

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Ekologie



**Bc. Martina Koubová**

Molekulárně cytogenetická analýza adaptivní radiace gekonů rodu  
*Paroedura* (Squamata: Gekkota)

Molecular cytogenetic analysis of adaptive radiation in the gecko genus  
*Paroedura* (Squamata: Gekkota)

Diplomová práce

Školitel: doc. Mgr. Lukáš Kratochvíl, Ph.D.

Konzultantka: RNDr. Martina Pokorná, Ph.D.

Praha 2013

**Prohlášení:**

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

V Praze, 15. 8. 2013

.....  
Martina Koubová

## **Poděkování:**

Jelikož je tato práce mou poslední v rámci této vědecké skupiny, ráda bych na tomto místě poděkovala celému „gecko týmu“ za vřelé přijetí a vstřícnost během celé několikaleté spolupráce.

Děkuji svému školiteli doc. Mgr. Lukáši Kratochvílovi, Ph.D. za mé přijetí, za veškerý věnovaný čas, zvláště při mém psaní závěrečných prací, za poskytnutí odborných rad, cenných připomínek a především obdivuhodný elán a optimismus při pohlížení na budoucnost mého studia.

Děkuji konzultantce RNDr. Martině Pokorné Ph.D. za spoustu času a velkou trpělivost, které věnovala mému zaučení v laboratoři, za všechny praktické rady k metodice s tím spojené a za vlídnost a pomocnou ruku při jakémkoli problému.

Děkuji Bc. Marii Altmanové, jakožto spolehlivé a zodpovědné partnerce v laboratoři, za sdílení mnoha společných strastí při neúspěšných pracích bez zjevných příčin, zrovna tak jako radostí z už nečekaných úspěchů.

I need to thank to our newest team member Michail Rovatsos BSc., Ph.D. for preparing necessary solutions for my laboratory work, helping with animal (more often our) transfer and blood taking, for advices and ideas and every contribution to our team.

Mé dík patří i Mgr. Janu Červenkoví za zajištění projektu po technické stránce, vytvoření co nejlepšího zázemí pro celý tým a maximální snahu rozšířit počet druhů dostupných k výzkumu.

V neposlední řadě děkuji i Prof. Ing. Petru Rábovi, DrSc. za možnost využívat zázemí cytogenetické laboratoře v Liběchově, kde jsem zároveň poznala pár skvělých přátel.

Na závěr bych ráda poděkovala sekretariátu katedry Ekologie za velkou trpělivost a skvěle odvedenou práci při spravování našich čerpaných financí a samozřejmě Grantové agentuře Univerzity Karlovy (projekt č. 527112) a Grantové agentuře České republiky (projekt č. P506/10/0718) za finanční podporu celého projektu.

## Abstrakt

Rod *Paroedura* tvoří 17 dosud popsaných druhů endemických na Madagaskaru a Komorských ostrovech, kde prodělali výraznou adaptivní radiaci. Rod je monofyletický a existuje pro něj dobře podpořená hypotéza o fylogenetických vztazích. Jednotlivé druhy se podstatně liší velikostí i tvarem těla a typem habitatu, některé druhy se vyskytují sympatricky. Rod *Paroedura* patří do cytogeneticky málo prozkoumané čeledi Gekkonidae, která vykazuje vysokou variabilitu ve způsobech určování pohlaví a na rozdíl od bazálních linií gekonů značnou variabilitu v počtu a morfologii chromozomů. Dosud byly publikovány karyotypy pouze dvou druhů rodu (*P. picta*, *P. sp.*). Cílem mé diplomové práce bylo popsat karyotypy obou pohlaví všech dostupných zástupců rodu pomocí klasických i molekulárně cytogenetických metod, provést fylogenetickou analýzu karyotypové evoluce a chromozomálních přestaveb v rámci rodu za účelem posouzení významu těchto přestaveb během adaptivní radiace, a snaha detekovat pohlavní chromozomy.

Podářilo se mi získat karyotypy obou pohlaví u devíti druhů, zastupujících většinu hlavních fylogenetických linií rodu. Na základě výsledků můžeme rozdělit druhy do tří skupin podle diploidního počtu chromozomů a vzájemné podobnosti v morfologii makrochromozomů. U šesti druhů (*P. masobe*, *P. karstophila*, *P. oviceps*, *P. stumpffi*, *P. lohatsara*, *P. picta*) jsem pozorovala diploidní počet  $2n=36$  s největším párem makrochromozomů akrocentrickým či subtelocentrickým, třetím párem submetacentrickým a všemi ostatními chromozomy akrocentrickými. Dva druhy (*P. bastardi*, *P. ibityensis*) mají karyotyp  $2n=34$  s prvním i třetím párem submetacentrickým a všemi ostatními akrocentrickými. *P. gracilis* se s karyotypem  $2n=38$  a všemi chromozomy akrocentrickými zcela liší. Použitím metody FISH s telomerickou sondou jsem získala u většiny druhů signály pouze v telomerických oblastech. Intersticiální telomerické signály byly detekovány u *P. stumpffi* a *P. bastardi*. C-pruhováním v kombinaci s barvením DAPI jsem odhalila homomorfní pohlavní chromozomy typu ZZ/ZW s výrazně heterochromatinizovaným W u pěti druhů. Závěry fylogenetické analýzy získaných dat prezentuji v diskuzi.

## Klíčová slova:

Gekkota, *Paroedura*, cytogenetika, fylogeneze, karyotypová evoluce, adaptivní radiace, chromozomové přestavby, pohlavní chromozomy

## **Abstract**

*Paroedura* genus includes 17 described species endemic to Madagascar and the Comoros Islands, where they went through a significant adaptive radiation. The genus *Paroedura* is monophyletic and well supported hypothesis on phylogenetic relationships among its species was published. Species vary considerably in body size and morphology and in preferences for habitat, some species live in sympatry. The genus *Paroedura* belongs to cytogenetically poorly studied family Gekkonidae which exhibits high variability in modes of sex determination and in comparison with basal gecko lineages, also considerable variability in the chromosome number and morphology. Karyotypes of only two species of the genus (*P. picta*, *P. sp.*) have been published. The aim of my thesis was to describe karyotypes of both sexes in all available species of the genus using conventional and molecular cytogenetic methods, to perform the phylogenetic analysis of karyotype evolution and chromosomal rearrangements in the genus, to assess the role of these rearrangements in the speciation of the genus and to detect sex chromosomes.

I acquired karyotypes of both sexes in nine species representing the most of major phylogenetic lineages of the genus. According to the results, species can be divided into three groups according to diploid chromosome number and similarity of macrochromosome morphology. In six species (*P. masobe*, *P. karstophila*, *P. oviceps*, *P. stumpffi*, *P. lohatsara*, *P. picta*) I observed diploid chromosome number  $2n=36$  with the largest pair of macrochromosomes acrocentric or subtelocentric, the third pair submetacentric and all other chromosomes acrocentric. Two species (*P. bastardi*, *P. ibityensis*) have karyotype of  $2n=34$  with the first and the third pair submetacentric and all other acrocentric. *P. gracilis* completely differs with the karyotype  $2n=38$  and all macrochromosomes acrocentric. Using the FISH with the telomeric probe I mostly obtained the signal only in the telomeric regions. The interstitial telomeric signals were detected in *P. stumpffi* and *P. bastardi*. C-banding in combination with DAPI staining uncovered homomorphic ZZ/ZW sex chromosomes with heterochromatinized W chromosome in five species. The results of phylogenetic analysis of the data are presented in the discussion.

## **Keywords:**

Gekkota, *Paroedura*, cytogenetics, phylogeny, karyotype evolution, adaptive radiation, chromosomal changes, sex chromosomes

# OBSAH

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. ÚVOD.....</b>                                       | <b>1</b>  |
| 1.1 Cytogenetika skupiny Gekkota.....                     | 1         |
| 1.1.1 Diploidní počty a morfologie chromozomů.....        | 1         |
| 1.1.2 Způsoby určování pohlaví a pohlavní chromozomy..... | 3         |
| 1.1.3 Intersticiální telomerické sekvence.....            | 9         |
| 1.1.4 Chromozomové přestavby a speciace.....              | 10        |
| 1.2 Rod <i>Paroedura</i> .....                            | 12        |
| <b>2. CÍLE PRÁCE.....</b>                                 | <b>15</b> |
| <b>3. MATERIÁL A METODIKA.....</b>                        | <b>16</b> |
| 3.1 Příprava chromozomových preparátů.....                | 16        |
| 3.1.1 Kultivace leukocytů.....                            | 16        |
| 3.2 Vizualizace chromozomů.....                           | 18        |
| 3.2.1 Barvení chromozomů.....                             | 18        |
| 3.2.2 C-pruhování.....                                    | 18        |
| 3.3 Telomerická FISH.....                                 | 20        |
| 3.4 Zpracování obrazového materiálu.....                  | 21        |
| 3.5 Klasifikace chromozomů.....                           | 22        |
| <b>4. VÝSLEDKY.....</b>                                   | <b>23</b> |
| 4.1 <i>Paroedura masobe</i> .....                         | 23        |
| 4.2. <i>Paroedura gracilis</i> .....                      | 26        |
| 4.3 <i>Paroedura karstophila</i> .....                    | 29        |
| 4.4 <i>Paroedura oviceps</i> .....                        | 32        |
| 4.5 <i>Paroedura stumpffi</i> .....                       | 35        |
| 4.6 <i>Paroedura lohatsara</i> .....                      | 38        |
| 4.7 <i>Paroedura picta</i> .....                          | 41        |
| 4.8 <i>Paroedura bastardi</i> .....                       | 44        |
| 4.9 <i>Paroedura ibityensis</i> .....                     | 47        |
| <b>5. DISKUZE.....</b>                                    | <b>51</b> |
| <b>6. ZÁVĚR.....</b>                                      | <b>59</b> |
| <b>SEZNAM LITERATURY.....</b>                             | <b>60</b> |
| <b>PŘÍLOHA.....</b>                                       | <b>68</b> |

# 1. ÚVOD

## 1.1 Cytogenetika skupiny Gekkota

U šupinatých plazů obecně pozorujeme velmi nerovnoměrné tempo v diverzifikaci karyotypů. Některé skupiny jsou v počtu a morfologii chromozomů velmi konzervativní (z hadů Boidae, z ještěřů Varanidae, Iguanidae s. s.), zatímco jiné vykazují značnou variabilitu (z ještěřů nejvíce Scincomorpha) (Olmo 2005, Olmo & Signorino 2011). Podle nejnovějších studií (Ferguson-Smith & Trifonov 2007, Shedlock *et al.* 2007, Olmo 2008, Janes *et al.* 2010, Pokorná *et al.* 2011, Pokorná *et al.* 2012) se ale dá předpokládat, že obecně je u plazů tempo karyotypové evoluce oproti savcům značně pomalé. Gekoni se však na první pohled trochu vymykají a v porovnání s ostatními skupinami šupinatých plazů vykazují variabilitu v počtu a morfologii chromozomů i ve způsobech určování pohlaví a stupni diferenciaci pohlavních chromozomů (Pokorná & Kratochvíl 2009, Gamble 2010).

Předkládaná diplomová práce navazuje na mou práci bakalářskou, ve které jsem provedla fylogenetickou analýzu cytogenetických dat 162 druhů gekonů získaných z chromozomové databáze Chromorep (Olmo & Signorino 2011) a z primárních publikací. Vstupními daty byly diploidní počty chromozomů a typ pohlavních chromozomů druhů umístěných napříč celým infrařádem Gekkota. Data jsem vynesla na kladogram konstruovaný na základě aktuální fylogenetické hypotézy skupiny, založené na molekulárních datech (Gamble *et al.* 2011), doplněné o parciální kladogramy užších fylogenetických linií (Carranza *et al.* 2002, Jonniaux & Kumazawa 2007, Oliver *et al.* 2010, Nielsen *et al.* 2011, Oliver & Bauer 2011, Heinicke *et al.* 2012, Oliver *et al.* 2012) (Obr. 1 v příloze). Účelem bylo rekonstruovat ancestrální stav počtu chromozomů pro skupinu Gekkota metodou maximální parsimonie, prozkoumat trendy karyotypové evoluce ve skupině a zmapovat výskyt pohlavních chromozomů.

### 1.1.1 Diploidní počty a morfologie chromozomů

Popsaná analýza ancestrální stav počtu chromozomů pro skupinu Gekkota bohužel nerozřešila, a to z důvodu nedostatečného stavu poznání o vnitřních fylogenetických vztazích některých užších linií, které jsem v kladogramu musela ponechat jako nerozřešené. Podle výsledků analýzy tak mohl být původní diploidní počet  $2n=34$  i  $2n=38$ . A tak můžeme jen částečně podpořit názory starších autorů, že ancestrální karyotyp gekonů je  $2n=38$  se všemi chromozomy akrocentrickými (Gorman 1973, King 1977a, 1990). Výsledky nám ovšem

umožnily bližší vhléd do karyotypové evoluce skupiny Gekkota, jelikož rozdělily fylogenetický strom na dvě snadno rozlišitelné části (Obr. 1 v příloze).

Bazálnější linie s čeleděmi Diplodactylidae, Carphodactylidae a Pygopodidae mají počet chromozomů víceméně konzervativní, velká většina druhů má  $2n=38$ . Nejvariabilnější v počtu chromozomů v této linii je rod *Diplodactylus*, u kterého nacházíme počty od 28 do 38 chromozomů, v morfologii je tento rod naopak relativně uniformní. Karyotypy variabilní v morfologii najdeme u rodu *Rhacodactylus*, kde karyotyp druhu *R. ciliatus* se všemi chromozomy akrocentrickými je příkladem původnějšího karyotypu, zatímco karyotyp *R. auriculatus* s takřka všemi chromozomy dvouramennými je odvozený prostřednictvím mnoha pericentrických inverzí (King 1987). Pericentrické inverze jsou přestavby naprosto dominující v celé této linii.

