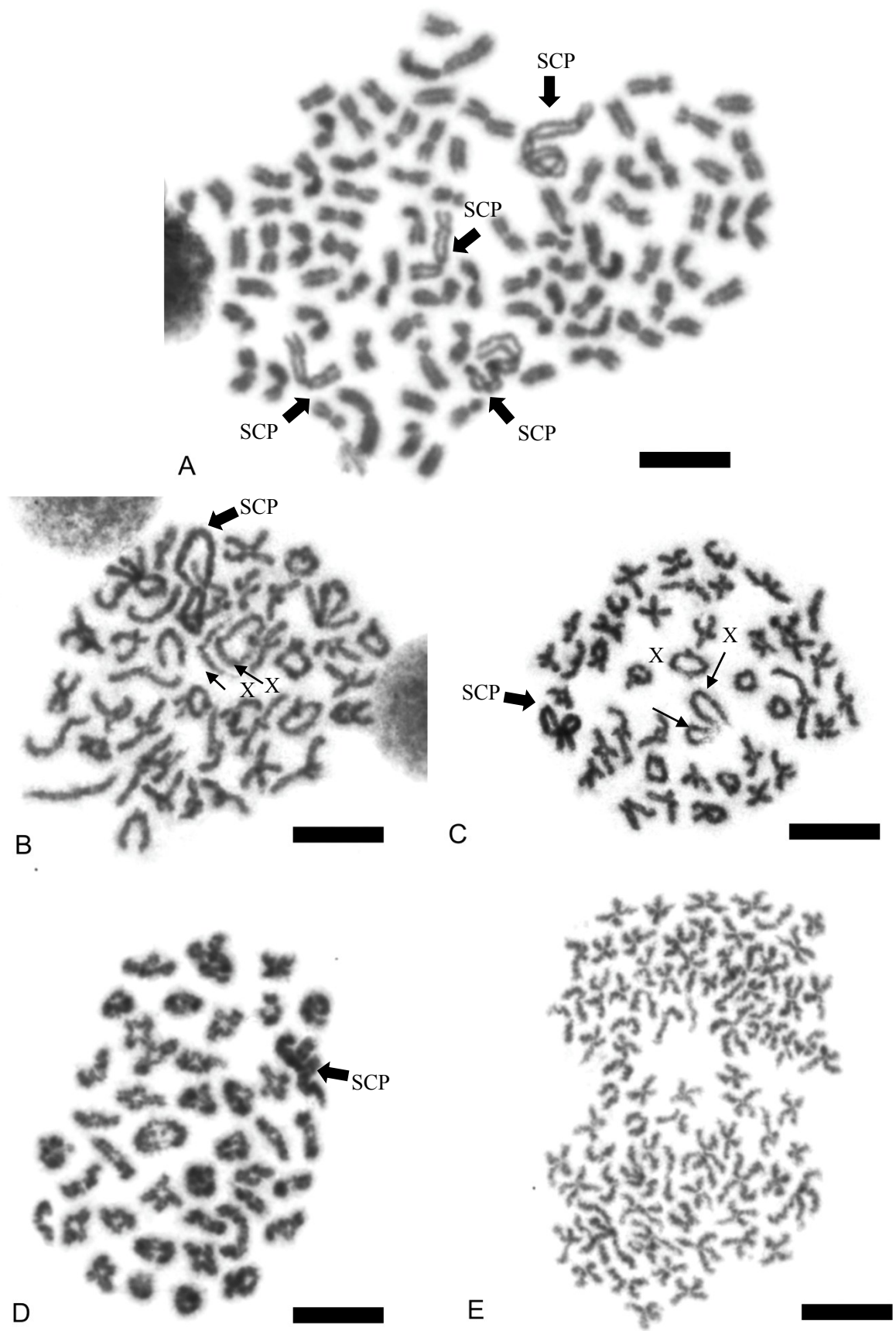
Pár.č./gonozóm	Priemerná relatívna chromoz. dĺžka/št.odchyľka	Priemerný centromer. index	Morfolog. typ
1.	5,14 ($\pm 0,264$)	1,09	m
2.	4,35 ($\pm 0,252$)	1,06	m
3.	3,77 ($\pm 0,241$)	2,38	sm
4.	3,41 ($\pm 0,198$)	1,19	m
5.	3 ($\pm 0,196$)	1,43	m
6.	2,84 ($\pm 0,187$)	1,34	m
7.	2,82 ($\pm 0,184$)	1,45	m
8.	2,62 ($\pm 0,157$)	∞	a
9.	2,53 ($\pm 0,155$)	1,41	m
10.	2,45 ($\pm 0,139$)	3,19	st
11.	2,42 ($\pm 0,136$)	1,87	sm
12.	2,42 ($\pm 0,126$)	1,52	m
13.	2,4 ($\pm 0,125$)	1,23	m
14.	2,37 ($\pm 0,123$)	1,24	m
15.	2,36 ($\pm 0,115$)	1,84	sm
16.	2,35 ($\pm 0,113$)	∞	a
17.	2,34 ($\pm 0,097$)	1,41	m
18.	2,33 ($\pm 0,093$)	∞	a
19.	2,32 ($\pm 0,08$)	1,54	m
20.	2,28 ($\pm 0,076$)	2,33	sm
21.	2,27 ($\pm 0,067$)	∞	a
22.	2,25 ($\pm 0,065$)	∞	a
23.	2,2 ($\pm 0,063$)	∞	a
24.	2,2 ($\pm 0,063$)	6,40	st
25.	2,18 ($\pm 0,063$)	∞	a
26.	2,12 ($\pm 0,06$)	2,21	sm
27.	2,11 ($\pm 0,052$)	1,12	m
28.	2,1 ($\pm 0,048$)	1,78	sm
29.	2,1 ($\pm 0,047$)	1,09	m
30.	2,09 ($\pm 0,04$)	1,19	m
31.	2,04 ($\pm 0,04$)	1,40	m
32.	2,04 ($\pm 0,039$)	1,71	sm
33.	2 ($\pm 0,036$)	1,83	sm
34.	1,97 ($\pm 0,034$)	1,22	m
35.	1,9 ($\pm 0,034$)	∞	a
36.	1,9 ($\pm 0,029$)	1,50	m
37.	1,84 ($\pm 0,029$)	1,46	m
38.	1,78 ($\pm 0,026$)	6,89	st
39.	1,67 ($\pm 0,026$)	1,06	m
40.	1,66 ($\pm 0,019$)	∞	a
X ₁	1,95 ($\pm 0,038$)	1,13	m
X ₂	1,07 ($\pm 0,057$)	2,21	sm

Tab. 7 Charakteristika diploidnej sady samca *Psalmopoeus irminia*. Namerané z 5 metafáz II.



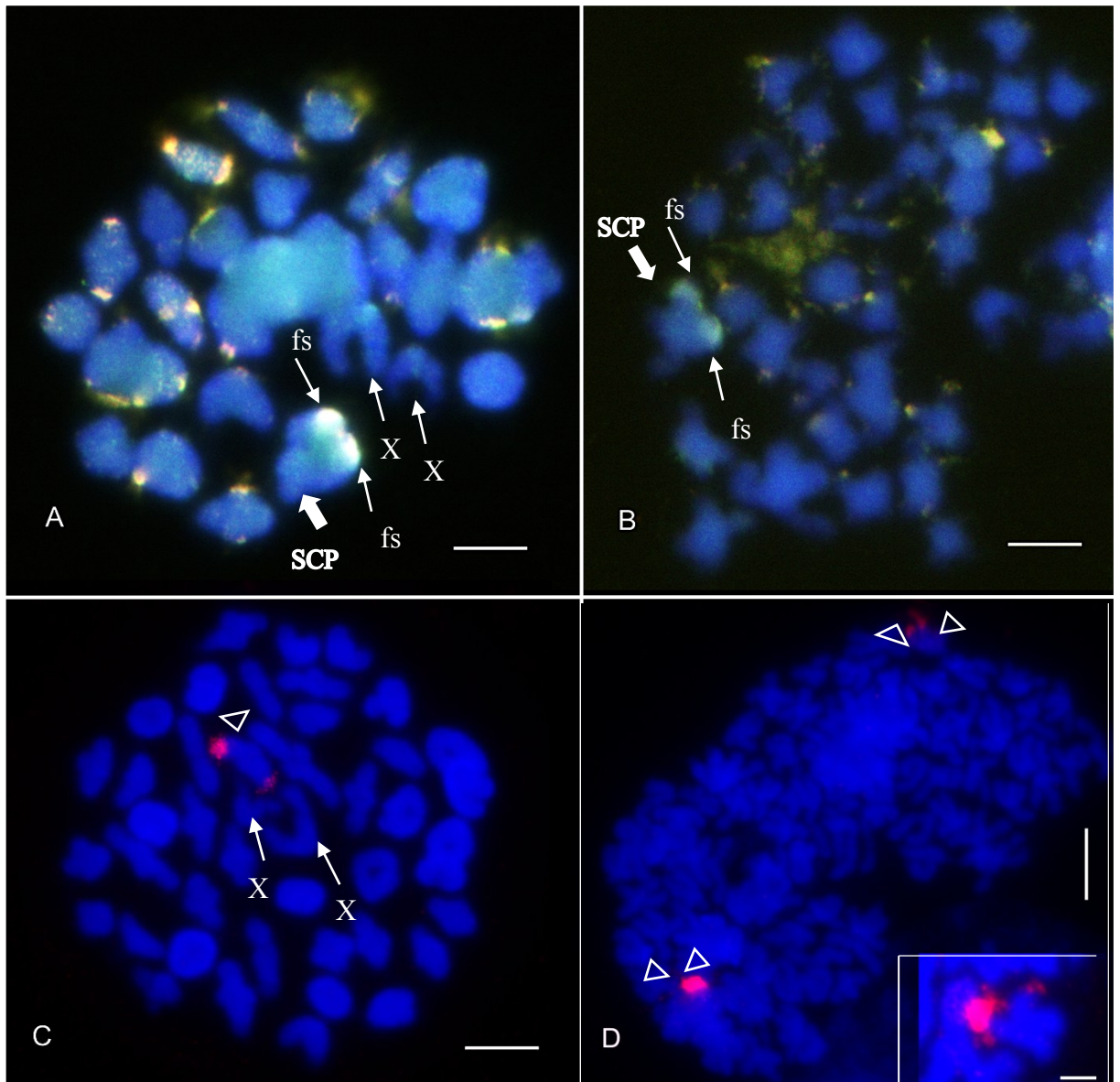
Obr. 21 Karyogram samca *Psalmopoeus irminia*. Zostavený zo sesterských metafáz II.