V druhé části, vzdálenější od kořene stromu, s čeleděmi Eublepharidae, Sphaerodactylidae, Phyllodactylidae a Gekkonidae, je karyotyp velmi proměnlivý. V těchto liniích tedy docházelo k mnohem častějším chromozomovým přestavbám zahrnujícím různé typy inverzí a chromozomových štěpení, dominovali ovšem patrně Robertsonské fúze. Ve srovnání s ostatními čeleděmi v této linii je čeleď Eublepharidae karyotypově nejkonzervativnější. Přestavby jsou evolučně velmi staré a konzervativně distribuované ve dvou liniích – v linii zahrnující rody *Coleonyx* a *Aeluroscalabotes* a japonské linii rodu *Goniurosaurus*. I v rámci čeledi Eublepharidae se setkáme s různou mírou diferenciací karyotypu. Např. *G. splendens* má velmi odvozený karyotyp s převahou metacentrických a submetacentrických chromozomů na úkor akrocentrických. Vysoce specializovaný karyotyp tohoto druhu je odvozený od ancestrálního karyotypu příbuzného druhu *G. lichtenfelderi*, se všemi chromozomy akrocentrickými vlivem Robertsonských fúzí (Pokorná *et al.* 2010). Karyotypy druhů v čeledích Sphaerodactylidae, Phyllodactylidae a Gekkonidae jsou nejvíce proměnlivé z celé skupiny Gekkota. V čeledi Sphaerodactylidae se setkáme s druhem *Gonatodes taniae*, který má karyotyp o nejnižším dokumentovaném počtu chromozomů ze všech plazů -  $2n=16$  (Schmid *et al.* 1994). V kontrastu k ostatním příslušníkům stejného rodu má výhradně meta- a submetacentrické chromozomy, které mají původ v mnohačetných centrických fúzích. V rámci čeledi Sphaerodactylidae je díky tomu dokumentován největší rozptyl v diploidním počtu chromozomů ze všech čeledí Gekkota – od  $2n=16$  k  $2n=42$  chromozomům druhu *Euleptes europaea* (Gornung *et al.* 2013). Druhy s doposud nejvyšším dokumentovaným diploidním počtem mezi všemi gekony najdeme v čeledi Gekkonidae - *Hemidactylus platyurus* a *H. bowringii* mají  $2n=46$  (Ota *et al.* 1987, Nakamura 1932). Tento diploidní počet předčí už jen polyploidní partenogenetické druhy *H. stejnegeri* ( $3n=56$ ),



*H. vietnamensis* (3n=60), *H. binoei* (3n=63), *L. lugubris* (3n=66) a *H. garnotii* (3n=70) (Ota *et al.* 1989, Darevsky *et al.* 1984, Moritz 1984a, Moritz & King 1985, Kluge & Eckardt 1969). Rod *Hemidactylus* bezesporu patří k rodům s vůbec největší karyotypovou variabilitou z celé skupiny Gekkota, podobně jako rod *Gehyra* (King 1979, 1982a, 1982b, 1984, Moritz 1984b), taktéž z čeledi Gekkonidae.

Obecně je ve skupině Gekkota patrný směr evoluce od akrocentrických k metacentrickým chromozomům. Ovšem obecný jednoznačný trend ve změně diploidního počtu chromozomů a míře přestaveb nelze vysledovat (Koubová 2011).

### 1.1.2 Způsoby určování pohlaví a pohlavní chromozomy

Gekoni jsou charakterističtí velkou evoluční plasticitou ve způsobech určování pohlaví. V rámci skupiny Gekkota rozlišujeme dva hlavní způsoby určení pohlaví: Teplotně určené pohlaví (temperature-dependent sex determination, TSD) a genotypově určené pohlaví (genotypic sex determination, GSD).

U TSD determinuje pohlaví primárně vnější faktor - teplota, ve které dochází k vývoji embryí. Pro tento způsob určení pohlaví je typický různý výsledný poměr pohlaví u snůšek inkubovaných za různých teplot a absence pohlavních chromozomů. TSD se tradičně rozlišuje na tři typy: I.A, I.B a II. (Valenzuela 2004, Pokorná & Kratochvíl 2009). U typu I.A je poměr pohlaví vychýlený ve prospěch samců za nižších a ve prospěch samic za vyšších teplot, zatímco u typu I.B je tomu právě naopak. U TSD typu II. se rodí více samic při inkubaci snůšky jak za vysokých, tak nízkých teplot a při středních teplotách dominují samci. Toto rozdělení je především teoretické, protože jednoznačně klasifikovat druhy do těchto skupin je v praxi značně komplikované a protože výsledky studií zabývajících se touto problematikou přímo závisí na rozsahu prováděných experimentů.

Systém teplotně určeného pohlaví (TSD) byl u gekonů dobře dokumentován pouze u druhů *Eublepharis macularius* a *Hemitheconyx caudicinctus* (Eublepharidae), u obou je přítomné TSD typu II. (Viets *et al.* 1990, 1993). U druhu *E. macularius* bylo experimentálně prokázáno, že inkubační teplota neovlivňuje jen poměr pohlaví mláďat, ale také jejich fenotyp, rychlost růstu, hladiny hormonů v krvi a reprodukční chování v dospělosti (Coomber *et al.* 1997, Crews 1998). Ačkoli data nejsou natolik ověřena, nevyrovnaný poměr pohlaví z různých teplot nasvědčuje přítomnosti teplotního určení pohlaví i v rámci rodů *Rhacodactylus* (Diplodactylidae), *Phelsuma* (Gekkonidae), *Tarentola* (Gekkonidae) a *Goniurosaurus* (Eublepharidae) (Gamble 2010).

Druhy s genotypově určeným pohlavím (GSD) mají vyvinuté pohlavní chromozomy. U plazů se vyskytují dva hlavní systémy pohlavních chromozomů: savčí typ (typ *Drosophila*) - XX/XY charakteristický samčí heterogamií a ptačí typ (typ *Abraxas*) - ZZ/ZW se samičí heterogamií (Pokorná & Kratochvíl 2009, Gamble 2010). O pohlaví jedinců rozhodují genetické faktory při oplození.

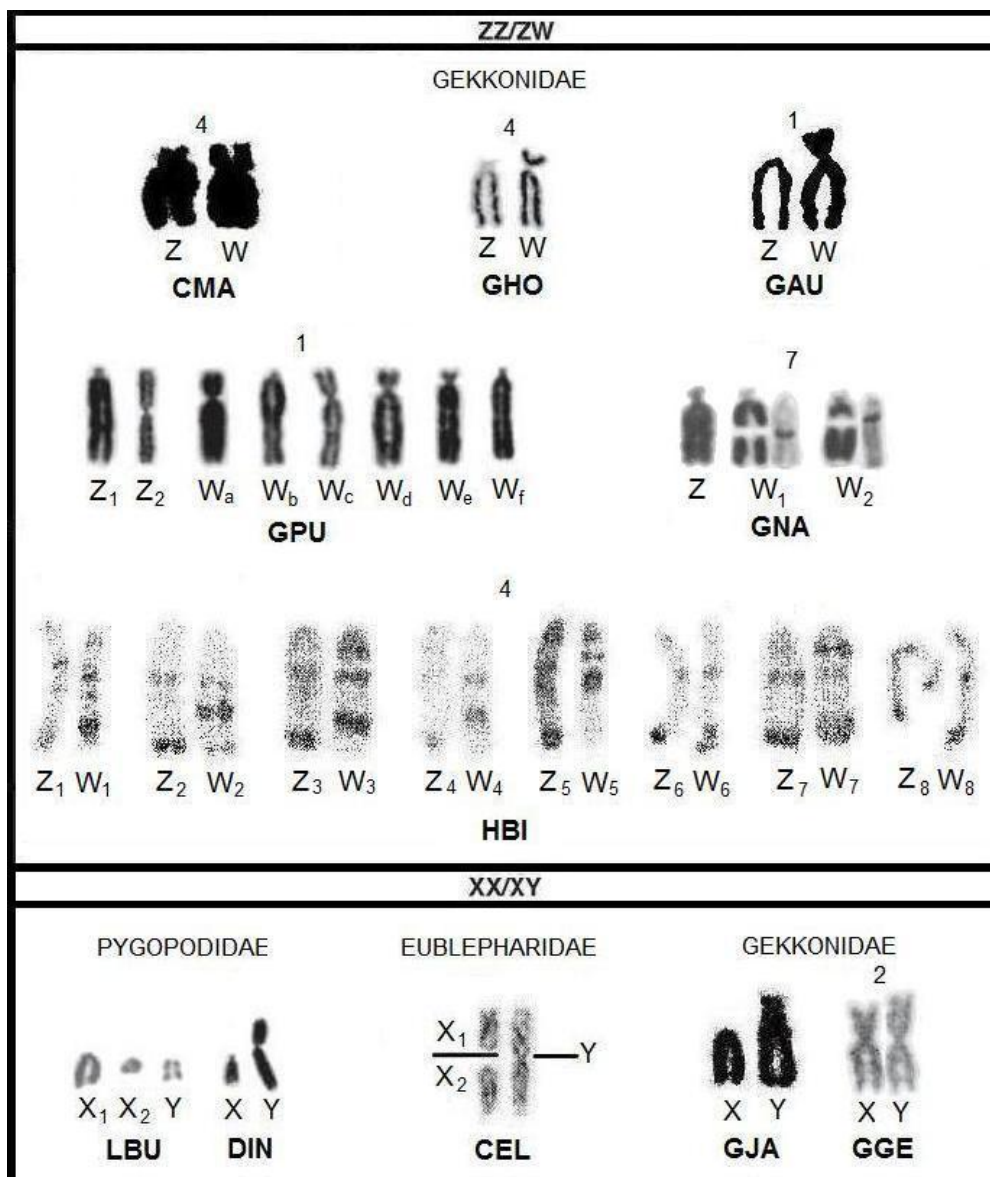
Pohlavní chromozomy typu ZZ/ZW a XX/XY u obratlovců vznikly v evoluci pravděpodobně nezávisle z různých párů autozomů diferenciací genu pro determinaci pohlaví (Ohno 1967, Matsuda *et al.* 2007, Pokorná & Kratochvíl 2009). Na stejném chromozomu jako jsou lokalizovány geny determinující pohlaví, se postupně akumulují alely s pohlavně antagonistickými mutacemi, tj. mutacemi zvýhodňujícími jedno pohlaví, ale znevýhodňující druhé (Rice 1984). Proto dochází v evoluci pohlavních chromozomů k zamezení rekombinace mezi chromozomem nesoucím gen determinující pohlaví s jeho homologickým protějškem. Nedostatečná rekombinace následně vede k akumulaci repetitivních sekvencí nebo k delecím či jiným mutacím na nepárovém chromozomu a jeho postupné degeneraci, jejímž výsledkem je heteromorfie mezi X a Y nebo Z a W (Vicoso *et al.* 2013). U savců je hlavním genem určujícím pohlaví *Sry* přítomný na chromozomu Y spouštějící maskulinizaci gonády. U ptáků je hlavním genem určujícím pohlaví patrně *Dmtr1* přítomný na chromozomu Z a chybějící na W. U jiných plazů geny determinující pohlaví dosud nebyly identifikovány.

Pohlavní chromozomy mohou být homomorfní – morfologicky nerozlišitelné nebo heteromorfní – rozdílné ve tvaru či velikosti. Pohlavní chromozomy homomorfního typu se teoreticky mohou lišit pouze přítomností jednoho pohlaví determinujícího genu (Matsuda *et al.* 2007), a proto je jejich odhalení často velice komplikované a vyžaduje použití pokročilejších molekulárně cytogenetických metod. Pohlavní chromozomy s nízkou úrovní diferenciací jsou obecně považovány za rané evoluční stadium vzniku pohlavních chromozomů (Vicoso *et al.* 2013), zatímco heteromorfní pohlavní chromozomy jsou vysoce specializované a uplatňují se u nich specifické adaptace s tím spojené, jako např. kompenzace genové dávky nebo inaktivace během meiózy (Vicoso & Bachtrog 2013).

Teplotně určené pohlaví a genotypově určené pohlaví nejsou podle některých autorů dva oddělené módy, ale spíše tvoří extrémní stavy určitého kontinua (Sarre *et al.* 2004), což podporuje výskyt pohlavních chromozomů u některých druhů s prokázaným TSD nebo existence pohlavních revertantů, u kterých typ gonád neodpovídá genetické výbavě jedince. Pohlavní chromozomy u druhů s teplotním určením pohlaví byly objeveny například u scinka *Bassiana duperreyi* (Shine *et al.* 2002). U tohoto druhu a u agamy *Pogona vitticeps* byl dokumentován rovněž výskyt pohlavních revertantů (Radder *et al.* 2008, Quinn *et al.* 2007).

Distribuce pohlavně determinačních mechanismů ve fylogenezi není nijak segregovaná, je tedy jasné, že v evoluci došlo hned několikrát k přechodům mezi nimi. Přechody od TSD ke GSD v rámci linie jsou dokumentovány poměrně hojně (Agamidae, Chamaeleonidae, Eublepharidae), zatímco přechod opačným směrem nebyl zatím v žádné skupině jednoznačně podpořený a heteromorfní pohlavní chromozomy mohou být tedy díky vysoké míře specializace chápány jako konečné evoluční stádium a tedy jako jakási evoluční past (Pokorná & Kratochvíl 2009). V současnosti nicméně víme, že i přeměna pohlavních chromozomů zpět na autozomy je možná. Tento jev byl popsán u rodu *Drosophila* (Vicoso & Bachtrog 2013). Tato studie dokládá, že dediferenciace z heteromorfního pohlavního chromozomu zpět na autozom je možná, ale je zároveň spjatá s jevy, které negativně ovlivňují zdatnost jednoho pohlaví (v tomto případě samce). Tato omezení pravděpodobně působí proti tomu, aby k dediferenciaci pohlavních chromozomů v evoluci docházelo často (Vicoso & Bachtrog 2013).

V rámci své bakalářské práce jsem shromáždila všechna publikovaná data o pohlavních chromozomech ve skupině Gekkota. U gekonů se častěji vyskytuje ZZ/ZW systém pohlavních chromozomů (Obr. 2). Tento systém byl popsán u druhů: *Christinus marmoratus* (Gekkonidae), *Gekko hokouensis* (Gekkonidae), *Heteronotia binoei* (Gekkonidae), *Gehyra australis* (Gekkonidae), *Gehyra purpurascens* (Gekkonidae) a *Gehyra nana* (Gekkonidae). Svě zastoupení ve skupině Gekkota má ale i typ XX/XY s heterozygotními samci. Tento typ byl popsán u druhů: *Delma inornata* (Pygopodidae), *Gekko gecko* (Gekkonidae) a *Gekko japonicus* (Gekkonidae). U gekonů se můžeme také setkat s typem  $X_1X_2Y$  neopohlavních chromozomů - druhy *Lialis burtonis* (Pygopodidae) a *Coleonyx elegans* (Eublepharidae) (shrnuto v Koubová 2011).



**Obr. 2: Pohlavní chromozomy skupiny Gekkota;** CMA- *Christinus marmoratus* (King & Rofe 1976), GHO- *Gekko hokouensis* (Kawai *et al.* 2009), GAU- *Gehyra australis* (King 1977b), GPU- *Gehyra purpurascens* (Moritz 1984), GNA- *Gehyra nana* (Moritz 1986), HBI- *Heteronotia binoei* (Moritz 1984a), LBU- *Lialis burtonis* (Gorman & Gress 1970), DIN- *Delma inornata* (King 1990), CEL- *Coleonyx elegans* (Pokorná *et al.* 2010), GJA- *Gekko japonicus* (Yoshida & Itoh 1974), GGE- *Gekko gecko* (Solleder & Schmid 1984); indexy u Z a W značí jednotlivé chromozomové varianty, číslice nad chromozomy udávají pořadí páru v karyotypu daného druhu, pokud není uvedeno, jedná se o poslední chromozomový pár/trivalent (modifikováno z Ezaz *et al.* 2010)

Pohlavní chromozomy jednotlivých druhů gekonů se mezi sebou liší morfologií, velikostí, pořadím v karyotypu, vnitřní strukturou i úrovní diferenciace. Morfologicky nejpodobnější jsou si pohlavní chromozomy druhů *Christinus marmoratus*, *Gekko hokouensis* a *Gehyra australis*, ale zatímco u druhu *C. marmoratus* vznikl odvozený tvar chromozomu W prostřednictvím pericentrických inverzí (King & Rofe 1976, King & King 1977), rozdílné uspořádání některých genů na Z oproti W chromozomu u *G. hokouensis* vysvětlují serie paracentrických inverzí (Kawai *et al.* 2009). U *G. australis* zase metoda C- pruhování odhalila

heterochromatinizaci celého přidaného ramene chromozomu W což nasvědčuje vznik heteromorfie replikací chromatinu (King 1977b).

V souvislosti s pohlavními chromozomy *G. hokouensis* je nutné zmínit, že u tohoto druhu byla dokumentována homologie některých genů vázaných na Z a W s geny na Z chromozomu kura domácího (*Gallus gallus*) (Kawai *et al.* 2009), která je některými autory interpretována jako vznik ZZ/ZW systému pohlavních chromozomů tohoto druhu a ptáků ze stejného páru chromozomů jejich společného předka (Graves 2009). Nicméně homologie Z kura domácího s autozomy některých druhů hadů, želv a ostatních skupin ještěřů včetně ostatních zkoumaných gekonů dokládá, že se jedná o homoplázií (Pokorná *et al.* 2011).

U *G. nana* byla u samic detekována heteromorfie pouze v pozici aktivního organizátoru jadérka, což pravděpodobně představuje teprve počáteční stav v diferenciaci ZZ/ZW systému heteromorfních pohlavních chromozomů (Moritz 1986). Nízkou úroveň diferenciaci vykazují i pohlavní chromozomy druhu *H. binoei*, které se mezi sebou také neliší morfologií, ale pouze vnitřní strukturou chromatinu odhalenou pomocí C- pruhování (Moritz 1984a).

*Gehyra purpurascens* vykazuje vysokou míru vnitrochromozomových přestaveb u pohlavních chromozomů (Moritz 1984b). U druhu bylo identifikováno 6 morf pohlavního chromozomu W, které se mezi sebou liší hlavně díky paracentrickým a pericentrickým inverzím (Moritz 1984b) a detailní analýza pomocí N-, C- a G- pruhování indikuje alespoň dvě nezávislá odvození heteromorfního W z homomorfních elementů (Moritz 1990). U jednoho samce byla objevena i heterozygotnost na chromozomu Z, který na rozdíl od drtivé většiny homozygotních samců s oběma akrocentrickými Z chromozomy vlastnil jeden Z chromozom metacentrický. Tato varianta chromozomu Z vznikla z původního akrocentrického Z chromozomu pericentrickou inverzí (Moritz 1984b).

*Gekko gekko* má pohlavní chromozom X submetacentrický, zatímco Y metacentrický, ale oba chromozomy sdílejí velmi podobný vzor C-pruhování a při samčí meióze se k sobě chovají jako homologické autozomy, z čehož autoři usuzují, že se nachází teprve v raném stadiu evoluce (Solleder & Schmid 1984).

Heteromorfní pohlavní chromozomy druhu *Gekko japonicus* se od příbuzného druhu *G. gekko* velmi liší. X chromozom je telocentrický a nejmenší z celého karyotypu, zatímco Y je větší akrocentrik (Yoshida & Itoh 1974). Pozoruhodný je fakt, že pozdější inkubační experimenty naopak poukazují na teplotní určení pohlaví u tohoto druhu (Tokunaga 1985). Vysvětlením může být fakt, že zkoumaní gekoni jsou ve skutečnosti odlišné kryptické druhy, čemuž nahrává i fakt, že Chen (1986) objevil u *G. japonicus* karyotyp velmi odlišný od toho

prezentovaného Yoshidou a Itohem (1974) bez jakékoli evidence heteromorfních pohlavních chromozomů.

Druhy *Coleonyx elegans* a *Lialis burtonis* sdílejí  $X_1X_2Y$  systém pohlavních chromozomů. Oba druhy mají pohlavní chromozom Y metacentrický a  $X_1$ ,  $X_2$  akrocentrické, ale druhy se liší mezi sebou diploidním počtem chromozomů (*C. elegans*: samci  $2n=31$ , samice  $2n=32$ ; *L. burtonis*: samci  $2n=33$ , samice  $2n=34$ ). Metacentrický chromozom Y druhu *Coleonyx elegans* nejspíš vznikl centrickou fúzí dvou akrocentriků doprovázenou ztrátou přilehlých telomerických sekvencí (Pokorná *et al.* 2010). Pohlavní chromozomy tohoto druhu ale nejspíš nebudou homologické s pohlavními chromozomy *Lialis burtonis*, jelikož se mezi nimi na fylogenetickém stromě větví řada druhů s teplotně určeným pohlavím. Pohlavní chromozomy *Lialis burtonis* by mohly být eventuálně homologické pohlavním chromozomům druhu *Delma inornata*, z nichž X je akrocentrik zatímco Y větší submetacentrik. Pohlavní chromozom  $X_2$  u *Lialis* by mohl být homologický s X-chromozomem *Delma*. Y chromozom *D. inornata* by mohl být derivovaný z chromozomu X adicí chromozomového ramene (King 1990).

Heteromorfie byla prokázána i v karyotypech druhů *Phyllodactylus lanei* (Phyllodactylidae), *Dixonius siamensis* (Gekkonidae), *Gonatodes ceciliae* (Sphaerodactylidae), *Lygodactylus picturatus* (Gekkonidae), *Euleptes europaea* (Sphaerodactylidae), *Cyrtodactylus pubisculus* (Gekkonidae), *Lepidodactylus lugubris* (Gekkonidae), ale zatím nebyla spolehlivě prokázána její vazba na pohlaví buď v důsledku nedostatečného množství prozkoumaných jedinců, nebo partenogenetického způsobu reprodukce (Koubová 2011). U některých dalších druhů vyrovnané poměry pohlaví při inkubačních experimentech nasvědčují přítomnost GSD (např. *Coleonyx variegatus*, *Goniurosaurus luii*, *Goniurosaurus lichtenfelderi*, *Paroedura picta*; Gamble 2010 podle Seufer *et al.* 2005), ale heteromorfní pohlavní chromozomy v jejich karyotypu nebyly objeveny. U jiných druhů inkubační experimenty také naznačují GSD, ale jejich karyotypy vůbec neznáme.

Po vynesení dat o pohlavních chromozomech na fylogenetický strom skupiny Gekkota (Obr. 1 v příloze) nebylo možné jednoznačně vyvozovat závěry o jejich případné homologii mezi jednotlivými druhy ani jednoznačně určit nezávislý vznik. Ale protože v rámci Gekkota není znám jediný rod, kde by všechny druhy vlastnily heteromorfní pohlavní chromozomy (Moritz 1990), pohlavní chromozomy pravděpodobněji vznikly ve skupině několikrát nezávisle a nejspíš v relativně nedávné evoluční historii, možná z ancestrálního teplotně určeného pohlaví (Koubová 2011).

### 1.1.3 Intersticiální telomerické sekvence

Telomery jsou specializované nukleoproteinové struktury kryjící konce chromatid. Jejich hlavní funkcí je zajišťování stability a integrity chromozomů. U obratlovců se DNA telomer skládá z (TTAGGG) $_n$  repetice. Telomerické sekvence jsou buď lokalizovány na koncových částech chromozomu (pravé telomery) nebo ve vnitřní části chromozomu - tzv. intersticiální telomerické sekvence (ITS). Tyto ITS je možné detekovat pomocí metody FISH s telomerickou sondou, která se na ně váže stejně tak jako na pravé telomery.

Intersticiální telomerické signály jsou považovány za pozůstatky chromozomových přestaveb, které se odehrály v karyotypové evoluci kdysi v minulosti (Ventura *et al.* 2006, Ruiz-Herrera *et al.* 2008). Nejčastěji dokumentovanými přestavbami zodpovědnými za přesun telomerických repetice do vnitřních částí chromozomů jsou Robertsonské fúze, při kterých dochází k přesunu telomerických repetice do pericentromerických oblastí sfúzovaných chromozomů, nebo tandemové fúze, kdy se ITS nachází uvnitř ramen nově vzniklých chromozomů.

ITS v centromerách byly pozorovány především u chromozomů mnoha savců, ale i u ostatních tříd obratlovců (Ruiz-Herrera *et al.* 2008) a tedy i některých plazů (např. u tejuvčků rodu *Leposoma*; Pellegrino *et al.* 1999). V rámci gekonů byly ITS v pericentromerických oblastech poprvé dokumentovány u druhu *Gonatodes taniae* (Squamata, Sphaerodactylidae), který je výjimečný karyotypem s nejnižším dokumentovaným diploidním počtem ( $2n=16$ ) mezi všemi plazy (Schmid *et al.* 1994). Rozsáhlé intersticiální telomerické bloky v centromerách jsou typické pro všechny chromozomy tohoto gekona. Je pravděpodobné, že vysoce odvozený karyotyp tohoto druhu s výhradně metacentrickými či submetacentrickými chromozomy byl odvozen od karyotypu společného předka s příbuzným druhem *G. vittatus* ( $2n=32$ , se všemi chromozomy akrocentrickými) prostřednictvím mnohačetných centrických fúzí. Telomerické repetice v centromerách u *G. taniae* dokonce vykazují násobně silnější signál než v samotných telomerách, s velkou pravděpodobností zároveň sehrála svou roli amplifikace krátkých telomerických repetice, které tvoří přirozenou součást repetitivní DNA v heterochromatinizovaných pericentromerických oblastech (Schmid *et al.* 1994). ITS byly pozorovány i v karyotypu gekona *Gymnodactylus amarali* (Phyllodactylidae), který vykazuje vnitrodruhovou variabilitu - byly pozorovány tři rozdílné cytotypy (A:  $2n=40$ , B:  $2n=38$  a C:  $2n=39$ ). Cytotyp C se od cytotypu A liší pouze heterozygotností pro Robertsonskou fúzi reprezentovanou velkým metacentrickým chromozomem, který tvoří trivalent se dvěma středními akrocentricky 3. a 4. páru cytotypu A. U cytotypu B došlo ke dvěma centrickým fúzím a akrocentrici 3. a 4. páru cytotypu A zde

tvoří jediný submetacentrický pár. Tyto přestavby dokládá vzorec C-pruhů na sfúzovaných chromozomech, které mají také ITS v pericentromerických oblastech (Pellegrino *et al.* 2009). Nejnovější práce dokumentující ITS u gekonů je cytogenetická studie druhu *Euleptes europaea* (Sphaerodactylidae), v jehož karyotypu byly detekovány intersticiální telomerické signály u prvního a druhého subtelocentrického páru a u některých párů s velmi krátkými p-raménky (páry 8 a 13). Tento druh se naopak vyznačuje nejvyšším diploidním počtem chromozomů v rámci celé čeledi Sphaerodactylidae a jedním z nejvyšších v rámci celé skupiny Gekkota (vyjma polyploidních druhů) –  $2n=42$  (Gornung *et al.* 2013). ITS v pericentromerických oblastech subtelocentrických chromozomů tedy nebudou pozůstatkem centrických fúzí, ale buď jiných přestaveb, nebo spíše výsledkem amplifikace repetice, které tvoří přirozenou součást heterochromatinu, čemuž nasvědčuje i zjevná amplifikace telomerických signálů u telocentrických chromozomů tohoto druhu.

#### 1.1.4 Chromozomové přestavby a speciace

Olmo (2005) prokázal exponenciální závislost počtu druhů v jednotlivých skupinách plazů na míře chromozomových přestaveb u nich dokumentovaných.

U některých hlodavců byla nalezena přímá souvislost mezi diploidním počtem chromozomů a haplotypovou diverzitou. Čím vyšší  $2n$ , tím vyšší míra meiotické rekombinace a následně vyšší haplotypová diverzita – tento trend byl popsán u slepců rodu *Spalax*. Právě různorodost haplotypů může znamenat větší adaptabilitu populace na nepředvídatelné ekologické události v čase a prostoru. Tuto hypotézu podporuje nenáhodná distribuce haplotypů v rámci rodu v prostředích s různými ekologickými podmínkami (Nevo *et al.* 1994).

Je známo, že chromozomové přestavby mohou mít vliv na speciaci, popř. dokonce adaptivní radiaci prostřednictvím reprodukčních bariér (King 1995, Riesenberg 2001, Navarro & Barton 2003, Brown & O'Neill 2010). Velká chromozomová variabilita ale nemusí hned nutně znamenat reprodukční izolaci a následnou speciaci. Například u druhu *Sceloporus grammicus* s vysokou chromozomovou variabilitou pozorujeme případy vyváženého polymorfismu, kdy meiózou vznikají gamety s vyrovnanou chromozomovou výbavou a k žádným speciacím tedy nedochází (Sites 1983, Porter & Sites 1986). Proto hraje pravděpodobně velkou roli v evoluci plazích chromozomů rovněž míra fixace chromozomových přestaveb z heterozygotního na homozygotní stav (Olmo 2005). Ta je ovlivněna mírou rekombinace mezi chromozomy. Míru rekombinace mezi chromozomy na



úrovni jedince mohou ovlivňovat faktory jako např. teplota, pohlaví, nebo morfologie samotných chromozomů.