Merítko 10 μ m.



Obr. 22 Analýza mitózy a meiózy samca *Psalmopoeus irminia*. A – mitotická metafáza, šípky ukazujú na chromozómy SCP; B - diploténne, šípky ukazujú na pohlavné chromozómy X, tučná šípka ukazuje na SCP; C – diakinéza, šípky uprostred figúry ukazujú na pohlavné chromozómy X, tučná

šípka na periférii figúry ukazuje na SCP; D – metafáza I, šípka ukazuje na SCP; E – spojené sesterské metafázy II. Merítko 5 μm .



Obr. 23 Samec *Psalmopoeus irminia*, detekcia špecifických signálov na pohlavných chromozómoch metódou CGH a detekcia NOR metódou FISH. A – diakinéza, CGH, šípky ukazujú na dva pohlavné chromozómy X so samičím signálom v centromerickej oblasti; tučná šípka ukazuje na SCP s výrazným samičím signálom (fs) v terminálnej oblasti; B – metafáza II, CGH, tučná šípka ukazuje na SCP s výrazným samičím signálom (fs) v terminálnej oblasti; C – diakinéza, FISH; trojuholníkové šípky ukazujú na signály NOR v terminálnej oblasti bivalentu, šípky ukazujú na X chromozómy; D – spojené sesterské metafázy II, FISH, trojuholníkové šípky ukazujú na terminálny NOR na jednom chromozómovom páre. Výrez – NOR v terminálnej oblasti ramien metacentrického chromozómu. Merítko 10 μm .

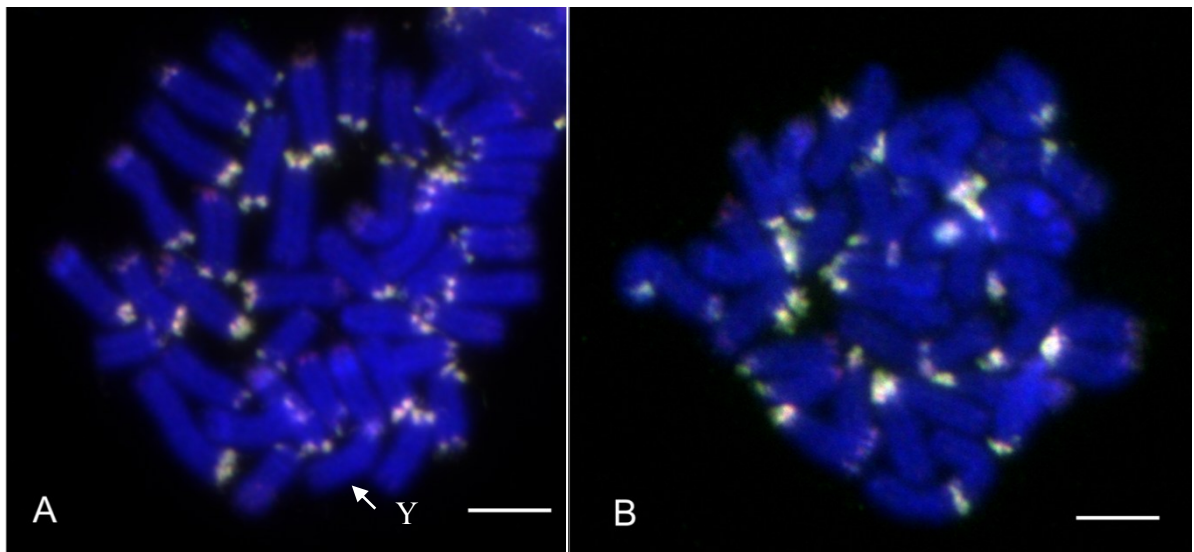
4.2 Entelegynae

4.2.1 Agelenidae

Tegenaria ferruginea

Diploidný počet samca je $2n\sigma^{\uparrow} = 40$ chromozómov. V karyotype prevládajú akrocentrické chromozómy, ktorých je 39, najväčší chromozóm je metacentrický. *Tegenaria ferruginea* má komplikovaný pohlavný chromozómový systém $X_1X_2X_3X_4X_5Y$. U samcov sa vyskytuje nepárový metacentrický chromozóm Y a päť akrocentrických pohlavných chromozómov X. V samčej meióze sa vyskytujú tri univalenty X_1 , X_2 a X_3 rôznej veľkosti. Univalenty párujú s trivalentom, ktorý je tvorený akrocentrickými chromozómami X_4 a X_5 a metacentrickým Y chromozómom (Kráľ 2007).

Metóda CGH odhalila silné telomerické a centromerické žltkasté signály, ktoré vznikli zrejme vyviazaním značného množstva samčej a samičej sondy v oblastiach heterochromatínu, ktorý sa vyznačuje vyššou kondenzáciou (obr. 24 A, B). Metacentrický Y chromozóm, nemá špecifický samčí signál, slabý signál v centromerickom heterochromatíne vznikol opäť spoločným vyviazaním samčej a samičej sondy (obr. 24 A).



Obr. 24 Detekcia špecifických signálov na pohlavných chromozómoch metódou CGH. A – mitotická metafáza, šípka ukazuje na metacentrický pohlavný chromozóm Y bez špecifického samčieho signálu; B – metafáza I. Merítko 10 μm .

4.3 Haplogynae

4.3.1 Filistatidae

Kukulcania aff. hibernalis

U samca daného druhu bol stanovený počet chromozómov $2n_{\sigma^7}=25$. V karyotype sa vyskytuje 11 chromozómových párov, ktoré sú dvojramenné a dva pohlavné chromozómy X a Y. Z morfológického hľadiska patria všetky chromozómové páry medzi metacentrické chromozómy, okrem chromozómového páru č. 10, ktorý patrí medzi submetacentrické chromozómy (tab. 8, obr. 25). Prvé dva chromozómové páry sú omnoho dlhšie ako nasledujúce, od tretieho páru sa dĺžka chromozómov znižuje rovnomernejšie (tab. 8). Pohlavné chromozómy X sú taktiež metacentrické, pričom Y chromozóm predstavuje malý element, ktorého presnú morfológiu nebolo možné určiť. Počas samčej profázy a metafázy I chromozómy X achiazmaticky párujú koncami oboch ramien s Y chromozómom a tvoria tak trivalent (obr. 26 A). Počas metafázy I, anafázy I a metafázy II (obr. 26 B, 27 B, D) vykazujú X chromozómy špecifickú morfológiu, tým že udržujú svoje ramená pri sebe. Chromozómy X spolu taktiež asociujú a vyskytujú sa na periférii figúry (obr. 26 B).

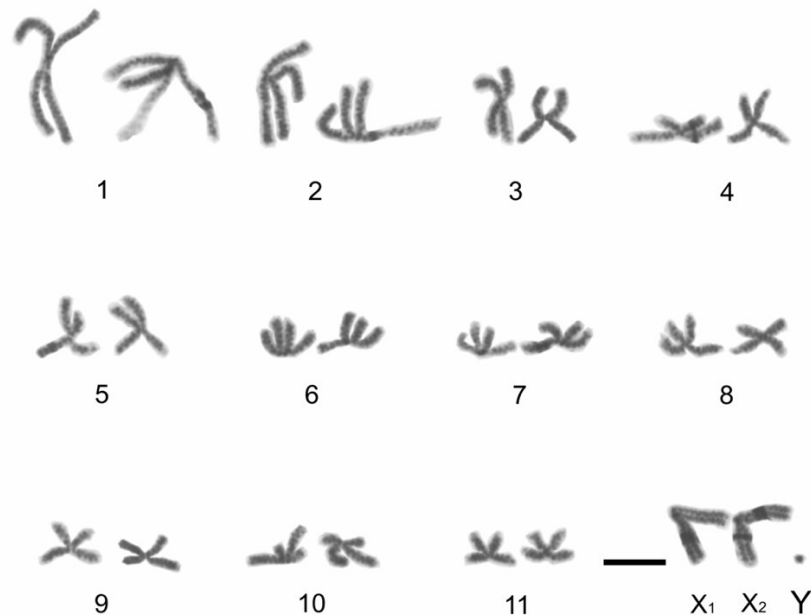
Frekvencia chiazmat bola nameraná z 5 figúr v štádiu diakinézy. Jej výsledná hodnota 1,00 znamená, že sa vyskytovali iba bivalenty s jednou chiazmou.

Metódou FISH bol detegovaný terminálny NOR lokus na jednom ramienku stredne veľkého metacentrického chromozómového páru. V tomto prípade môžeme vylúčiť jeho prítomnosť na pohlavných chromozómoch X a Y (obr. 27 D).

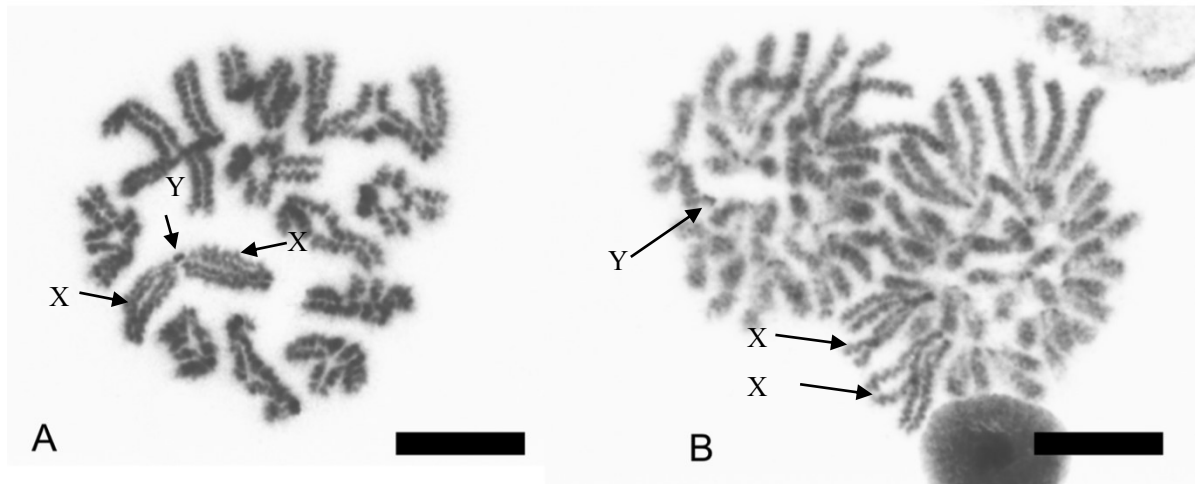
Metódou CGH bol detegovaný pohlavný chromozóm Y, ktorý bol celý vizualizovaný samčou sondou. Pohlavné chromozómy X sú bez špecifického samičieho signálu. Silné nažltnuté signály v terminálnych oblastiach jedného alebo oboch ramienok chromozómov vznikli zrejme vyviazaním značného množstva samčej a samičej sondy v heterochromatíne, ktorý sa vyznačuje vyššou kondenzáciou než ostatný heterochromatín (obr. 23 A, B, C).