Za faktory ovlivňující fixaci určitého karyotypu v populaci a jeho následné šíření jsou tradičně považovány stupeň sociality (Wilson *et al.* 1975, Bush *et al.* 1977, Olmo 2005 podle Larson *et al.* 1984), míra vagility (Bickham & Baker 1979) a geografická izolace (King 1995). U plazů na rozdíl od savců studie příliš nepodporují vliv faktorů jako socialita a vagilita na fixaci chromozomových variant. Stupně sociality plazů jsou s těmi savčími neporovnatelné a to i u teritoriálních druhů (Olmo 2005). Některé výzkumy ukazují, že vyšší pravděpodobnost fixace přestaveb v karyotypu a díky tomu větší karyotypovou variabilitu mají méně pohyblivé druhy (Bickham & Baker 1979). Nicméně pokud porovnáme míru chromozomových přestaveb skupiny Iguanidae, kde je většina druhů teritoriálních, a Scincomorpha, kde naopak převažují druhy s aktivním foragingem, vykazují vyšší chromozomovou variabilitu Scincomorpha, navíc obě skupiny zahrnují druhy jak s vysokou, tak nízkou chromozomovou variabilitou nezávisle na míře jejich vagility. U plazů tedy bude hrát rozhodující roli pro fixaci chromozomových mutací spíše geografická izolace (Olmo 2005), tuto hypotézu podporují i data o gekonech.

U gekonů se setkáváme s rozsáhlou chromozomovou variabilitou například u druhů *Christinus marmoratus* (King & Rofe 1976), *Heteronotia binoei* (Moritz 1983, 1984a, 1990), *Tarentola mauritanica* (Odierna *et al.* 1994), *Diplodactylus tessellatus* (Oliver *et al.* 2007), nebo v rámci *Gehyra variegata-punctata* komplexu (King 1984). U rodu *Gehyra* bychom mohli předpokládat, že jeho karyotypová variabilita, která vedla až k popsání nových druhů v rámci komplexu, je důsledkem právě ostrovního charakteru rozšíření tohoto rodu a efektu zakladatele. Ovšem rod *Phelsuma* je rozšířen na Madagaskaru a přilehlých ostrovech a je naopak velmi konzervativní v karyotypu. Ačkoli detaily původů jednotlivých reprodukčně izolovaných chromozomových ras výše uvedených druhů ještě nejsou podrobně prostudovány, podle jejich aktuálního geografického rozšíření s minimem nebo absencí hybridních zón se zdá, že vznikly spíše alopatrickou či parapatrickou speciací.

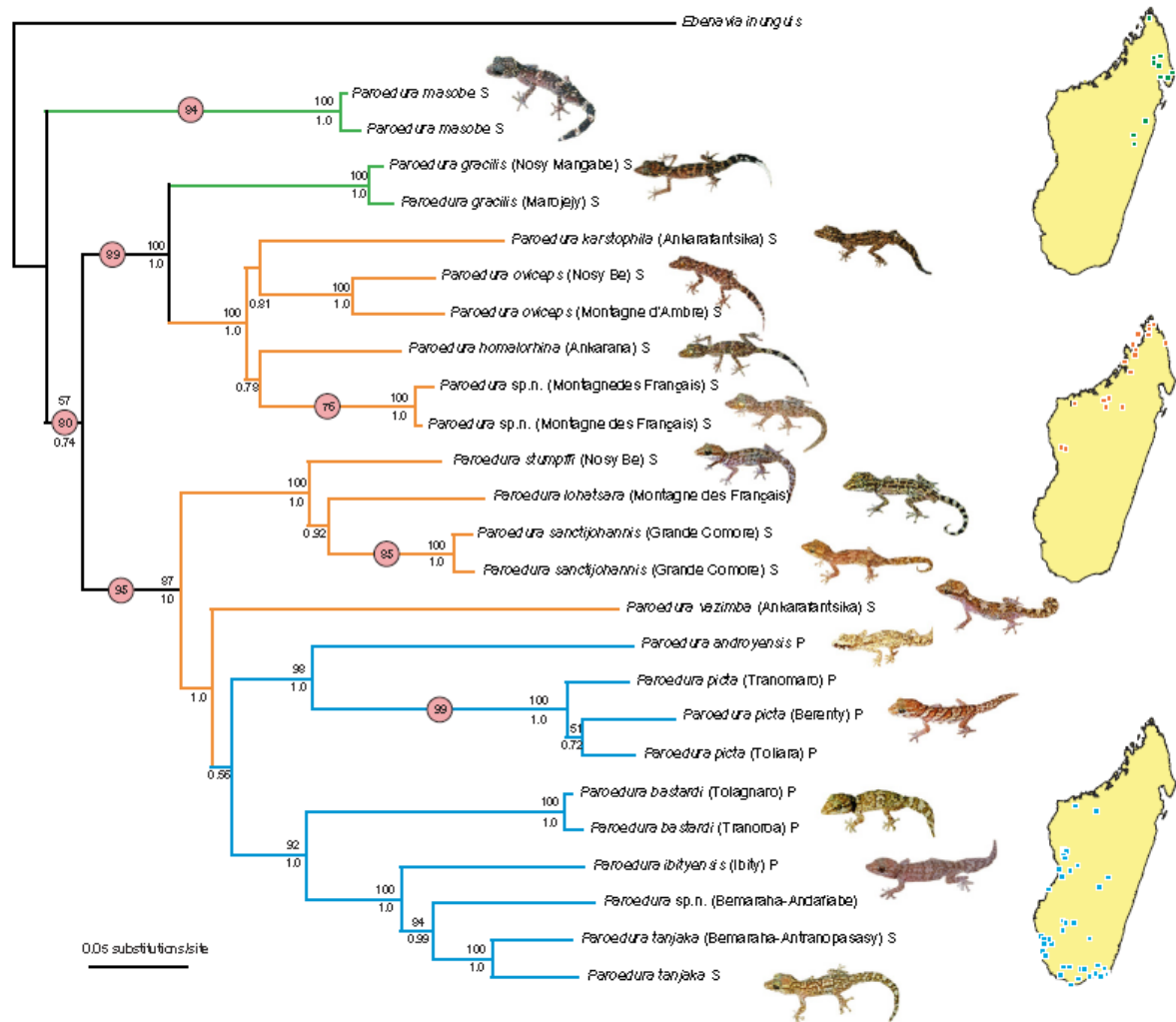
I když v rámci Gekkota obecný trend ve změně diploidního počtu chromozomů a míře přestaveb nelze vysledovat, můžeme říci, že čím evolučně mladší linie, tím větší míra přestaveb se uplatňuje.

## 1.2 Rod *Paroedura*

Jako téměř každá ostrovní fauna, i ta madagaskarská je unikátní stupněm svého endemismu. Mnohé skupiny živočichů na Madagaskaru prodělaly adaptivní radiaci (z plazů např. leguáni čeledi Opluridae nebo gekoni rodu *Phelsuma*; Austin *et al.* 2003, Okajima *et al.* 2009). I drtivá většina druhů gekonů rodu *Paroedura* (Gekkonidae) je endemických na Madagaskaru, kde představují druhově nejbohatší rod nočních gekonů. Pouze dva druhy *P. sanctijohannis* GÜNTHER, 1879 a *P. stellata* HAWLITSCHKEK & GLAW, 2012 se vymykají svou endemičností na přilehlých Komorských ostrovech (Hawlitschek & Glaw 2012).

Rod *Paroedura* byl popsán Güntherem (1879), ale většina druhů rodu byla dlouho řazena do rodu *Phyllodactylus*. K vyčlenění rodu *Paroedura* na základě morfologických a anatomických rozdílů došlo až později (Dixon & Kroll 1974). V současné době tvoří rod 17 popsaných druhů, ale nové druhy jsou stále objevovány a některé čekají na popsání. Rod je monofyletický a existuje pro něj dobře podpořená hypotéza o fylogenetických vztazích založená na datech z osmi mitochondriálních a dvou jaderných lokusů (Jackman *et al.* 2008). Sesterským rodem je taktéž madagaskarský rod *Ebenavia* (Obr. 3). Je tedy jisté, že diverzifikace rodu *Paroedura* probíhala přímo na Madagaskaru.

Jednotlivé druhy se liší v celkové velikosti těla (nejmenší *P. androyensis* měří kolem 6 cm, největší zástupci rodu jako *P. picta* pak až 17 cm) i v míře pohlavního dimorfismu (Starostová *et al.* 2010). Variabilní jsou i jejich areály rozšíření, které jsou poměrně dobře zmapovány (Schönecker 2008). Některé druhy obývají suchou trnitou buš (sympatrické sesterské druhy *P. androyensis* a *P. picta*), jiné vlhké tropické lesy (*P. masobe*, *P. gracilis*) či skalnaté oblasti a jeskyně (*P. oviceps*, *P. karstophila*). Malé mapky na obrázku (Obr. 3) ilustrují, že jednotlivé fylogenetické linie rodu *Paroedura* žijí v různých částech ostrova.



Obr. 3: **Fylogeneze rodu *Paroedura*** (Jackmann et al. 2008)

Rod *Paroedura* patří do čeledi Gekkonidae, která vykazuje velkou karyotypovou variabilitu a přesto je cytogeneticky málo prozkoumaná. V rámci rodu byly dosud publikovány karyotypy pouze dvou druhů – *P. picta* a *P. sp.* (Main et al. 2012). Gekon *Paroedura picta* je modelových laboratorním druhem pro výzkum ontogenetického vývinu plazů (Noro et al. 2009, Sato et al. 2010), fyziologie růstu a rozmnožování, a fenotypové plasticity reprodukčních strategií díky snadnému chovu v zajetí a pro plaza výjimečně rychlému rozmnožování a dospívání (Blumberg et al. 2002, Kratochvíl et al. 2006, 2008, Kubička & Kratochvíl 2009, Kubička et al. 2012, Starostová et al. 2010, 2012). Přesto byl karyotyp i tohoto druhu dlouhou dobu neznámý. Dnes je již popsáno, že má karyotyp s diploidním počtem  $2n=36$ , s jedním párem submetacentrických a všemi ostatními chromozomy akrocentrickými (Main et al. 2012). U druhu *P. picta* již také bezpečně víme, že má pohlaví určeno genotypově, vzhledem k líhnutí vyrovnaného poměru pohlaví u snůšek inkubovaných za rozdílných teplot (Blumberg et al. 2002 Kratochvíl et al. 2006, 2008).

V jeho karyotypu by tedy měly být přítomné pohlavní chromozomy (Pokorná & Kratochvíl 2009). Main *et al.* (2012) ovšem ve své studii pomocí DAPI a CA3 barvení pohlavní chromozomy u *P. picta* neobjevili, což naznačuje, že by pohlavní chromozomy u tohoto druhu mohly být homomorfní a neheterochromatinizované. U ostatních druhů je způsob sexuální determinace dosud otevřená otázka. Základní cytogenetické vyšetření druhů tohoto rodu bude přínosné zejména s ohledem na jeho adaptivní radiaci na ostrově Madagaskar.

## 2. CÍLE PRÁCE

Cílem mé práce bylo popsat karyotypy obou pohlaví dostupných druhů rodu *Paroedura* a prozkoumat je pomocí molekulárně cytogenetických metod a následně analyzovat dynamiku karyotypové evoluce kombinací cytogenetických dat s fylogenetickými vztahy ve skupině. Nedílnou součástí práce byla i snaha detekovat pohlavní chromozomy.

Do analýzy jsem zahrnula zástupce obou pohlaví druhů *Paroedura picta*, *Paroedura masobe*, *Paroedura gracilis*, *Paroedura oviceps*, *Paroedura stumpffi*, *Paroedura lohatsara*, *Paroedura karstophila*, *Paroedura bastardi* a *Paroedura ibityensis*, které zastupují většinu hlavních fylogenetických větví.

### 3. MATERIÁL A METODIKA

K analýze bylo použito 35 jedinců devíti druhů rodu *Paroedura*, jmenovitě: *Paroedura picta* (PETERS, 1854); *Paroedura masobe* NUSSBAUM & RAXWORTHY, 1994; *Paroedura gracilis* (BOULENGER, 1896); *Paroedura oviceps* (BOETTGER, 1881); *Paroedura stumpffi* (BOETTGER, 1879); *Paroedura lohatsara* GLAW, VENCES & SCHMIDT, 2001; *Paroedura karstophila* NUSSBAUM & RAXWORTHY, 1994; *Paroedura bastardi* (MOCQUARD, 1900) a *Paroedura ibityensis* RÖSLER & KRÜGER, 1998. Všechna zvířata pochází z akreditovaného chovu na Přírodovědecké fakultě UK v Praze (číslo akreditace 24773/2008-10001), kde byla chována v podmínkách standardních pro chov plazů a přizpůsobených potřebám jednotlivých druhů. Většina jedinců přebývala v konstantní teplotě 27 °C, jedinci chladnomilných druhů (*P. masobe*, *P. gracilis*, *P. oviceps*) v teplotě 22 °C, u všech byla zajištěna potřebná relativní vlhkost vzduchu 50-60 %. Zvířata byla umístěna v teráriích s vhodným substrátem, jejichž velikost odpovídala aktuální velikosti jedinců a jejich počtu v daném teráriu. Zvířata měla k dispozici dostatečné množství vhodných úkrytů a byla pravidelně krmena přiměřeným množstvím cvrčků odpovídající velikosti pro daného jedince. Prostřednictvím krmení a vody byl všem zvířatům zajišťován vyvážený přísun potřebných vitamínů a minerálů.

#### 3.1 Příprava chromozomových preparátů

U plazů není pro studie tohoto typu ustálena jednoznačná metodika. Metafáze je možné získat kultivací dosud nesespecializovaných buněk vazivové tkáně, fibroblastů, přímou preparací tkání (tenké střevo, gonády, kostní dřev), nebo kultivací krevních leukocytů. U plazů jsou fibroblasty obvykle získávány z embryí v raném stádiu vývoje či z tkáně nově vytvářeného ocasního regenerátu. S ohledem na zkušenosti členů našeho týmu jsme se rozhodli primárně zvolit metodu kultivace leukocytů, která je ve srovnání s ostatními jmenovanými metodami výnosnější a méně komplikovaná. Dalšími výhodami je nižší invazivnost, opakovatelnost v kratším čase u téhož jedince a oproti kultivaci fibroblastů z embrya neztrácíme informaci o pohlaví jedince.

##### 3.1.1 Kultivace leukocytů

Tuto metodu jsem používala k získání chromozomových preparátů ze studovaných druhů. Jednotlivým jedincům jsem odebírala zhruba 50-200 µl plné krve, přičemž množství odebrané krve záviselo na velikosti jedince.

Podstatou metody je kultivace krve v mediu, jehož klíčovou složkou je fytohemaglutinin - rostlinný lektin podporující mitotické dělení. Nedílnou součástí media je i sérum zajišťující samostatné dělení buněk mimo původní tkáň (fetální telecí sérum) a další podpůrné chemikálie zajišťujících výživu buněk (L-glutamin, lipopolysacharid) a snížení rizika kontaminace bakteriemi (penicilin/streptomycin). Proces kultivace je ukončen aplikací mitostatika (kolcemid), které buňky zastaví v metafázi mitotického dělení. Při sklizení buňky prochází nejprve hypotonizací (KCl), při které nasají vodu a tím zvětší svůj objem, cílem je dostat chromozomy dál od sebe a zajistit tak optimální rozložení metafázních chromozomů. Následuje usmrcení buněk fixací (metanol-octová fixáž), která je rovněž odvodní a zachytí jejich strukturu.

Podrobný popis postupu je následující:

Krev byla odebrána do sterilní heparinizované injekční stříkačky a ve sterilním laminárním boxu po kapkách přenesena do zkumavek rozplněných po 3-7 ml kompletním kultivačním médiem (množství media bylo úměrné množství odebrané krve). Kompletní kultivační médium pro kultivaci leukocytů se skládá z 84,9 % komerčně dodávaného média D-MEM (Sigma-Aldrich; D5546), z 9,4 % roztoku fetálního bovinního séra (Biochrom; S 0115) s přidáním 1 % antibiotické-antimykotické směsi penicilin/streptomycin (Gibco; 15140-122), 1 % roztoku L-glutaminu (Sigma-Aldrich; G7513), 2,8 % fytohemaglutininu HA 15 (Gibco; 10576-015) a 1 % lipopolysacharidu (Sigma-Aldrich; L4005). Zkumavky s krví v mediu byly jemně v ruce promíchány a následně umístěny v kultivačním stojanu zajišťujícím sklon 45° do inkubátoru nastaveného na 30 °C, kde byly inkubovány po dobu sedmi dnů. Po uplynutí této doby bylo do každé zkumavky aplikováno 35 µl kolcemidu (Roche; 10 295 892 001) a po lehkém promíchání, byly zkumavky ponechány působení kolcemidu v inkubátoru další 3,5 hodiny. Po centrifugaci (10 minut/1200 otáček) bylo přiměřené množství supernatantu odsáto sterilní Pasteurovou pipetou a sediment byl resuspendován v 5 ml hypotonického roztoku 0,075M KCl. Hypotonizace probíhala 30 minut při 37 °C, následně bylo do každé zkumavky v rámci prefixace zavedeno několik kapek fixážní směsi ve složení metanol-kyselina octová 3:1 a suspenze byly centrifugovány. Nakonec všechny suspenze prošly třemi po sobě jdoucími fixacemi při 4 °C a následovalo kapání suspenzí na podložní sklo.

## 3.2 Vizualizace chromozomů

### 3.2.1 Barvení chromozomů

Při laboratorní práci jsem barvila chromozomy buď barvivem Giemsa Romanowski (Dr. Kulich Pharm s.r.o.; SPC-0111-01) nebo barvicí směsí obsahující DAPI (Vector Laboratories; H-1200).

Principem barvení chromozomů Giemsou je schopnost tohoto barviva vázat se na fosfátovou skupinu DNA, a tím vizualizovat chromozomy v metafázi buněčného dělení. Před barvením je třeba nechat nakapané preparáty zcela uschnout. Barvení se provádí 10 minut v 3% roztoku Giemsy v Sørensenově pufru (4,5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 4,7 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  / 1000 ml destilované vody, pH = 6,8). Poté jsou preparáty důkladně opláchnuty destilovanou vodou. Výsledkem je rovnoměrné probarvení celých chromozomů, díky kterému můžeme chromozomy snadno spočítat, klasifikovat a odhalit základní strukturní odchylky (např. zlomy).

Principem barvení chromozomů DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol) je schopnost tohoto fluorescenčního barviva specificky se vázat na AT baze vlákna DNA a tuto vazbu vizualizovat vyzářením fluorescenčního signálu. My jsme používali produkt Vectashield® (Vector Laboratories; H-1200) - barvicí směs obsahující DAPI založenou na bázi glycerolu, který zajišťuje viskozitu tekutiny, čímž je zpomaleno postupné odpařování barviva. Barvení provádíme tak, že na suché preparáty nanese pomocí kapátka směs DAPI a opatrně překryjeme krycím sklem tak, abychom se vyhnuli bublinám. Následně preparát zabalíme do buničiny a opatrně vytlačíme přebytek barvicí směsi. Pro dlouhodobé skladování zalakujeme okraje krycího skla. Preparáty barvené tímto způsobem uchováváme ve tmě. Doporučená teplota pro skladování je 4°C.

### 3.2.2 C-pruhování

Patří mezi diferenční barvicí techniky, jelikož diferencuje chromozomy na základě tzv. pruhů s různou intenzitou zbarvení. Metoda slouží k vizualizaci konstitutivního heterochromatinu, jehož výskyt je typický pro oblasti centromer a telomer, ale může se nacházet i uvnitř ramen chromozomů, což může značit přítomnost aberací, postihujících centromerické oblasti, či jiné heterochromatinové regiony. Heterochromatinizace je rovněž typickým znakem pro diferencované nepárové pohlavní chromozomy. Dříve byla metoda C-pruhování používána při testech paternity, jelikož rozsah heterochromatinových oblastí na jednotlivých chromozomech je dědičný, značně variabilní a pro každého jedince do jisté míry specifický (Craig-Holmes & Shaw, 1971). V současnosti je využívána k identifikaci



homologických chromozomů, správnému sestavení chromozomových párů a srovnávání karyotypů mezi jednotlivými druhy.

Při C-pruhování je nejprve rozvolněna struktura chromatinu vlivem kyseliny chlorovodíkové (HCl). Následuje denaturace DNA krátkodobým působením nasyceného roztoku hydroxidu barnatého a nakonec renaturace v pufru (SSC). Podstatou metody je efektivnější denaturace heterochromatinových úseků – tyto oblasti jsou méně poškozené a mají tak sytější zbarvení ve srovnání s euchromatinovými.

Podrobný popis postupu je následující:

Skla s nakapanými suspenzemi nejprve připravíme na C-pruhování procesem zvaným *aging*, kdy necháme skla odstát na plotýnce vyhřáté na 65 °C po dobu jedné hodiny. Tento krok zajistí lepší přilnavost chromozomového materiálu ke sklu při další manipulaci. Poté necháme skla pár minut vychladnout při pokojové teplotě a následně je vystavíme působení 0,2N HCl po dobu 20 minut. Potom preparáty opláchneme destilovanou vodou a ponoříme do denaturačního roztoku hydroxidu barnatého (5,3g Ba(OH)<sub>2</sub> / 100 ml destilované vody) vytemperovaného na 45 °C – experimentálně jsme si optimální dobu působení stanovili na 5 minut. Po tuto dobu zajišťujeme neustálé nasycení roztoku probubláváním pipetou. Poté skla opláchneme v 0,2 N HCl, opláchneme destilovanou vodou a ponoříme do renaturačního pufru 2x SSC (17,53 g NaCl + 8,82 g citronanu sodného / 500 ml destilované vody) vytemperovaného na 65 °C. Doporučovaná doba inkubace chromozomů v 2x SSC pro plazy je jedna hodina. Po opláchnutí skel destilovanou vodou a jejich zaschnutí můžeme postoupit k barvení. Barvení skel pomocí DAPI (Vector Laboratories; H-1200) poskytovalo opakovaně výraznější intenzitu zbarvení heterochromatinu, přestože se v jeho pozici shodovalo s barvením Giemsou.

Metoda C- pruhování byla aplikována na všechny studované druhy rodu *Paroedura* s cílem získat specifický vzor na chromozomech, jehož by bylo využito při sestavování karyotypu, a případně odhalit pohlavní chromozomy.

### 3.3 Telomerická FISH

Principem hybridizace *in situ* je komplementární spojení dvou vláken nukleových kyselin různého původu – vyšetřované DNA a sondy. Sonda je krátký úsek DNA nebo RNA umožňující lokalizaci příslušné komplementární sekvence na cílové DNA. V našem případě používáme fluorescenčně značenou pantelomerickou sondu komplementární k telomerické sekvenci (TTAGGG)<sub>n</sub>, která je pro obratlovce konzervativní (Moyzis *et al.* 1988).

Hybridizaci provádíme tak, že vyšetřovanou DNA i sondu denaturujeme působením vysoké teploty. Po oddělení řetězců směs ochladíme, čímž navodíme reasociační podmínky. Pokud je sonda v dostatečné vysoké koncentraci, váže se ke komplementárním sekvencím ve vyšetřované DNA dříve než původní řetězec. Přítomnost hledané sekvence nám pak potvrdí sondou vyzářený fluorescenční signál, který je viditelný v jiné části spektra než chromozomy či jádra obarvená jiným fluorochromem.

Podrobný popis postupu je následující:

Metodě opět předchází *aging*, kdy suchá skla s nakapanými suspenzemi buď necháme přes noc v 37 °C, nebo je těsně před FISH odvodníme vzestupnou řadou etanolů (postupně 70%, 85% a 100% etanolem, vždy po 2 minutách) a suchá skla pak umístíme na hodinu na topnou plotýnku vytemperovanou na 65 °C. Po vychladnutí skla umístíme na 5 minut do 2x SSC a poté na každé sklo napipetujeme 100 µl roztoku RNAsy (Sigma Aldrich; R-6513) ředěné 2x SSC o výsledné koncentraci 100 µg/ml a přikryjeme parafilmem o rozměrech podložního skla. Takto skla inkubujeme 1 hodinu při 37 °C. Tento krok slouží k odstranění RNA molekul a tak snížení nespecifického pozadí u výsledných preparátů. V dalším kroku odstraníme parafilm a skla opláchneme dvakrát po sobě 5 minut v 2x SSC. Následně připravíme 0,3% roztok pepsinu smícháním 1 ml 10 mM HCl s 30 µl pepsinu (Sigma-Aldrich; P-6887; koncentrace zásobního roztoku je 0,1 g/ml) a promícháme. Na každé sklo pak napipetujeme 100 µl tohoto roztoku, překryjeme parafilmem, vložíme do vlhké komůrky a necháme působit 10 minut v 37 °C. Poté omyjeme skla třikrát po sobě 5 minut v PBS pufri (PBS: 5 g NaCl + 1,125 g KCl + 1,125 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + 0,72 g Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> v 500 ml destilované vody). Následuje inkubace 10 minut v 1% roztoku formaldehydu, který připravíme tak, že smícháme 2,7 ml 37% formaldehydu (Sigma Aldrich; 40052-A38) s 250 µl 1 M MgCl<sub>2</sub> a směs doplníme PBS pufrem o pH=7,4 do 100 ml. Po inkubaci vložíme skla na 5 minut do PBS a pak postupně do 70%, 85% a nakonec 100% etanolu vždy na 5 minut. Když jsou skla suchá, následuje denaturace 3 minuty v 70% formamidu při 75 °C (Sigma-Aldrich; 47671-F; 70 ml formamidu se naředí 10 ml pufri 20x SSC a 20 ml destilované vody). Ihned po

denaturaci jsou skla umístěna do 2x SSC na 1 minutu a pak následuje opět etanolová série, na jejímž konci necháme skla uschnout.

Telomerická sonda byla předem připravena podle standardního protokolu v PCR reakci. Jako primery sloužily sekvence Telo 1 (TTAGGG)<sub>5</sub> a Telo 2 (CCCTAA)<sub>5</sub> (Macrogen, Korea). K 45 µl PCR produktu bylo přidáno 5 µl kvasinkové RNA (Applied Biosystems; AM7120G), 5 µl roztoku DNA z lososích spermií (Fluka; 31149-10G-F), 2 µl 5 M NaCl a 100 µl 100% etanolu vymraženého na -20 °C. K označení sondy byl použit dUTP-biotin (Roche; 11093070910). Sondu smísíme s hybridizačním pufrem, který slouží ke snížení teploty nutné k její denaturaci. V mém případě má hybridizační pufr složení 5 ml formamidu, 1 ml 20x SSC, 1 ml Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a 3 ml destilované vody. Hotová sonda je uchovávána v -20 °C a těsně před použitím je nutné ji promíchat.

Při samotné hybridizaci sondu nejprve denaturujeme 6 minut ve vodní lázni vytemperované na 75 °C a poté ihned umístíme do ledové tříště, aby nedošlo k zpětné renaturaci. Poté 10 µl sondy nakapeme na každé sklo, překryjeme krycím sklem a umístíme do vlhké komůrky vyplněné 50-70% formamidem v 2x SSC. Hybridizace pak probíhá přes noc při 37 °C ve vlhké komůrce ve tmě.

Po hybridizaci preparáty krátce inkubujeme v 2x SSC, abychom snadno odstranili krycí skla. Následují tři oplachy po 5 minutách v 50% formamidem v 2x SSC ve vodní lázni vytemperované na 42 °C. Tento krok slouží k odstranění nespecifických signálů, které vznikly navázáním sondy na sekvence, k nimž jsou jen minimálně komplementární. Skla pak ještě dvakrát opláchneme po 5 minutách v 2x SSC. Je důležité držet skla v neustálé vlhkosti. Následuje detekce a amplifikace signálu pomocí avidin-FITC (Vector Laboratories; A-2001) a antiavidin-biotinu (Vector Laboratories; BA-0300), při které je nutné všechny kroky provádět v šeru.

Nakonec skla obarvíme směsí DAPI (Vector Laboratories; H-1200). Hotové preparáty prohlédneme pod mikroskopem s příslušnými filtry pro oba použité fluorochromy.

Metoda hybridizace telomerickou sondou byla použita na všechny druhy.

### 3.4 Zpracování obrazového materiálu

Získaná skla byla prohlížena mikroskopem Provis AX 70 Olympus, na němž byly zároveň prostřednictvím kamer pořizovány snímky získaných metafází. V programu Micro Image byl zjišťován celkový počet chromozomů, a zda je pozorovaná metafáze kompletní. Vybrané kvalitní metafáze byly následně zpracovávány programem Ikaros (Metasystems),

kde došlo k sestavení výsledného karyotypu. Konečná grafická úprava byla provedena v programu GIMP 2.8.

### 3.5 Klasifikace chromozomů

Podle Levanovy klasifikace byly rozděleny chromozomy na základě hodnot tzv. centromerického indexu, neboli matematického vyjádření poměru delšího a kratšího ramene, na jednotlivé typy: metacentrické (m), submetacentrické (sm), subtelocentrické (st) a akrocentrické (a) (Levan *et al.* 1964). Kratší chromozomové rameno je označováno jako q, delší jako p rameno.