Pár.č./ gonozóm	Priemerná relatívna chromoz. dĺžka/ št. odchylka	Priemerný centromer. index	Morfolog. typ
1.	16,4 (±0,038)	1,38	m
2.	12,86 (±0,015)	1,15	m
3.	9,37 (±0,013)	1,22	m
4.	7,2 (±0,019)	1,19	m
5.	6,85 (±0,023)	1,06	m
6.	6,62 (±0,039)	1,13	m
7.	6,38 (±0,038)	1,10	m
8.	6,27 (±0,022)	1,16	m
9.	5,87 (±0,017)	1,11	m
10.	5,67 (±0,022)	1,72	sm
11.	5,14 (±0,028)	1,31	m
X ₁	5,7 (±0,038)	1,06	m
X ₂	5,31 (±0,057)	1,17	m
Y	0,34 (±0,002)		

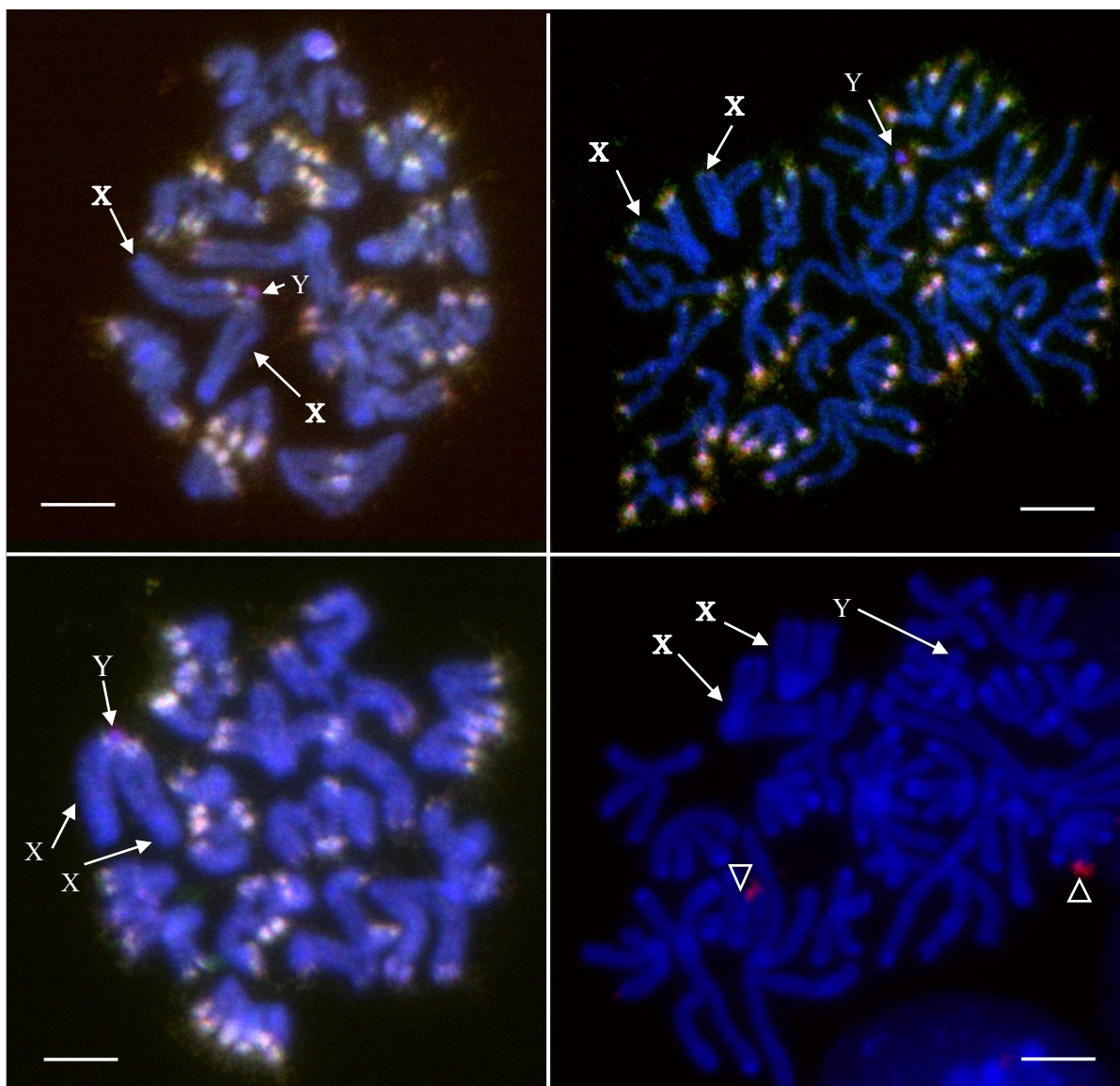
Tab. 8 Charakteristika diploidnej sady samca *Kukulcania aff. hibernalis*. Namerané z 5 figúr, tvorených dvoma sesterskými metafázami II.



Obr. 25 Karyogram samca *Kukulcania aff. hibernalis*. Zostavený ze dvoch sesterských metafáz II. Merítok 10 µm.



Obr. 26 *Kukulcania aff. hibernalis*, analýza samčej meiózy. A – metafáza I, trivalent predstavuje achiasmatické párovanie dvoch pohlavných chromozómov X (označené šípkou) a Y chromozómu (označený šípkou); anafáza I, šípka v ľavej polovici anafázy ukazuje na Y chromozóm, šípky v pravej polovici ukazujú na pohlavné chromozómy X. Merítko 5 μ m.



Obr. 27 Samec *Kukulcania aff. hibernalis*, detekcia špecifických signálov na pohlavných chromozómoch metódou CGH a detekcia NOR metódou FISH. A – metafáza I, šípky X ukazujú na pohlavné chromozómy X, šípka Y označuje Y chromozóm celý vizualizovaný samčou sondou; B – spojené sesterské figúry metafázy II, šípky X smerujú na X chromozómy v jednej sesterskej figúre, šípka Y označuje Y chromozóm celý vizualizovaný samčou sondou v druhej polovici; C - metafáza I, šípky X ukazujú na pohlavné chromozómy X, šípka Y označuje Y chromozóm celý vizualizovaný samčou sondou; D – spojené sesterské figúry metafázy II, trojuholníkové šípky označujú prítomnosť NOR v terminálnej oblasti dlhého ramienka metacentrického chromozómu, šípky ukazujú na pohlavné chromozómy X a Y. Merítko 10 μ m.

5 Diskusia

Pavúky (Araneae) patria medzi živočíchmi, ktorých cytogenetika sa v poslednej dobe začína intenzívne študovať, jedná sa predovšetkým o ich neobvyklé pohlavné chromozómy. Z cytogenetického hľadiska sú stále pomerne málo prebádané (Araújo *et al.* 2012). Ich ohromné druhové rozmanitosti zodpovedajú rozmanitosti ich karyotypov. Jednotlivé druhy majú často rôzne diploidné počty chromozómov, ich chromozómy sa často morfológicky líšia. Ich systémy pohlavných chromozómov, bez výnimky sú tiež veľmi komplikované. Moja práca bola zameraná predovšetkým na analýzu pohlavných chromozómov a repetitívne usporiadaných génov. Jednalo sa o 7 druhov mygalomorfných pavúkov z čeľadi Theraphosidae a 1 druh z čeľadi Barychelidae. Z entelegynných araneomorfov bol vybraný 1 druh z čeľade Agelenidae, z haplogynných araneomorfov 1 druh z čeľade Filistatidae. Získané údaje o karyotypech, pohlavných chromozómoch a ďalšie získané informácie, by mohli byť významné pre rekonštrukciu evolúcie karyotypov študovaných skupín pavúkov.

Diploidné počty u pavúkov majú vysokú variabilitu. Mygalomorfné pavúky majú vyššiu diverzitu diploidných počtov chromozómov ako araneomorfné pavúky. Doposiaľ najnižší počet bol pozorovaný u *Atypus affinis* $2n = 14$ (Atypidae; Řezáč *et al.* 2006). Naopak najvyšší diploidný počet bol pozorovaný u zástupcu čeľade Hexathelidae *Macrothele calpeiana* $2n = 132$, ktorý patrí medzi najvyššie počty všetkých dodnes preštudovaných pavúkov (Hrubá 2017). Z druhov vybraných v diplomovej práci sa najvyššie diploidné počty chromozómov vyskytujú u vtáčkarov rodu *Poecilotheria*. U samca *Poecilotheria vittata* (Theraphosidae; táto práca) je diploidný počet $2n_{\text{♂}} = 117$ chromozómov, kým u samca *Poecilotheria formosa* (Theraphosidae; Král *et al.* 2011) bol nameraný diploidný počet chromozómov $2n_{\text{♂}} = 110$. Diploidný počet u *P. vittata* je doposiaľ najvyšší diploidný počet u theraphosidných vtáčkarov. Vysoký počet chromozómov súvisí s prevažujúcim zastúpením akrocentrických chromozómov oproti príbuzným druhom s nižším počtom, čo naznačuje na zvýšenie diploidného počtu v dôsledku rozpadu chromozómov v oblasti centroméry. Pomerne vysoký diploidný počet chromozómov bol zistený u druhov *Cyriocosmus perezmilei* $2n_{\text{♂}} = 86$ a *Psalmopoeus irminia* $2n_{\text{♂}} = 82$. (Theraphosidae; táto práca). Tieto údaje zapadajú do predpokladaného rozpätia ancestrálnych diploidných počtov u nadčeľade Avicularioidea (80-90 chromozómov), kam Theraphosidae patria (Král *et al.* 2013). Z mygalomorfných pavúkov boli analyzované aj druhy s nižším počtom chromozómov *Lasiadora striatipes* $2n_{\text{♂}} = 46$ a *Nhandu chromatus* $2n_{\text{♂}} = 52$ (Theraphosidae; táto práca), k zníženiu $2n$ došlo zrejme fúziou chromozómov. U araneomorfného pavúka *Kukulcania aff.*

hibernalis (Filistatidae; táto práca) bol zistený tiež nízky počet chromozómov $2n^{\sigma} = 25$. V tomto prípade stanovený diploidný počet potvrdzuje doposiaľ zistené informácie o prítomnosti nižších diploidných počtov chromozómov u araneomorfných pavúkov, na rozdiel od mygalomorfných pavúkov (Král 2006; Král *et al.* 2013). Predpokladá sa, že pavúky s vysokým diploidným počtom sú bazálne, čo karyotypy vtáčkarov s vysokými diploidnými počtami potvrdzujú (Suzuki 1954).