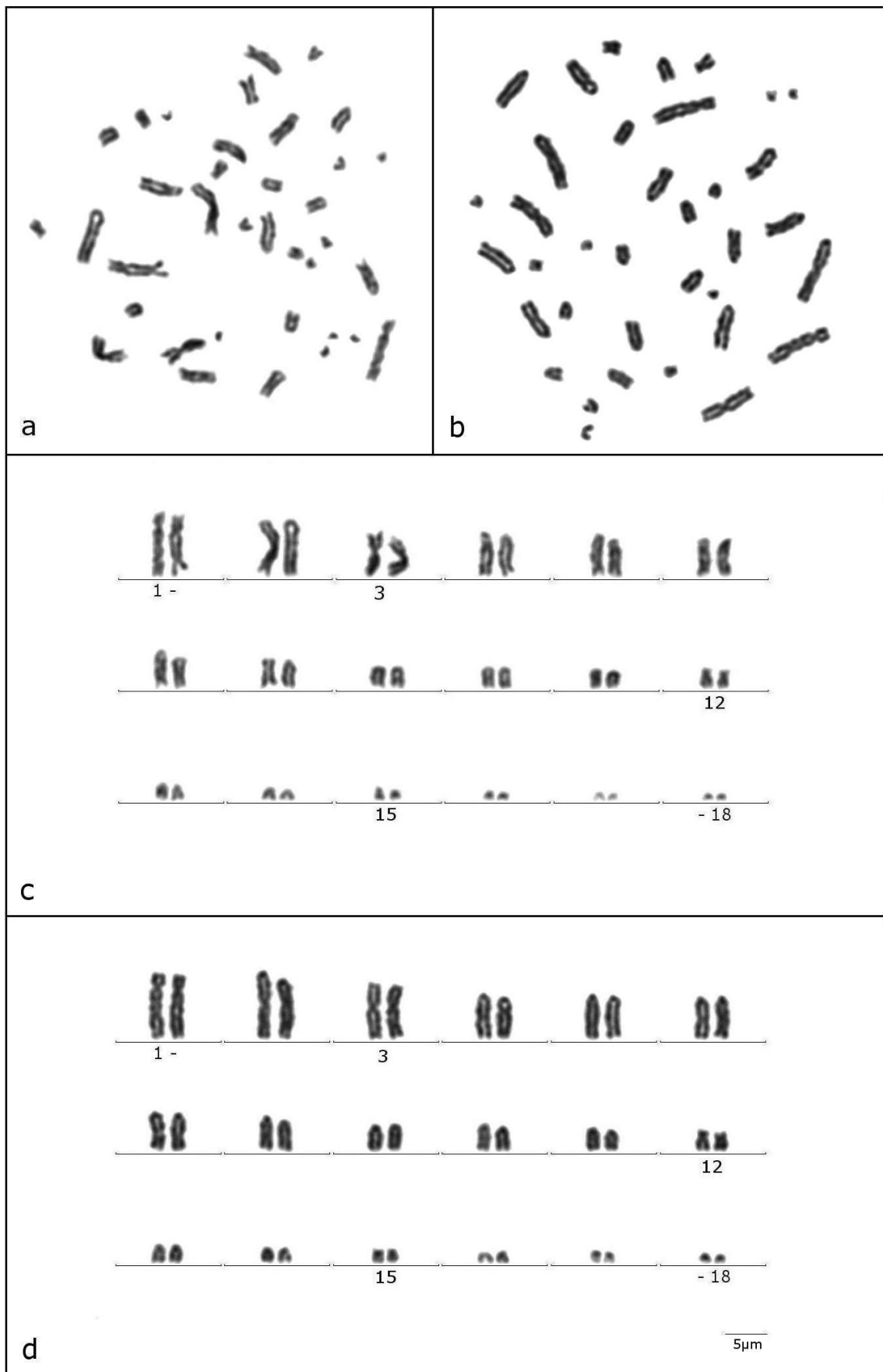
## 4. VÝSLEDKY

Tab.1: Přehled studovaných druhů; počty použitých jedinců a hodnocených metafází

| Druh                         | Počet samců | Počet hodnocených metafází | Počet samic | Počet hodnocených metafází |
|------------------------------|-------------|----------------------------|-------------|----------------------------|
| <i>Paroedura masobe</i>      | 2           | 33                         | 1           | 25                         |
| <i>Paroedura gracilis</i>    | 1           | 25                         | 1           | 23                         |
| <i>Paroedura karstophila</i> | 2           | 35                         | 1           | 18                         |
| <i>Paroedura oviceps</i>     | 1           | 28                         | 1           | 49                         |
| <i>Paroedura stumpffi</i>    | 3           | 78                         | 2           | 64                         |
| <i>Paroedura lohatsara</i>   | 3           | 56                         | 3           | 83                         |
| <i>Paroedura picta</i>       | 3           | 69                         | 2           | 41                         |
| <i>Paroedura bastardi</i>    | 3           | 39                         | 1           | 49                         |
| <i>Paroedura ibityensis</i>  | 2           | 41                         | 3           | 31                         |

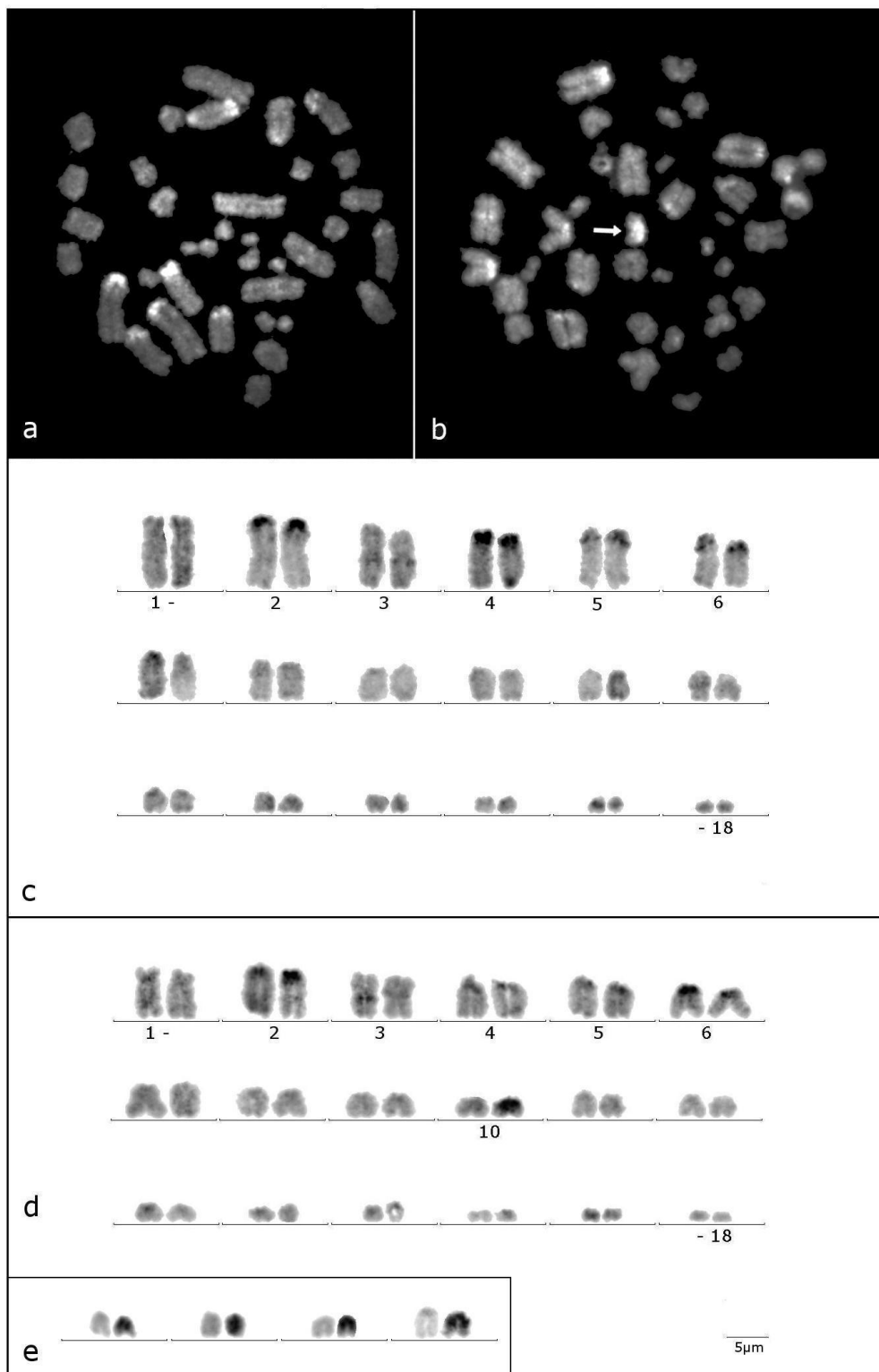
### 4.1 *Paroedura masobe*

Karyotyp *Paroedura masobe* se skládá z  $2n=36$  chromozomů postupně klesajících ve velikosti. První a dvanáctý chromozomový pár je subtelocentrický a třetí pár submetacentrický. U malých chromozomových párů si nemohu být morfologií zcela jista, ale po zhodnocení všech získaných metafází se zdá, že i jeden malý pár by mohl být subtelo- až submetacentrický, což je zde vidět lépe na karyotypu samice (15. pár na Obr. 4). Všechny ostatní chromozomy jsou akrocentrické. Karyotyp druhu se mezi pohlavími při běžném barvení nijak neliší.



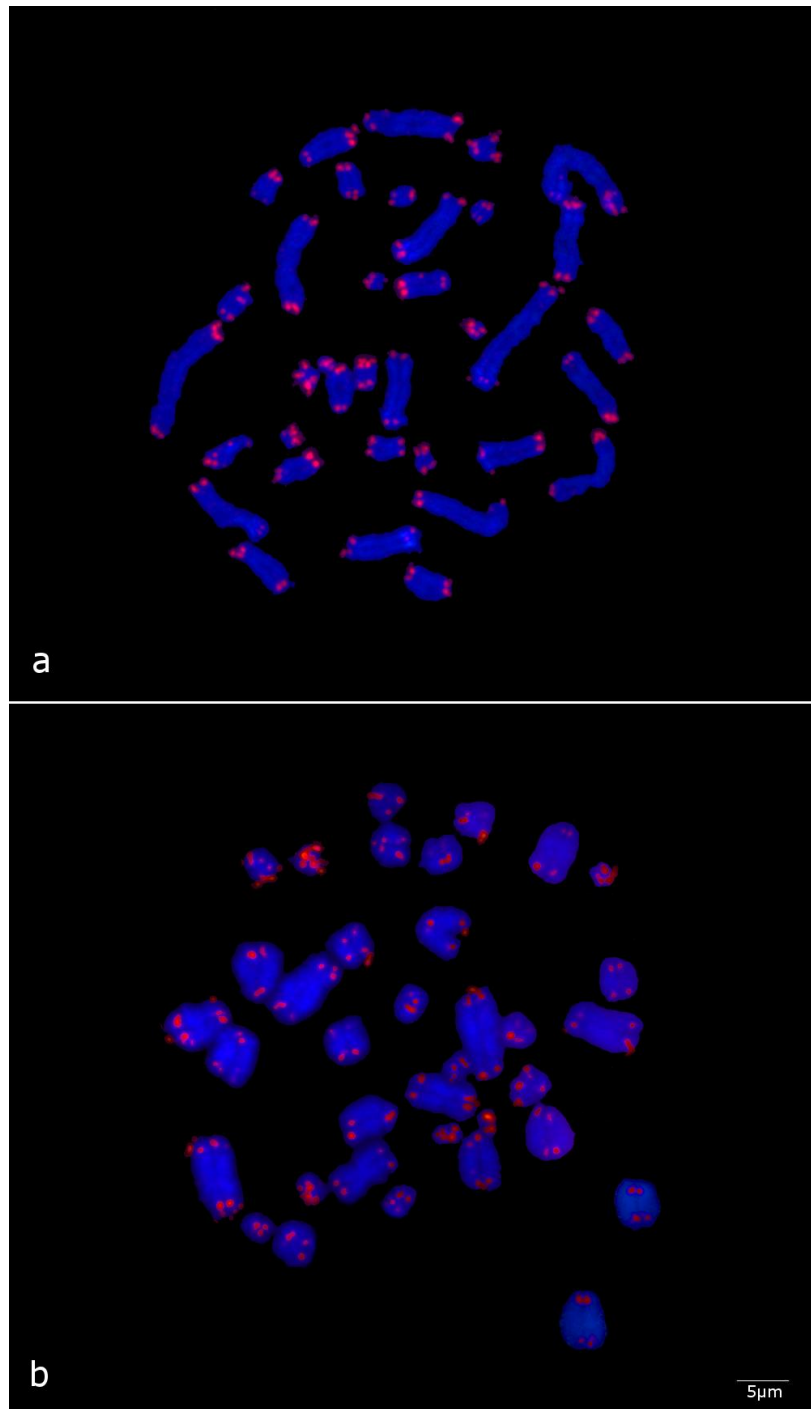
**Obr. 4:** Metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (c) samce *P. masobe*. Metafáze barvená Giemsou (b) a odpovídající karyotyp (d) samice *P. masobe*

Použitím metody C-pruhování jsem u *P. masobe* odhalila akumulaci konstitutivního heterochromatinu v centromerách u čtyř akrocentrických a jednoho submetacentrického páru (Obr. 5). Samice se od samce liší nízkou akumulací heterochromatinu u čtvrtého páru a jedním výrazně heterochromatinizovaným chromozomem 10. páru (Obr. 5, d).



**Obr. 5:** C-pruhování v metafázi barvené pomocí směsi DAPI (a) a odpovídající invertovaný karyotyp (c) samce *P. masobe*, C-pruhování v metafázi barvené pomocí směsi DAPI (b) a odpovídající invertovaný karyotyp (d) samice *P. masobe* s dalšími příklady podob 10. páru z ostatních metafází (e)

Po hybridizaci s telomerickou sondou jsem u *P. masobe* získala signály pouze v telomerických oblastech (Obr. 6).

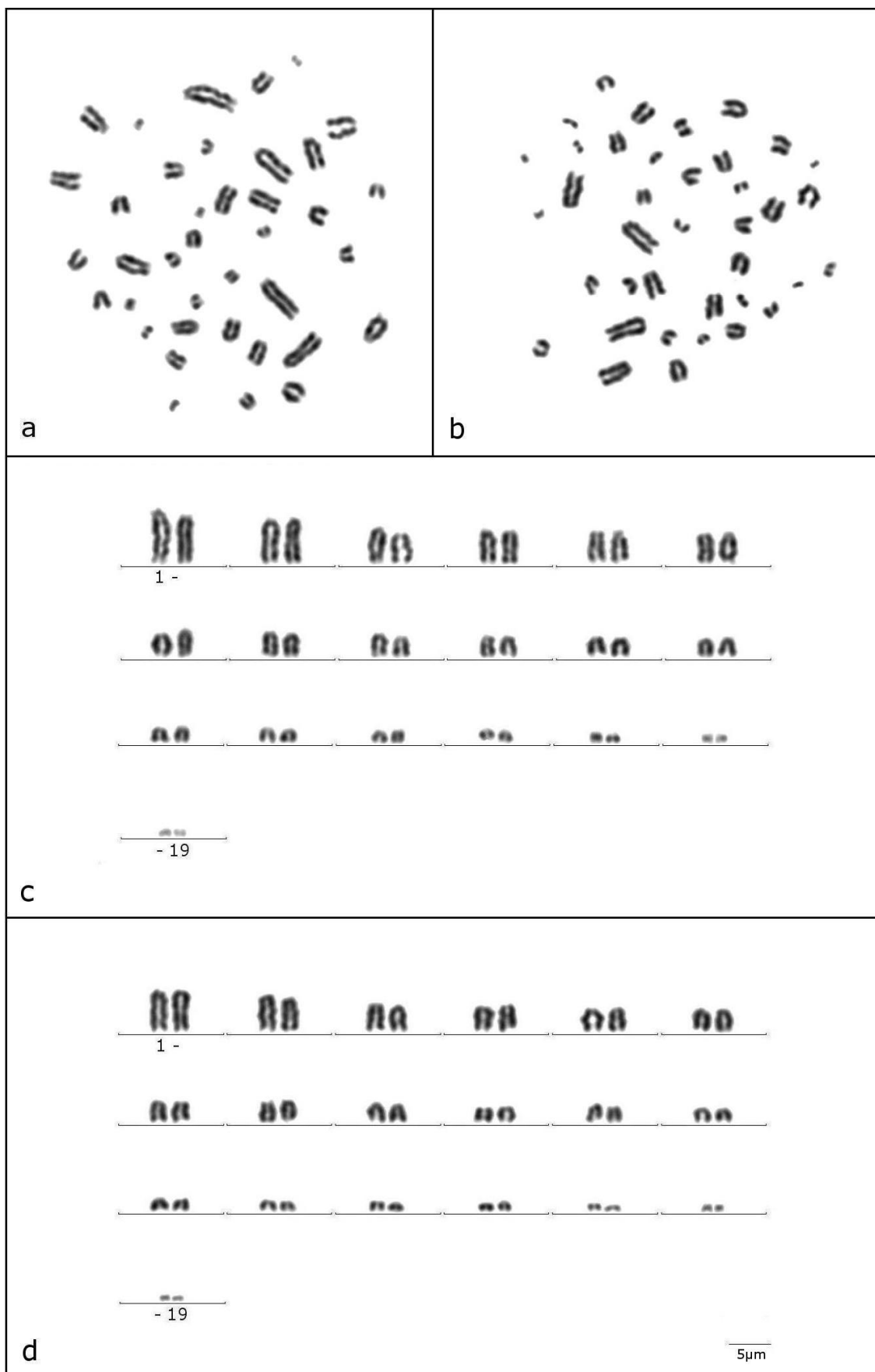


**Obr. 6:** FISH s telomerickou sondou aplikovaná na metafázi samce (a) a samice (b) *P. masobe*

#### 4.2. *Paroedura gracilis*

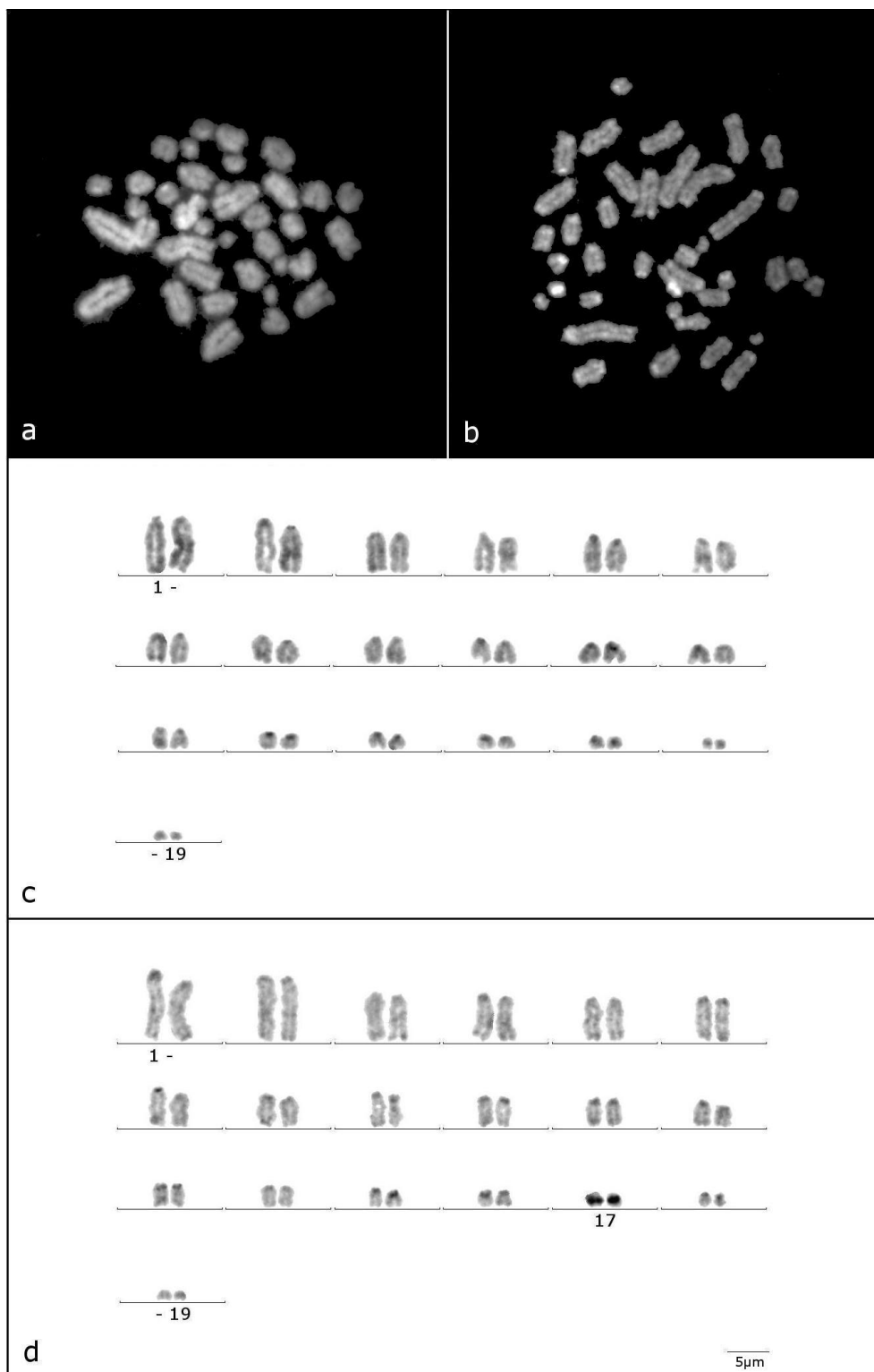
Druh *Paroedura gracilis* se liší od všech zkoumaných druhů. Má nejvyšší počet chromozomů v karyotypu ( $2n=38$ ), jejichž morfologie je ve srovnání s ostatními druhy nejjednodušší - všechny jsou akrocentrické (Obr. 7). Žádné rozdíly mezi pohlavími nebyly vyzorovány.





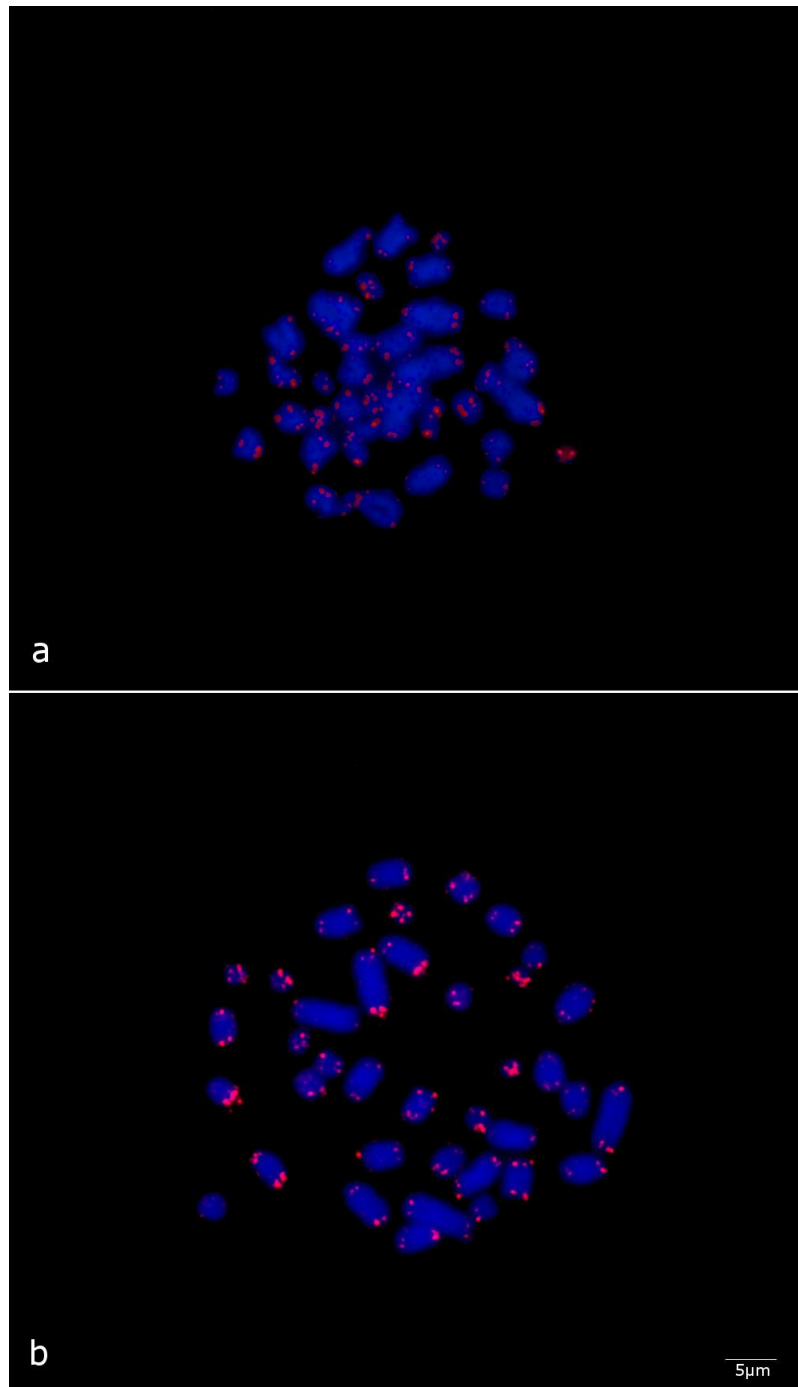
**Obr. 7:** Metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (c) samce *P. gracilis*. Metafáze barvená Giemsou (b) a odpovídající karyotyp (d) samice *P. gracilis*

Po provedení C-pruhování jsem u obou pohlaví druhu *P. gracilis* u naprosté většiny chromozomových párů pozorovala jen velmi nízkou akumulaci konstitutivního heterochromatinu v centromerách (Obr. 8). Výjimkou je výrazně heterochromatinizovaný 17. pár pozorovaný u všech metafázích samice (Obr. 8, d)



**Obr. 8:** C-pruhování v metafázi barvené pomocí směsi DAPI (a) a odpovídající invertovaný karyotyp (c) samce *P. gracilis*, C-pruhování v metafázi barvené pomocí směsi DAPI (b) a odpovídající invertovaný karyotyp (d) samice *P. gracilis*

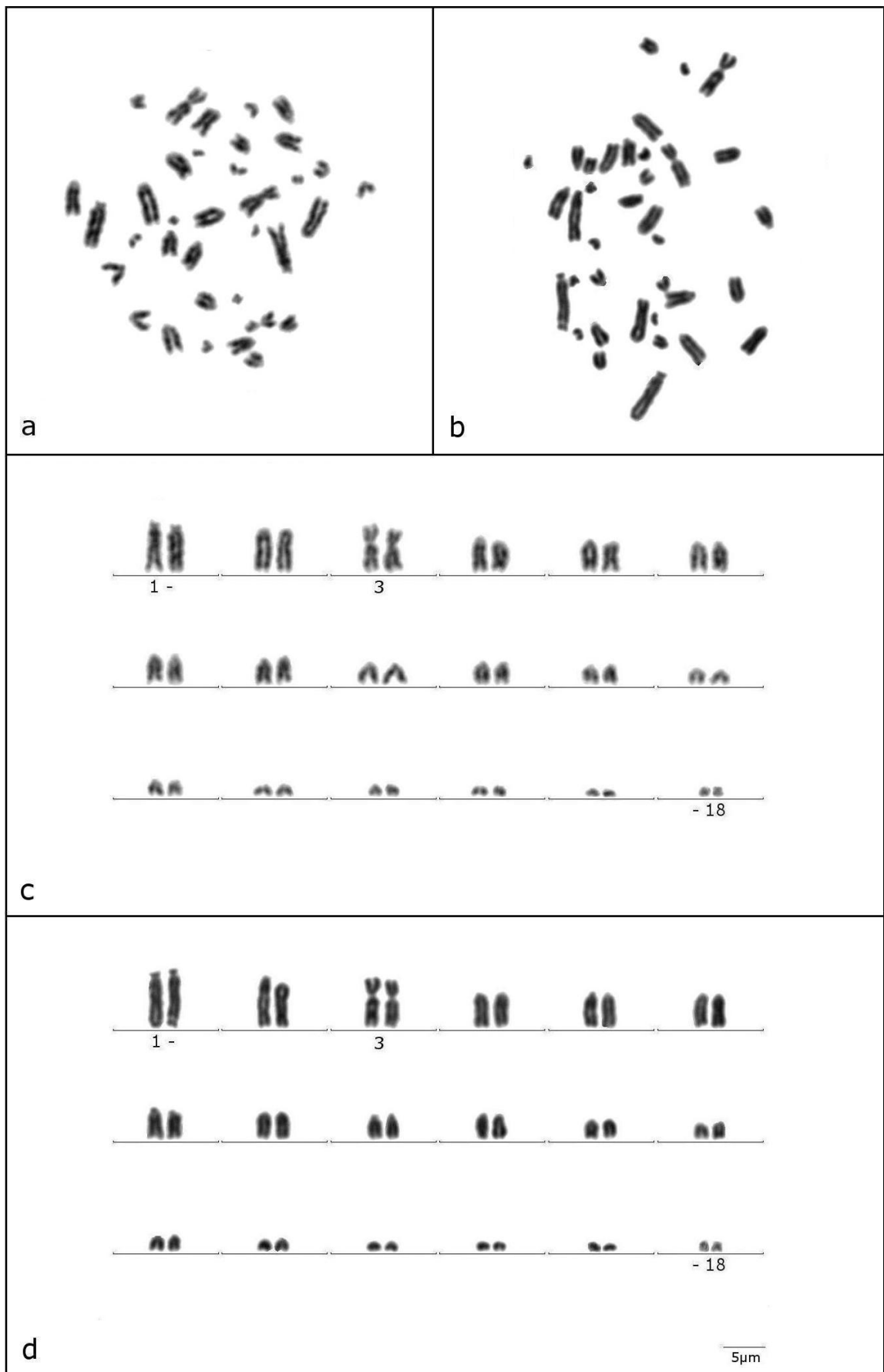
Po aplikaci metody FISH s telomerickou sondou na suspenze *P. gracilis* jsem detekovala signály výhradně v telomerických oblastech (Obr. 9).