5.1 Evolúcia pohlavných chromozómov

Pavúky sa vyznačujú veľmi zložitými systémami pohlavných chromozómov. Charakteristickým znakom pavúkov je prítomnosť mnohopočetných X chromozómov (Král *et al.* 2013). U pavúkov je za pôvodný systém pohlavných chromozómov považovaný systém X_1X_20 (Suzuki 1954), ktorý sa ale vyskytuje hojne iba u entelegynných pavúkov (Král *et al.* 2010, Král *et al.* 2013). U mygalomorfných pavúkov a rovnako tak aj u haplogynných pavúkov je tento systém vzácny (Král *et al.* 2006; Král *et al.* 2013). Za ancestrálny systém mygalomorfných pavúkov, konkrétne skupiny Avicularioidea je považovaný systém pohlavných chromozómov $X_1X_2X_3X_40$ (Král *et al.* 2013).

Systém pohlavných chromozómov $X_1X_2X_3X_40$ bol pozorovaný u *Poecilotheria formosa* (Theraphosidae). Predpokladá sa, že pohlavný systém $X_1X_2X_3X_40$ vznikol duplikáciou z pohlavného systému X_1X_20 , a to nondisjunkciou alebo polyploidizáciou (Král *et al.* 2010). Predpokladá sa, že pohlavné systémy s viacerými pohlavnými chromozómami X než štyri pravdepodobne u mygalomorfov vznikli nondisjunkciou pôvodného X chromozómu a následnou diferenciáciou novovzniknutého pohlavného chromozómu popr. rozpadmi chromozómov X (Král *et al.* 2013).

Z vybraných analyzovaných druhov mygalomorfných pavúkov čeľade Theraphosidae bol v systémoch tvorených iba chromozómami X, počet pohlavných chromozómov nižší, než v predpokladanom ancestrálnom karyotype tejto skupiny ($X_1X_2X_3X_40$).

Pohlavný systém $X_1X_2X_30$ bol pozorovaný u *Neoholothele incei* (Theraphosidae; táto práca). Pohlavný systém $X_1X_2X_30$ pravdepodobne vznikol fúziou pohlavných chromozómov X zo systému $X_1X_2X_3X_40$ (Král *et al.* 2013). Na rozdiel od mygalomorfných pavúkov, u entelegynných pavúkov tento odvodený pohlavný systém vznikol pravdepodobne nondisjunkciou pohlavných chromozómov X ze systému X_1X_20 , ktorý je u entelegynov považovaný za fylogeneticky pôvodný (Postiglioni & Brum-Zorrilla 1981). Pohlavný systém $X_1X_2X_30$ u mygalomorfov, vzniká nezávisle v rôznych vetvách. Bol pozorovaný napríklad u vtáčkarov rodu *Euagrus*, konkrétne u *E. josephus* a *E. carlos* (Hrubá 2017).

U samcov *Nhandu chromatus*, *Lasiadora striatipes* a *Psalmopoeus irminia* sa v karyotype vyskytovali dva pohlavné chromozómy X. Systém pohlavných chromozómov X_1X_20 bol pozorovaný aj u iných zástupcov mygalomorfných pavúkov, napríklad u *Psalmopoeus cambridgei* a *Grammostola rosea* z tej istej čeľade (Kráľ *et al.* 2013), ďalej u *Cyrtocarenum cunicularium* (Ctenizidae; Kráľ *et al.* 2013). Jednou z nich je, že pohlavný systém X_1X_20 vznikol nondisjunkciou jedného X chromozómu a následnou diferenciáciou druhého X (Postiglioni a Brum-Zorrilla 1981).

Pomerne zriedkavý, ale veľmi komplexný systém pohlavných chromozómov je neopohlavný systém, ktorý bol pozorovaný u niektorých araneomorfných aj mygalomorfných pavúkov. Neopohlavné chromozómy môžu vznikáť prestavbami medzi stávajúcimi pohlavnými chromozómami a autozómami, reciprokými alebo Robertsonovými translokáciami. (Řezáč *et al.* 2006, Kráľ 2007, Kráľ *et al.* 2013). Systémy neopohlavných chromozómov u mygalomorfných pavúkov môžu byť veľmi komplikované, okrem pohlavných chromozómov X obsahujú aj Y chromozómy.

Veľmi zložitý systém pohlavných chromozómov $X_1X_2X_3Y$ bol v práci objavený u *Atropothele socotrana*, z čeľade Barychelidae. Z analyzovaných figúr bolo možné určiť prítomnosť troch pohlavných chromozómov X a jeden Y. Počas neskorej profázy bol pozorovaný trivalent, ktorý je zložený z dvoch jednoramenných chromozómov X a jedného metacentrického chromozómu Y. Tretí chromozóm X tvoril univalent. Pre určenie diferenciácie Y chromozómu bola použitá metóda CGH. Samčí signál na Y chromozóme nebol detegovaný. Veľmi slabý samičí signál sa objavil na ramienku jedného chromozómu v zvláštnom heteromorfnom bivalente, ktorý bol v neskorej profáze tiež pozorovaný. Ak uvažujeme, že samičí signál na heteromorfnom bivalente leží na chromozóme X, mohli by sme predpokladať, že heteromorfný bivalent predstavuje SCP *Atropothele socotrana* (Sember *et al.* in prep.). Je možné, že pohlavný systém $X_1X_2X_3Y$ bol odvodený od systému pohlavných chromozómov XY, ktorý bol nájdený u príbuzného barychelida, *Cyphonisia sp.* (Barychelidae). Pre získanie podrobnejšej predstavy o pohlavnom systéme *Atropothele socotrana* by bolo vhodné získať ďalšie informácie o správaní pohlavných chromozómov u samca počas meiózy, predovšetkým o ich párovaní, napr. elektronovou mikroskopiou. Rovnako tak, získať informácie o pohlavných chromozómoch príbuzných druhov.

U samca *Poecilotheria vittata* bol pozorovaný zložitý neopohlavný systém $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7Y_1Y_2$. Na tento systém ukazujú údaje o diploidnom počte a z meiotického delenia. Pohlavný systém u samca je tvorený piatimi pohlavnými chromozómami X, ktoré boli pozorované počas diploténneho štádia a diakinézy ako univalenty, ktoré spolu asociovali.

Spolu s pohlavnými chromozómami X asociujú dva chiazmatické heterobivalenty, u ktorých predpokladáme, že každý je tvorený chromozómom X a Y. Samec *Poecilotheria vittata*, by mal teda mať deväť pohlavných chromozómov. Súčet počtov pohlavných chromozómov a počtu bivalentov v neskorej profáze I, kedy bolo pozorovaných 54 bivalentov dáva diploidný počet, 117 chromozómov. Počas metafázy II figúra s pohlavnými chromozómami X obsahovala 61 chromozómov a sesterská figúra s pohlavnými chromozómami Y obsahovala 56 chromozómov, čo potvrdzuje systém $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7Y_1Y_2$.

Počas diakínézy bolo možné rozlíšiť morfológiu chromozómov tvoriacich heterobivalenty. S určitosťou sa dá tvrdiť, že každý heterobivalent je tvorený dvojramenným a jednoramenným chromozómom. Na základe párovania týchto chromozómov prostredníctvom chiazim a spôsobu ich asociácie s univalentami X sa dá predpokladať, že sa jedná o neopohlavné chromozómy. Dvojramenné chromozómy bivalentu asociujúce s univalentami X predstavujú zrejme chromozómy X, jednoramenné chromozómy Y. Hypotéza o vzniku systému $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7Y_1Y_2$ vychádza z predpokladu, že vznikol zo systému $X_1X_2X_3X_40$ príbuzného druhu *Poecilotheria formosa*, ktorý obsahuje štyri metacentrické chromozómy X (Král *et al.* 2013). V prvom kroku muselo pravdepodobne dôjsť k vzniku pohlavného systému $X_1X_2X_3X_4X_5X_60$ nondisjunkciou pohlavných chromozómov X. Týmto procesom vznikli pohlavné chromozómy X_5 a X_6 . Táto hypotéza predpokladá, že všetky pohlavné chromozómy boli metacentrické. V ďalšom kroku mohlo dôjsť k rozpadu pohlavného chromozómu X_6 na dva akrocentrické chromozómy. Najskôr nastala centrická fúzia medzi jedným akrocentrickým X chromozómom a jedným akrocentrickým chromozómom z autozómového páru, za vzniku metacentrického neo-X chromozómu, pričom druhý chromozóm z autozómového páru sa diferencoval na neo-Y. Rovnakým spôsobom vznikol ďalší pár neopohlavných chromozómov X a Y.

Systémy pohlavných chromozómov, tvorené mnohopočetnými chromozómami X, sa u bazálnych araneomorfov bežne nevyskytujú, a pokiaľ áno, jedná sa o odvodený spôsob chromozómovej determinácie pohlaví, ktoré vznikli zo systému X_1X_2Y , ktorý je zrejme pro haplogynné pavúky ancestrálny (Paula-Neto *et al.* 2017), a to degeneráciou a stratou chromozomu Y. Systém X_1X_2Y je u haplogynov omnoho častejší. Bol nájdený u pavúkov z čeľadí Drymusidae, Hypochilidae, Filistatidae, Sicariidae a Pholcidae. Tento systém sa vyznačuje typickou morfológiou a achiasmatickým párovaním pohlavných chromozómov počas meiózy (Král *et al.* 2006). Tento systém sa vyskytoval i u *Kukulcania aff. hibernalis*. Počas profázy a metafázy I bol pozorovaný trivalent X_1X_2Y s typickou morfológiou chromozómov, tvorený dvoma veľkými metacentrickými chromozómami X a veľmi malým Y

chromozómov, ktorého morfológiu nebolo možné určiť, kvôli jeho príliš malej veľkosti. V profáze I až metafáze I pohlavné chromozómy X konci svojich ramien párujú achiazmaticky s Y chromozómom. Mechanizmus vzniku dodnes nie je presne známy. Hypotéza o mechanizmu vzniku X_1X_2Y , ktorá vznikla na základe pozorovaní iného haplogynného pavúka, *Loxosceles* (Sicariidae), tvrdí, že systém X_1X_2Y mohol vzniknúť ako neopohlavný, a to z pohlavného systému X_1X_20 . Mechanizmus mal spočívať v translokácii medzi X chromozómami a autozómami (Silva *et al.* 1988). Keďže je tento pohlavný systém možno fylogeneticky pôvodný u haplogynných pavúkov, metódou CGH bol testovaný stupeň diferenciácie pohlavného chromozómu Y u samca *Kukulcania aff. hibernalis*. Metódou CGH bol detegovaný samčí signál, ktorý pokrýval celý pohlavný chromozóm Y a predstavuje tak vysoký stupeň diferenciácie pohlavného chromozómu Y.

Neopohlavný systém $X_1X_2X_3X_4X_5Y$ bol popísaný u samca *Tegenaria ferruginea*. Jedná sa o systém, ktorý je tvorený tromi univalentami X a jedným trivalentom. Trivalent je tvorený dvomi pohlavnými chromozómami X a jedným Y. Predpokladá sa, že tento pohlavný systém pravdepodobne vznikol zo systému $X_1X_2X_30$ (Král 2007). Tri univalenty X predstavujú pôvodné chromozómy X systému $X_1X_2X_30$. Fúziou proto-X z SCP vznikli pohlavné chromozómy X_4 a X_5 . Y chromozóm vznikol fúziou proto-Y z SCP a autozómu. Na základe tejto hypotézy by mohol byť novovzniknutý pohlavný chromozóm Y po fúzii už aspoň čiastočne diferencovaný. Pre potvrdenie diferenciácie bola použitá metóda CGH. Samčí špecifický signál nebol preukázaný, čo ukazuje na veľmi nízky stupeň diferenciácie neopohlavného chromozómu Y (Sember *et al.* in prep.).

Typickým znakom mygalomorfných pavúkov s mnohopočetnými pohlavnými chromozómami X je ich achiazmatické párovanie, tzv. end-to-end párovanie, počas samčej profázy I. Pohlavné chromozómy pritom vzájomne asociujú svojimi koncami (Král *et al.* 2013). U araneomorfných pavúkov bolo achiazmatické párovanie pozorované u haplogynných pavúkov (Král *et al.* 2006). a u entelegynných pavúkov. U entelegynných pavúkov sa z párovania chromozómov koncami vyvinulo paralelné párovanie akrocentrických pohlavných chromozómov, párovanie je nejsilnejšie v oblastiach centromér (Král *et al.* 2011).

U analyzovaných samcov čeľade Theraphosidae bolo vo vybraných figúrach v diploténnom štádiu a diakinéze pozorované achiazmatické tzv. end-to-end párovanie. Párovanie bolo preukázané u druhov so systémom pohlavných chromozómov X_1X_20 , $X_1X_2X_30$ a rovnako tak aj u druhov s pohlavným systémom $X_1X_2X_3X_40$. Pozoruhodný prípad sa vyskytol u samca *Poecilotheria vittata* (Theraphosidae), kedy metacentrické pohlavné chromozómy $X_1 - X_5$ vzájomne asociovali oboma koncami aj v metafáze II. Tento jav je veľmi ojedinelý, keďže

achiazmatické párovanie bolo doposiaľ viazané na profázu I. Achiazmatické párovanie bolo pozorované aj u haplogynného samca *Kukulcania aff. hibernalis* (X_1X_2Y), kedy metacentrické X chromozómy párujú s Y mikrochromozómom oboma koncami ramien.

Zložitosť systému pohlavných chromozómov u pavúkov dokumentuje prítomnosť párov nediferencovaných pohlavných chromozómov X a Y, tvoriacich tzv. SCP (sex chromosome pair). Chromozómy X a Y týchto párov majú rovnakú morfológiu a párujú pozdĺž celej dĺžky chiazmami, čo naznačuje ich nízku diferenciáciu. Metóda C-pruhovania odhalila rovnaké zastúpenie konštitutívneho heterochromatínu na oboch chromozómoch SCP (Král *et al.* 2011). Nízka diferenciácia chromozómov SCP a výskyt u araneomorfov i mygalomorfov, naznačujú, že by mohli predstavovať evolučne pôvodné pohlavné chromozómy pavúkov. U mygalomorfov nadčelade Avicularioidea sa vyskytujú dva páry týchto chromozómov, druhý pár mohol vzniknúť duplikáciou genómu (Král *et al.* 2013). U niektorých zástupcov vtáčkarov sa jeden či oba páry vyznačujú špecifickým správaním v samčej pohlavnej dráhe (predčasná separácia chromatíd v spermatogoniálnej mitóze, heteropyknóza v meióze), takže je možné tieto páry cytologicky detegovať. U mygalomorfov bolo zachovaných niekoľko ancestrálnych znakov, týkajúcich sa SCP. Jedným z nich je, že u mygalomorfov sú tvorené vždy veľkými metacentrickými chromozómami (Král *et al.* 2013). Táto skutočnosť bola pozorovaná u samca *Cyriocosmus perezmilei* (Theraphosidae; táto práca), u ktorého bol pozorovaný jeden pár SCP. Z analyzovanej figúry bolo možné určiť, že sa jedná o metacentrické chromozómy. U samca *Psalmopoeus irminia* sa vyskytovali dva páry metacentrických SCP približne rovnakej veľkosti. V samčej meióze môžu SCP vykazovať podobné správanie ako pohlavné chromozómy X. V premeiotickej interfáze a profáze I sú chromozómy SCP a rovnako tak aj pohlavné chromozómy X, asociované (Král *et al.* 2013). U *Psalmopoeus irminia* bolo počas profázy I pozorované heteropyknotické teliesko tvorené SCP. Pozitívna heteropyknóza SCP pretrvávala až do neskorej profázy I (diploténne – metafáza I), čo predstavuje oneskorenú kondenzáciu. Rovnaký počet, dva páry SCP boli pozorované u príbuzného druhu *Psalmopoeus camridgei* (Theraphosidae), u ktorého pretrvávala pozitívna heteropyknóza SCP tiež do neskorej profázy I (Král. *et al.* 2013). U samcov *Nhandu chromatatus* a *Lasiadora striatipes* (Theraphosidae; táto práca) bolo počas pachyténneho štádia pozorované heteropyknotické teliesko tvorené SCP. Z morfológie telieska není možné odvodiť počet SCP diferencovaných cytologicky ani ich morfológiu. Heteropyknotické teliesko, tvorené SCP bolo pozorované aj u samca *Poecilotheria vittata* (Theraphosidae; táto práca). V mitotickej metafáze bol pozorovaný jeden pár SCP, ktoré

patrili medzi veľké metacentrické chromozómy, ktoré sa nelíšili medzi sebou morfológiou ani veľkosťou. U príbuzného samca *Poecilotheria formosa* (Theraphosidae) bol pozorovaný rovnako jeden SCP (Kráľ et al. 2011).

Na určenie stupňa diferenciácie SCP bola použitá metóda CGH. U samca *Psalmopoeus irminia* nebol na chromozómoch SCP zistený špecifický samčí signál. Samičí signál bol detegovaný v terminálnej oblasti jedného SCP, a to na oboch chromozómoch. Samičí signál by sa mal objaviť v SCP iba na chromozóme X. Pokiaľ sa objavuje na oboch chromozómoch SCP, je diferenciácia chromozómov X a Y veľmi nízka: samičia sonda hybridizuje v danom mieste, ako k chromozómu X, tak aj Y, jeho sekvencia je v danom mieste totožná (alebo veľmi podobná) chromozómu X.

U samcov *Poecilotheria* boli metódou CGH vizualizované výrazné terminálne bloky heterochromatínu. U samca *Poecilotheria formosa* bol počas diakinézy jeden chromozóm X značený samčou sondou v interkalárnej oblasti, tesne za ním sa nachádzal nešpecifický signál. V prípade samčieho signálu sa mohlo jednáť o sekvenciu prenesenú z chromozómu Y. V metafáze I bol pozorovaný bivalent, ktorý niesol na jednom konci samčí špecifický signál, na druhom samčí signál. Mohlo sa jednáť o bivalent tvorený SCP. U samca *Poecilotheria vittata* boli v metafázy II s chromozómami X pozorované tri veľké metacentrické chromozómy, v ktorých jednom ramene sa striedali úseky s rôznou afinitou k samčej a samičej sondy. Jedná sa zrejme o chromozómy X, pretože tieto chromozómy chýbajú v metafázach II bez chromozómov X. Figúry, ktoré boli k dispozícii, neumožňujú určiť, či sa detegované signály nachádzajú na neopohlavných chromozómoch alebo univalentoch X.

5.2 Repetitívne usporiadané gény

Informácií o NOR u pavúkoch dodnes nie je mnoho. S využívaním metódy fluorescenčnej *in situ* hybridizácie, ktorá postupne nahrádza metódu vizualizácie dusičnanom strieborným, informácií stále viac pribúda. Pri detekcii NOR sa u jednotlivých druhov sleduje ich počet, veľkosť, pozícia na chromozóme a lokalizácia na autozómoch alebo na pohlavných chromozómoch. Doterajšia detekcia NOR bola prevedená prevažne u araneomorfných pavúkov (Dolejš et al. 2011). U pavúkov bolo dodnes v súvislosti s NOR pozorovaných niekoľko znakov, ktoré možno považovať za ancestrálne. Medzi ňé patrí prítomnosť jedného alebo dvoch párov NOR na jednom alebo dvoch chromozómových párov a ich pozícia v terminálnej alebo subterminálnej oblasti chromozómu. Tieto znaky sú ancestrálne u araneomorfných a rovnako aj mygalomorfných pavúkov, vyskytovali sa u spoločného predka týchto skupín (Kráľ et al. 2013).

U mygalomorfných pavúkov boli doposiaľ NOR vizualizované u čeľadi Antrodiaetidae, Dipluridae, Mecicobothriidae, Nemesiidae a Theraphosidae. V práci boli vizualizované NOR u niekoľkých mygalomorfných pavúkov čeľade Theraphosidae. U samca *Cyriocosmus perezmilei* bol NOR detegovaný na dvoch chromozómoch. U *Neoholothele incei* bol NOR lokalizovaný v terminálnej oblasti dlhého ramena submetacentrického chromozómu. U samca *Lasiadora striatipes* bol detegovaný NOR v terminálnej oblasti jedného bivalentu. Rovnaká lokalizácia bola pozorovaná u samca *Psalmopoeus irminia*. Podľa výsledkov môžeme predpokladať, že u týchto druhov boli zachované ancestrálne znaky NOR. U *Poecilotheria formosa* sa vyskytoval NOR na troch bivalentoch, kým u príbuzného *P. vittata* bol počet NOR nižší, vyskytoval sa na dvoch bivalentoch. Z uvedeného môžeme predpokladať, že u *P. formosa* došlo k zvýšeniu z dvoch na tri NOR. Ancestrálna pozícia NOR v terminálnej oblasti bola zachovaná aj u *P. formosa*, u *P. vittata* nebolo možné určiť presnú lokalizáciu.

Z haplogynných pavúkov bol NOR vizualizovaný u druhu *Kukulcania aff. hibernalis*, ktorý sa nachádzal v terminálnej oblasti ramienka metacentrického chromozómového páru (Filistatidae; táto práca). U analyzovaného samca bolo možné vylúčiť prítomnosť NOR na pohlavných chromozómoch.

U pavúkov existujú i prípady, kedy boli NOR pozorované na pohlavných chromozómoch. Táto situácia je bežná u haplogynných pavúkov (Král *et al.* 2006). U mygalomorfných pavúkov je táto lokalizácia vzácna. Zatiaľ bol tento prípad pozorovaný u pavúkov rodu *Ischnothele* (Ischnotelidae), kde bol NOR lokus lokalizovaný na X a Y chromozóme. U rodu *Linothele* (Dipluridae) bol lokus vizualizovaný len na jednom chromozóme X (Král *et al.* 2013). U samca rodu *Iberesia* (Nemesiidae) bol NOR lokus vizualizovaný na oboch koncoch jedného SCP chromozómu. Na homologickom chromozóme tento lokus nebol prítomný a predpokladá sa, že došlo k jeho strate (Král *et al.* 2013).

U pavúkov sa vyskytuje prevažne nižší počet NOR lokusov. Najvyšší počet sú 10 NOR lokusov u *Wadicosa fidelis* (Lycosidae, Forman *et al.* 2013) a až 13 NOR lokusov u *Larinioides patagiatus* a *Zygiella atrica* (Araneidae) (Pajpach 2018).

V diplomovej práci boli detegované aj gény pre 5S rRNA, a to u samcov rodu *Poecilotheria*. U samca *P. formosa* aj *P. vittata* sa gény pre 5S rRNA nachádzali na dvoch bivalentoch. Signál prípadne i lokusy týchto génov, ktoré boli pozorované vo figúrach, mali slabšiu kvalitu a intenzitu ako u sondy pro 18S rDNA. Sekvencie časti génov *P. vittata* odpovedali úsekom génov pre 5S rRNA z 95, 16 % u *Oxyopes sertatus* (Araneae). Výsledky, ktoré sa týkali počtu lokusov pre 5S rDNA je možné porovnať iba s hmyzom, u pavúkovcov nebol zatiaľ tento marker detegovaný.

Autori uvádzajú, že príslušné lokusy sa nachádzajú na pohlavných chromozómoch a ich počet je jeden alebo dva (Cabral-de-Mello, Martins, *et al.* 2011; Cabral-de-Mello, Oliveira, *et al.* 2011; Palacios-Gimenez a Cabral-de-Mello 2015). U samcov rodu *Poecilotheria* sa gény pre 5S rRNA pravdepodobne na pohlavných chromozómoch nenachádzajú, túto hypotézu však nie je možné s určitosťou potvrdiť. Tento výsledok nie je prekvapivý, pretože pohlavné chromozómy vznikli u hmyzu a pavúkov nezávisle.

U pavúkov boli gény pre históny metódou FISH detegované len ojedinele. U vtáčkarov bol pozorovaný jediný klaster génov pre histón H3 na jednom autozómovom páre v terminálnej oblasti ramienka u *Macrothele sp.* a *M. calpeiana* (Hexathelidae). V mojej diplomovej práci boli detegované gény pre histón H3 u vtáčkarov rodu *Poecilotheria*. U samca *Poecilotheria formosa* bol detegovaný marker pre gény histónu H3 na troch bivalentoch v terminálnej oblasti. U samca *P. vittata* bol marker vizualizovaný rovnako.

Sekvencia časti génu pre histón H3 *Poecilotheria vittata*, odpovedala úseku génu pre histón H3 z 95, 59 % u vtáčkara *Poecilotheria subfusca*. Na základe porovnaní sekvencií génov pre histón H3 u vtáčkarov rodu *Poecilotheria* a taktiež s inými pavúkovcami vyplýva, že sekvencie sú veľmi podobné a teda značne konzervované.

Detekcia génov pre histón H3 bola prevedená aj u ďalšej skupiny pavúkov, kde bol preukázaný rovnako vyšší počet klastrov pre histón H3. Najmenej tri klastre boli pozorované u *Araneus circe* (Araneidae), kým u *Araneus ventricosus* boli štyri (Araneidae) (Pajpach 2018).

6 Zhrnutie

Rad pavúky (Araneae) patrí medzi najviac diverzifikované skupiny živočíchov. Aj napriek pribúdajúcemu cytogenetickému záujmu, sú stále málo prebádané. V diplomovej práci boli využité metódy klasickej a molekulárnej cytogenetiky pre analýzu pohlavných chromozómov a vybraných repetitívne usporiadaných génov u vybraných zástupcov mygalomorfných, entelegynných a z haplogynných araneomorfov.

Využitím naplánovaných metód boli v diplomovej práci splnené stanovené ciele. U vybraných druhov pavúkov boli určené diploidné počty, morfológia chromozómových párov a systémy pohlavných chromozómov. Stanovené diploidné počty potvrdili výskyt vysokého počtu chromozómov u mygalomorfných pavúkov. Analýza odhalila doteraz najvyšší diploidný počet chromozómov u čeľade Theraphosidae, a to u samca *Poecilotheria vittata* ($2n\sigma=117$). U entelegynných a haplogynných pavúkov boli diploidné počty chromozómov podstatne nižšie.

Jedným z hlavných cieľov bola analýza pohlavných chromozómov. Pre mygalomorfné pavúky nadčeľade Avicularioidea je charakteristický výskyt viacerých pohlavných chromozómov X. Zložitosť pohlavných systémov sa odráža aj v prítomnosti nediferencovaných pohlavných chromozómov X a Y. U niektorých druhov mygalomorfných pavúkov však vznikajú ešte komplexnejšie systémy pohlavných chromozómov, a to prestavbami medzi autozómami a pohlavnými chromozómami, ktorými vznikajú neopohlavné chromozómy. Pozoruhodný neopohlavný systém $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7Y_1Y_2$ bol objavený u *Poecilotheria vittata* (Theraphosidae). Ďalší neopohlavný systém bol pozorovaný u *Atropothele socotrana* (Barychelidae).

Ďalším cieľom bolo stanovenie diferenciácie pohlavných chromozómov metódou CGH u vybraných druhov. Získané výsledky u mygalomorfov *Psalmopoeus irminia* a *Poecilotheria* ukazujú na veľmi nízku diferenciáciu SCP. Niekoľko chromozómov X u *P. vittata* obsahuje rozsiahle bloky heterochromatínu, ktoré sa vizualizujú samičou sondou. U haplogynného pavúka *Kukulcania aff. hibernalis* (Filistatidae) (X_1X_2Y) bol malý metacentrický pohlavný chromozóm Y celý značený samčou sondou, čo ukazuje na jeho vysoký stupeň diferenciácie.

Metódou FISH boli v diplomovej práci detegované klastre vybraných repetitívne usporiadaných génov. U väčšiny študovaných druhov mygalomorfných a araneomorfných pavúkov bola stanovená distribúcia NOR. Výsledky ukazujú, že u väčšiny druhov mygalomorfov, sú zachované predpokladané ancestrálne znaky NOR. U týchto druhov mygalomorfných pavúkov sa vyskytoval jeden alebo dva páry NOR na jednom alebo dvoch pároch chromozómov, a to prevažne v terminálnej oblasti chromozómov. U zástupcov rodu

Poecilotheria došlo k zvýšeniu počtu NOR na tri. U zástupcov rodu *Poecilotheria* boli tiež detegované gény pre 5S rRNA a histón H3. Výsledky boli porovnané s ďalšími pavúkmi a článkonožcami.

7 Zoznam použitej literatúry

- Araújo, D., Cella, D.M., Brescovit, A.D. (2005): Cytogenetic analysis of the neotropical spider *Nephilengys cruentata* (Araneomorphae, Tetragnathidae): standard staining, NORs, C-bands and base-specific fluorochromes. *Brazilian Journal of Biology* 65 (2): 193-202.
- Araújo, D., M.C. Schneider, E. Paula-Neto, & D.M. Cella. 2012. "Sex chromosomes and meiosis in spiders: a review. *Meiosis - Molecular Mechanisms and Cytogenetic Diversity*, no. 1977:87–108.
- Araújo, D., Schneider, M. C., Paula-Neto, E., Cella, D. M. (2019): The spider cytogenetic database. Dostupné na: www.arthropodacytogenetics.bio.br/spiderdatabase.
- Artoni, R.F., & L.A.C. Bertollo. (2002): Evolutionary aspects of the ZZ/ZW sex chromosome system in the Characidae fish, genus *Triportheus*. A monophyletic state and NOR location on the W chromosome. *Heredity* 89 (1):15–19.
- Benavente, R., & R. Wettstein. (1977). An ultrastructural cytogenetic study on the evolution of sex chromosomes during the spermatogenesis of *Lycosa malitiosa* (Arachnida). *Chromosoma* 64 (3):255–277.
- Boisvert, F.M., Koningsbruggen, S., Navascués, J., Lamond, A.I. (2007): The multifunctional nucleolus. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* volume 8, pages 574–585.
- Bole-Gowda, B. N. (1950): The chromosome study in the spermatogenesis of two lynx-spiders (Oxyopidae). In *Proc Zool Soc Bengal* (Vol. 3, pp. 95-107).
- Bond, J. E., Hendrixson B.E., Hamilton, CH. A., Hedin, M. (2012): A reconsideration of the classification of the spider infraorder Mygalomorphae (Arachnida: Araneae) based on three nuclear genes and morphology. *Plos one*.
- Britton-Davidian, J., Cazaux, B., Catalan, J. (2012): Chromosomal dynamics of nucleolar organizer regions (NORs) in the house mouse: micro-evolutionary insights. *Heredity* (Edinb). 108(1): 68–74.
- Bueno, D., Palacios-Gimenez, O.M., Cabral-de-Mello, D.C. (2013): Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the grasshopper *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry of the B chromosome and H3 histone spreading. *Plos one*. 8 (6): e66532.

- Buchar, J. & Kůrka, A. (1998): Naši pavouci. Vyd.1. – Praha: Academia – 154s. ISBN 80-200-0331-2.
- Cabral-de-Mello, D.C., Oliveira, S.G., Moura, de R.C., Martins, C. (2011): Chromosomal organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: Insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. *BMC Genetics* 12. 12: 88.
- Cabral-de-Mello, D.C., Valente, G.T., Nakajima, R.T., Martins, C. (2012): Genomic organization and comparative chromosome mapping of the U1 snRNA gene in cichlid fish, with an emphasis in *Oreochromis niloticus*. *Chromosome Res.* 20(2):279-92.
- Clark, M.S. & Wall, W.J. (1996): Chromosomes: the complex code. Chapman and Hall.
- Coddington, J.A., & H.W. Levi. (1991): Systematics and evolution of spiders (Araneae). *Annual Review of Ecology and Systematics* 22 (1):565–592.
- Conrad, T. & Akhtar, A. (2012): Dosage compensation in *Drosophila melanogaster*: epigenetic fine-tuning of chromosome-wide transcription. *Nature Reviews Genetics* volume 13, pages 123–134.
- Dolejš, P., Kořínková, T., Musilová, J., Opatová, V., Kubcová, L., Buchar, J., Král, J. (2011): Karyotypes of central European spiders of the genera *Arctosa*, *Tricca* and *Xerolycosa* (Araneae, Lycosidae). *European Journal of Entomology*, 108(1), 1-16.
- Dunlop, J. A. (2019): Miniaturisation in Chelicerata. *Arthropod Struct Dev.* 48:20-34.
- Eickbush, T.H., Eickbush, D.G. (2007): Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* 175:477–485.
- Engelstädter, J. (2008): Muller's Ratchet and the Degeneration of Y chromosomes: A Simulation Study. *Genetics*, 180(2), 957-967.
- Fedoriw, A. M., Starmer, J., Yee, D., Magnuson, T. (2012): Nucleolar association and transcriptional inhibition through 5S rDNA in mammals. 8(1):e1002468.
- Foley, S., Lüddecke, T., Cheng, D.Q., Krehenwinkel, H., Künzel, S., Longhorn, J., Wendt, I., Wirth, W., Tänzler, R., Vences, M., Piel, W. H. (2018): Tarantula phylogenomics: A robust

phylogeny of multiple tarantula lineages inferred from transcriptome data sheds light on the prickly issue of urticating setae evolution. BioRxiv.

Forman, M., Nguyen, P., Hula, V., Král, J. (2013): Sex chromosome pairing and extensive NOR polymorphism in *Wadicosa fidelis* (Araneae: Lycosidae). Cytogenet Genome Res.141:43-49.

Gamble, T. & Zarkower, D. (2012): Sex determination. Science Direct. 22(8):R257-62.

Gerbi, S. A., Borovjagin, A. V., Odreman, F. E., Lange, T. S. (2003): U4 snRNA nucleolar localization requires the NHPX/15.5-kD protein binding site but not Sm protein or U6 snRNA association. Journal of Cell Biology. 162(5):821-832.

Graves, J. (2006): Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. Cell 124:901–914.

Gruetzner, F., Ashley, T., Rowell, D. M., Graves, J. A. M. (2006): How did the platypus get its sex chromosome chain? A comparison of meiotic multiples and sex chromosomes in plants and animals. 115(2):75-88.

Hackman, W. (1948). Chromosomenstudien an Araneen mit besonderer berücksichtigung der geschlechtschromosomen. Acta Zoologica Fennica 54:1–101.

Hallacli, E. & Akhtar, A. (2009): X chromosomal regulation in flies: when less is more. Chromosome Res. 17, 603–619.

Hendrixson, B.E. & Bond, J.E. (2007): Molecular phylogenetics and evolution, ISSN: 1055-7903, Vol: 42, Issue: 3, 738-5.

Henras, A. K., Plisson-Chastang, C., O'Donohue, M.F., Chakraborty, A., Gleizes, E. (2014): An overview of pre-ribosomal RNA processing in eukaryotes. Wiley online library. 6(2):225-42.

Hernandez - Verdun, D. (2011): Assembly and disassembly of nucleolus during the cell cycle. Nucl. 2(3), 189-194.

Hrubá, B. (2017): Analýza karyotypu u sklípkanů čeledi Hexathelidae a Dipluridae, Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha

- Chandrasekera, A., Jayarathne, V., Fonseka, D. (2017): Molecular Methods Developed for the Identification and Characterization of Candida Species. *Int J Open Access Ophthal* 4(1): 6.
- Charlesworth, B. (1978): Model for evolution of Y chromosomes and dosage compensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 75(11), 5618-5622.
- Charlesworth, B. (1996): The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Science direct*. 6(2):149-62.
- Charlesworth, D., Charlesworth, B. & Marais, G. (2005): Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity*, 95(2), 118.
- Jetybayev, I. Y., Bugrov, A. G., Buleu, O. G., Bogomolov, A. B., Rubtsov, N. B. (2017): Origin and Evolution of the Neo-Sex Chromosomes in Pamphagidae Grasshoppers through Chromosome Fusion and Following Heteromorphization. *Genes (Basel)*. 8(11): 323.
- Jordan, W., Rieder, L.E., Larschan, E. (2019): Diverse genome topologies characterize dosage compensation across species. *Science direct*. 35(4):308-315.
- Kambas, D. (2019): Tarantupedia: an online taxonomic database for the worlds largest spiders. Dostupné na: www.tarantupedia.com.
- Kovařík, F. (2006): Svět sklípkanů. Madagaskar - 227 s. ISBN: 8086068404
- Kořínková, T. & Král, J. (2013): Karyotypes, sex chromosomes, and meiotic division in spiders. *Spider ecophysiology* (pp. 159-171). Springer Berlin Heidelberg.
- Král, J. (2007): Evolution of multiple sex chromosomes in the spider genus *Malthonica* (Aranea, Agelenidae) indicates unique structure of the spider sex chromosome systems. *Chromosome Research*, 15, 863-879.
- Král, J., Kořínková, T., Forman, M., Krkavcová, L. (2011): Insights into the meiotic behavior and evolution of multiple sex chromosome system in spiders. *Cytogenetic and Genome Research*, 133 (1), 43-66.
- Král, J., Kořínková, T., Krkavcová, L., Musilová, J., Forman, M., Herrera, I.M.Á. & Hidin, M. (2013): Evolution of karyotype, sex chromosomes, and meiosis in mygalomorph spiders (Araneae: Mygalomorphae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 109(2), 377-408.

- Král, J., Musilová, J., Štáhlavský, F., Rezáč, M., Akan, Z., Edwards, R.L., Coyle, F.A., Ribera Almeje, C. (2006): Evolution of the karyotype and sex chromosome systems in basal clades of araneomorph spiders (Araneae: Araneomorphae). *Chromosome Research*, 14, 859-880.
- Lifton, R. P., Goldberg, M. L., Karp, R. W., Hogness, D. S. (1978): The organization of the histone genes in *Drosophila melanogaster*: Functional and Evolutionary Implications. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1978 42: 1047-1051.
- Lüddecke, T., Krehenwinkel, H., Canning, G., Glaw, F., Longhorn S. J., Tänzler, R., Wendt, I., Vences, M. (2017): Discovering the silk road: Nuclear and mitochondrial sequence data resolve the phylogenetic relationships among theraphosid spider subfamilies. Elsevier.
- Lyon, M.F. (1974): Evolution of X-chromosome inactivation in mammals. *Nature*, 250(5468), 651-653.
- Macas, J., Novák, P., Pellicer, J., Čížková, J., Koblížková, A., Neumann, P., Fuková, I., Doležel, J., Kelly, L. J., Leitch, I. J. (2015): In Depth Characterization of repetitive DNA in 23 plant genomes reveals sources of genome size variation in the legume *Tribe Fabeae*. 10(11): e0143424.
- Maddison, W. P. (1982): XXXY sex chromosomes in males of the jumping spider genus *Pellenes* (Araneae: Salticidae). *Chromosoma*, 85(1), 23-37.
- Maddison, W.P. & Leduc-Robert, G. (2013): Multiple origins of sex chromosome fusions correlated with chiasma localization in *Habronattus* jumping spiders (Araneae: Salticidae). *Evolution*. 67(8):2258-72.
- Martins, C. & Galetti P. M. (2001): Two 5S rDNA arrays in Neotropical fish species: is it a general rule for fishes. *Genetica* 111: 439–446. 2001 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. 439.
- Martins, C., Wasko, A.P. (2004): Organization and evolution of 5S ribosomal DNA in the fish genome. In: Williams CR (ed) *Focus on genome research*. Nova Science Publishers, pp 335–363.
- Marz, M., Kirsten, T., Stadler, P.F. (2008): Evolution of spliceosomal snRNA genes in metazoan animals. *Journal of Molecular Evolution* 67 (6):594–607.

- 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. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:18190–18195.
- Maxson, R., Cohn, R., Kedes, L. (1983): Expression and organization of histone genes. *Ann. Rev. Genet.* 17:239-77.
- McStay, B. (2016): Nucleolar organizer regions: genomic ‘dark matter’ requiring illumination. *Genes Dev* 30, 1598–1610.
- Muller, H. J. (1964): The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1(1), 2-9.
- Németh, A., & Grummt, I. (2018): Dynamic regulation of nucleolar architecture. *Current Opinion in Cell Biology*. Volume 52, 105-111.
- Novotná, J., Havelka, J., Starý, P., Koutecký, P., Vítková, M. (2011): Karyotype analysis of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Kurdjumov) (Hemiptera: Aphididae) reveals a large X chromosome with rRNA and histone gene families. *Genetica*. 2011 Mar;139(3):281-9.
- Ohno, S. (1967): Chromosomes and sex linked genes. Springer, New York.
- Old, R.W., Callan, G.H., Gross, K.W. (1977): Localization of histone gene transcripts in newt lampbrush chromosomes by in-situ hybridization. *J Cell Sci* 27:57–79.
- Pätau, K. (1948): X-segregation and heterochromasy in the spider *Aranea reaumuri*. *Heredity* 2: 77–100.
- Pajpach, F. (2018): Karyotypová evoluce pavouků čeledi Araneidae, Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha
- Palacios-Gimenez, O.M., Cabral-de-Mello, D.C. (2015): Repetitive DNA chromosomal organization in the cricket *Cycloptiloides americanus*: a case of the unusual X1X20 sex chromosome system in Orthoptera. *Molecular Genetics and Genomics* 290 (2):623–631.
- Palacios-Gimenez, O. C., & Cabral-de-Mello, D. C. (2014): Repetitive DNA chromosomal organization in the cricket *Cycloptiloides americanus*: a case of the unusual X₁X₂₀ sex.

- Pederson, T. (2011): The nucleolus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a000638. *PNAS* 102 (14) 5084-5089.
- Postiglioni, A. & Brum- Zorrilla, N. (1981): Karyological studies on Uruguayan spiders II. Sex chromosomes in spiders of the genus *Lycosa* (Araneae- Lycosidae). *Genetica*, 56(1), 47-53.
- Prokopcová, L. (2018): Analýza karyotypu u mesothelidních pavúkov, Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, Praha
- Ranz, J.M., González, J., Casals, F., Ruiz, A. (2003): Low occurrence of gene transposition events during the evolution of the genus *Drosophila*. *Evolution* 57:1325–1335.
- Raska, I., Shaw, P.J., Cmarko, D. (2006): Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr Opin Cell Biol* 18, 325–334.
- Rice, W. R. (1996): Evolution of the Y sex chromosome in animals. *Bioscience* 46: 331-343.
- Rooney, A.P., Ward, T.J. (2005): Evolution of a large ribosomal RNA multigene family in filamentous fungi: Birth and death of a concerted evolution paradigm.
- Řezáč, M., Král, J., Musilová, J., Pekár, S. (2006): Unusual karyotype diversity in the European spiders of the genus *Atypus* (Araneae: Atypidae). *Hereditas* 143: 123 – 129.
- Sadílek, D., Nguyen, P., Koç, H., Kovařík, F., Yağmur. E.A., Šťáhlavský, F. (2015): Molecular cytogenetics of *Androctonus* scorpions: an oasis of calm in the turbulent karyotype evolution of the diverse family Buthidae. *Biological Journal of the Linnean Society*, Volume 115, Issue 1, May 2015, Pages 69–76.
- Selden, P.A., Gall, J.C. (1992): A Triassic mygalomorph spider from the northern Vosges, France. *Palaeontology* 35: 211-235.
- Silva, D.M., Utsunomia, R., Pansonato-Alves, J.C., Oliveira, C., Foresti, F. (2015): Chromosomal mapping of repetitive DNA sequences in five species of *Astyanax* (Characiformes, Characidae) reveals independent location of U1 and U2 snRNA sites and association of U1 snRNA and 5S rDNA. *Cytogenet Genome Res.* 2015;146(2):144-52.

Simon, L., Rabanal, F. A., Dubos, T., Oliver, C., Lauber, D., Poulet, A., Vogt, A., Mandlbauer, A., Le Goff, S., Sommer, A., Duborjal, H., Tatout, Ch., Probst, A. V. (2018): Genetic and epigenetic variation in 5S ribosomal RNA genes reveals genome dynamics in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*.

Simpson, R.T. (1978): Structure of chromatosome, a chromatin particle containing 160 base pairs of DNA and all the histones. *Biochemistry* 17:5245-531.

Sochorová, J., Garcia, S., Gálvez, F., Symonová, R., Kovařík, A. (2017): Evolutionary trends in animal ribosomal DNA loci: introduction to a new online database.

Stults, D.M., Killen, M.W., Williamson, E.P., Hourigan, J.S., Vargas, H.D., Arnold, S.M., Moscow, J.A., Pierce, A.J. (2009): Human rRNA gene clusters are recombinational hotspots in cancer. *Cancer Res* 69, 9096–9104.

Sumner, A.T. (2003). *Chromosomes - Organization and Function*. 1st ed. Malden, Oxford, Melbourne, Berlin: Blackwell Publishing Company.

Suzuki, G., Kubota, S. (2011): 5S ribosomal DNA cluster of a lynx spider *Oxyopes sertatus* includes a histone H2B-like gene in the spacer region (NTS). *Chromosome Science* 14: 3-8.

Suzuki, S. (1954): Cytogenetical studies in spiders. III. Studies on the chromosomes of fifty-seven species of spiders belonging to seventeen families, with general considerations on chromosomal evolution. *Journal of science of the Hiroshima University, Series B*, 15, 23-136.

Swan, A. (2012): *Meiosis: Molecular mechanisms and cytogenetic diversity*. IntechOpen. ISBN 978-953-51-0118-5.

Svojanovská, H., Nguyen, P., Hřman, M., Tuf, I.H., Wahab, R.A., Haddad, C.R., Šťáhlavský, F. (2016): Karyotype evolution in harvestmen of the suborder Cyphophthalmi (Opiliones). *Cytogenet Genome Res.* 2016;148(2-3):227-36.

Szymanski, M., Barciszewska, M. Z., Erdmann, V. A., Barciszewska, J. (2002): 5S Ribosomal RNA Database. *Nucleic Acids Res.* 2002 Jan 1; 30(1): 176–178.

Šichová, J., Voleníková, A., Dincă, V., Nguyen, P., Vila, R., Sahara, K., Marec, F. (2015): Dynamic karyotype evolution and unique sex determination systems in Leptidea wood white butterflies. *BMC Evolutionary Biology*. 89.

- Tarn, W.Y., Steitz, J.A. (1997): Pre-mRNA splicing: the discovery of a new spliceosome doubles the challenge. *Trends Biochem. Sci.*22, 132–137.
- Turowski, T.W., Tollervey, D. (2015): Cotranscriptional events in eukaryotic ribosome synthesis. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 6: 129–139.
- Uberla, K., Platzer, C., Diamantstein, T., *et al.* (1991): Generation of competitor DNA fragments for quantitative PCR. *Genome Res.* 1: 136-139.
- Vierna, J., Jensen, K.T., Martinez-Lage, A., Gonzalez-Tizon, A.M. (2012): The linked units of 5S rDNA and U1 snDNA of razor shells (Mollusca: Bivalvia: Pharidae). *Heredity* 107:127–142.
- Warner, J.R. (1979): Distribution of newly formed ribosomal proteins in Hela cell fractions. *Cell Biol* 80: 767-772.
- Warner, W.A., Spencer, D., Trissal, M., Helton, N., Ley, T.J., Link D.C. (2015): Characterization of snoRNA Expression in Acute Myeloid Leukemia. *Blood. American Society of Hematology.*126:3649.
- Wheeler, W.C., J.A. Coddington, L.M. Crowley, D. Dimitrov, P.A. Goloboff, C.E. Griswold, G. Hormiga, L. Prendini, M.J. Ramírez, P. Sierwald, L. Almeida-Silva, F. Alvarez-Padilla, M.A. Arnedo, L.R. Benavides Silva, S.P. Benjamin, J.E. Bond, C.J. Grismado, E. Hasan, M. Hedin, *et al.* (2016): The spider tree of life: Phylogeny of Araneae based on target-gene analyses from an extensive taxon sampling. *Cladistics*, 1–43.
- White, M.J.D. 1973. *Animal Cytology and Evolution*. 3rd ed. London: Cambridge University Press.
- World Spider Catalog (2019). *World Spider Catalog*. Version 20.5. Natural History Museum Bern. Dostupné na: <http://wsc.nmbe.ch>. doi:10.24436/2.
- Xu, X., Liu, F., Chen, J., Ono, H., Agnarsson, I., Li, D., Kuntner, M. (2016): Pre- Pliocene geological events shaping diversification and distribution of primitively segmented spiders on East Asia margins. *Journal of Biogeography*,43, 1004-1019.
- Xu, X., Liu, F., Chng, R.CH., Chen, J., Xu, X., Zhang, Z., Ono, H., Pham, D.S., Norma-Rashid, Y., Arnedo, M.A., Kuntner, M. & Li, D. (2015): Extant primitively segmented spiders

have recently diverzified from an ancient lineage. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 282(1808), 20142486.

Yoshikawa H., Ishikawa H., Izumikawa K., Miura, Y., Hayano T., Isobe T., Simpson R.J., Takahashi N. (2015): Human nucleolar protein Nop52 (RRP1/NNP-1) is involved in site 2 cleavage in internal transcribed spacer1 of pre-rRNAs at early stages of ribosome biogenesis. Nucleic Acids Res 43, 5524–5536.

Zefa, E., Redü, D. R., Costa, M. K. M., Fontanetti, C. S., Gottschalk, M. S., Padilha, G. B., Silva, A. S., Martins, L. P. (2014): A new species of *Endecous* Saussure, 1878 (Orthoptera, Gryllidae) from northeast Brazil with the first X_1X_20 chromosomal sex system in Gryllidae. Zootaxa. 3847(1):125-32.