**Obr. 9:** FISH s telomerickou sondou aplikovaná na metafázi samce (a) a samice (b) *P. gracilis*

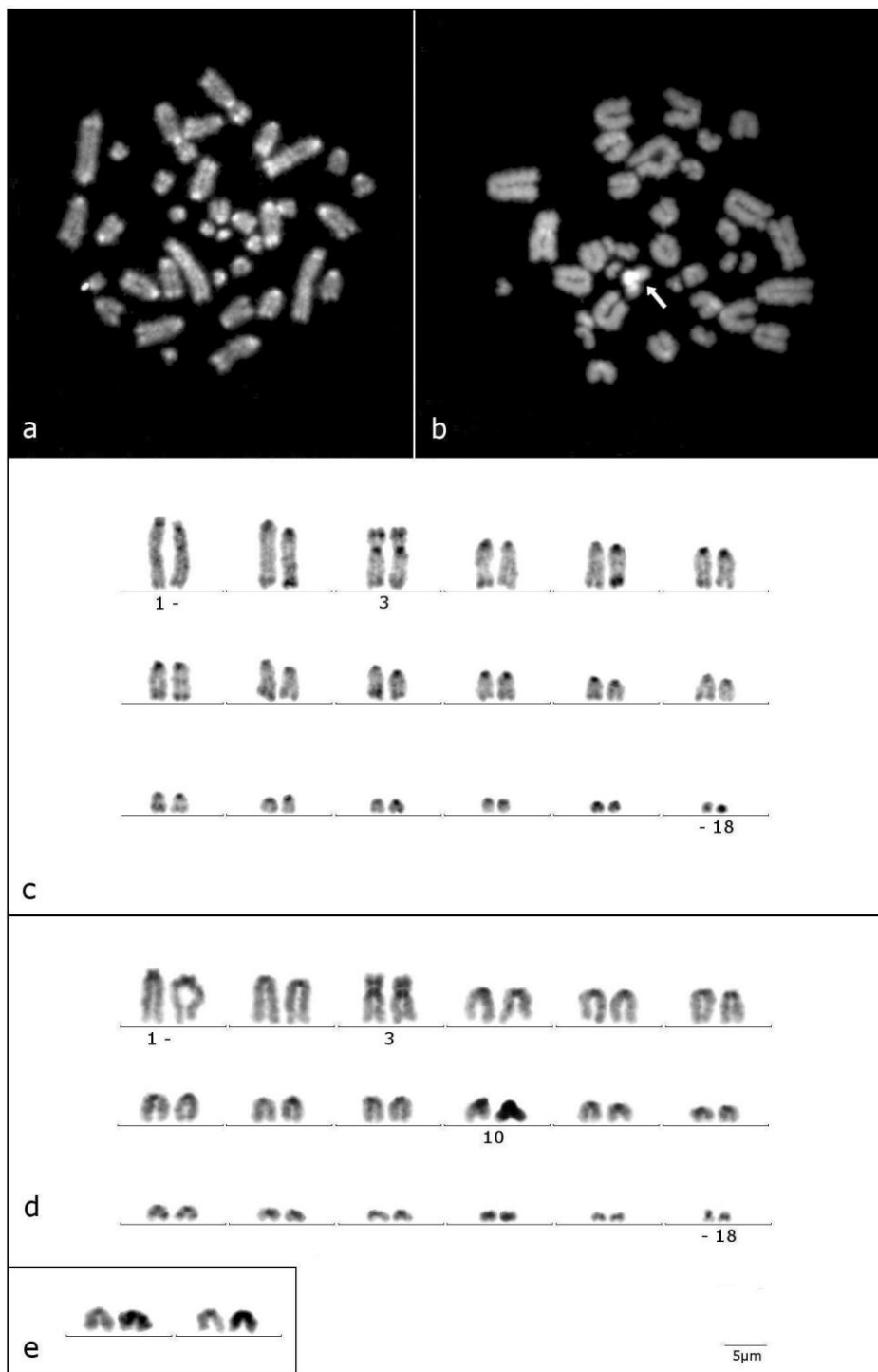
### 4.3 *Paroedura karstophila*

Druh *Paroedura karstophila* má karyotyp s  $2n=36$  chromozomy. Největší pár je subtelocentrický, třetí největší submetacentrický a nejmenší subtelo- až submetacentrický. Všechny ostatní chromozomy jsou akrocentrické. Morfologie chromozomů je u obou pohlaví stejná (Obr. 10).



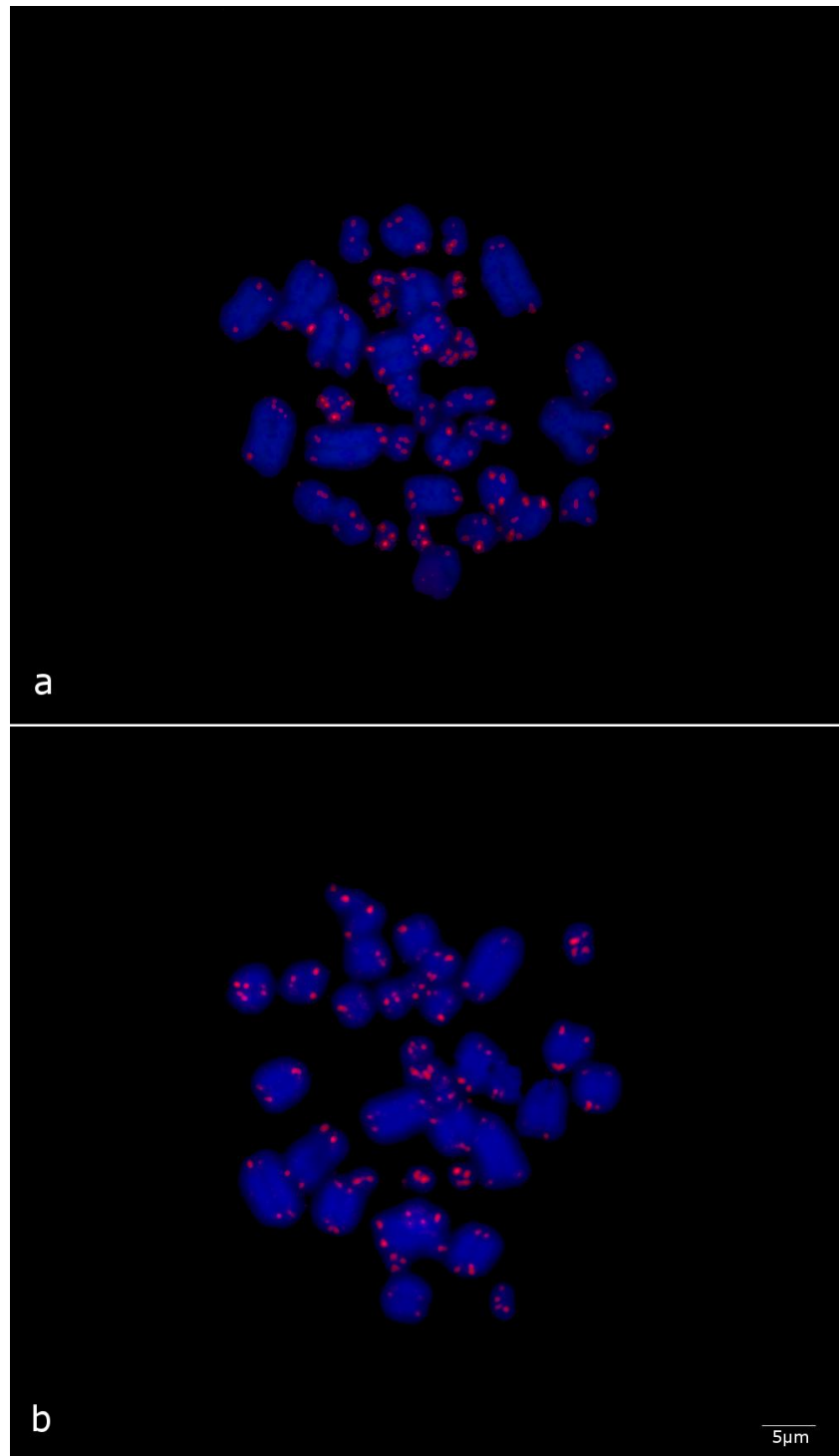
**Obr. 10:** Metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (c) samce *P. karstophila*. Metafáze barvená Giemsou (b) a odpovídající karyotyp (d) samice *P. karstophila*

Prostřednictvím metody C-pruhování jsem vizualizovala u obou pohlaví druhu *P. karstophila* konstitutivní heterochromatin v oblasti centromer u všech chromozomových párů. Třetí submetacentrický pár má navíc konstitutivní heterochromatin kumulovaný na koncích p ramének (Obr. 11). U samic byl vždy objeven v 10. páru jeden heterochromatinizovaný chromozom (Obr. 11, d).



**Obr. 11:** C-pruhování v metafázi barvené pomocí směsi DAPI (a) a odpovídající invertovaný karyotyp (c) samce *P. karstophila*, C-pruhování v metafázi barvené pomocí směsi DAPI (b) a odpovídající invertovaný karyotyp (d) samice *P. karstophila* s dalšími příklady podob 10. páru z ostatních metafází (e)

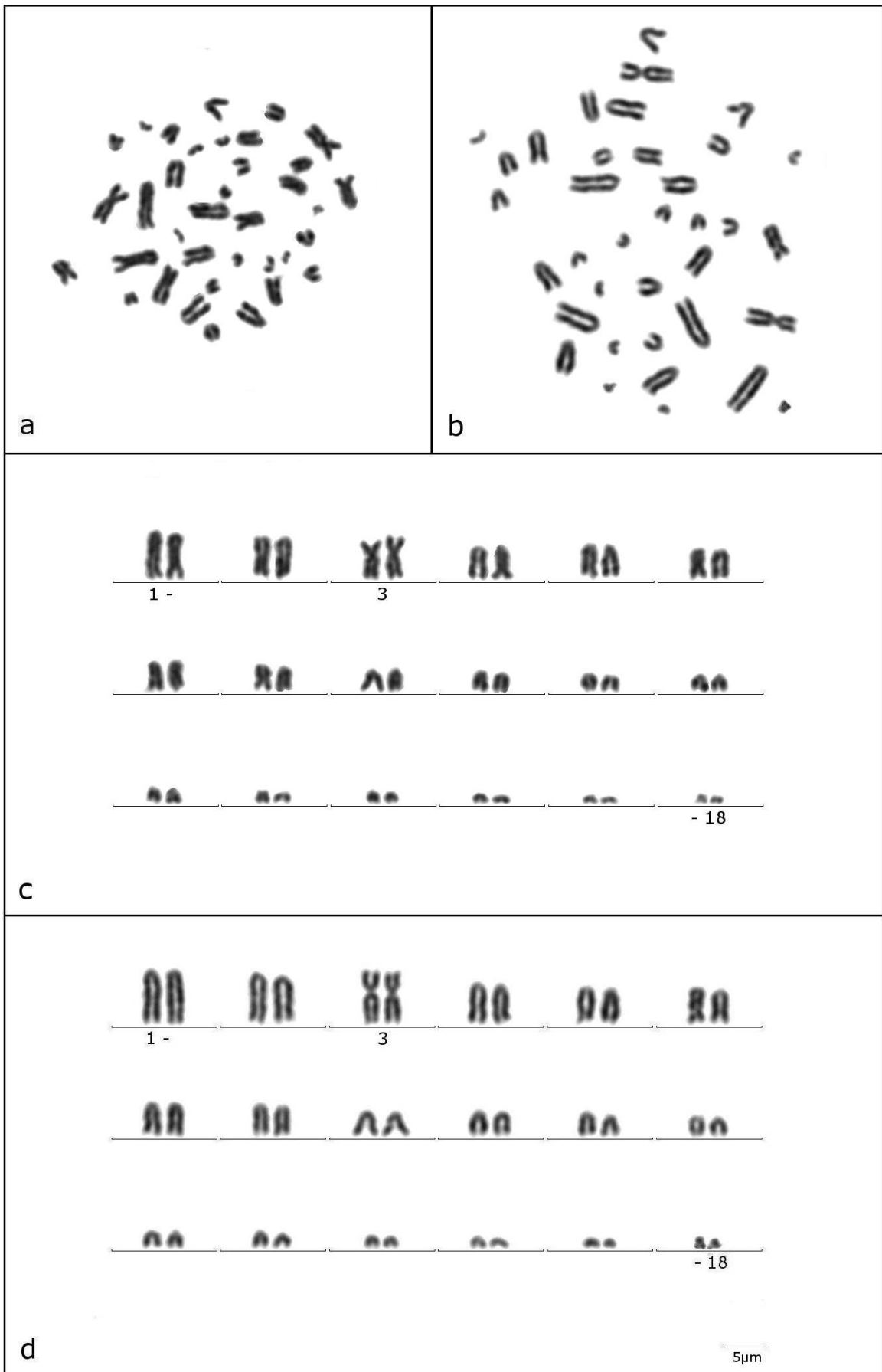
Metodou hybridizace s telomerickou sondou jsem u obou pohlaví *P. karstophila* odhalila signály pouze v telomerických oblastech (Obr. 12).



**Obr. 12:** FISH s telomerickou sondou aplikovaná na metafázi samce (a) a samice (b) *P. karstophila*

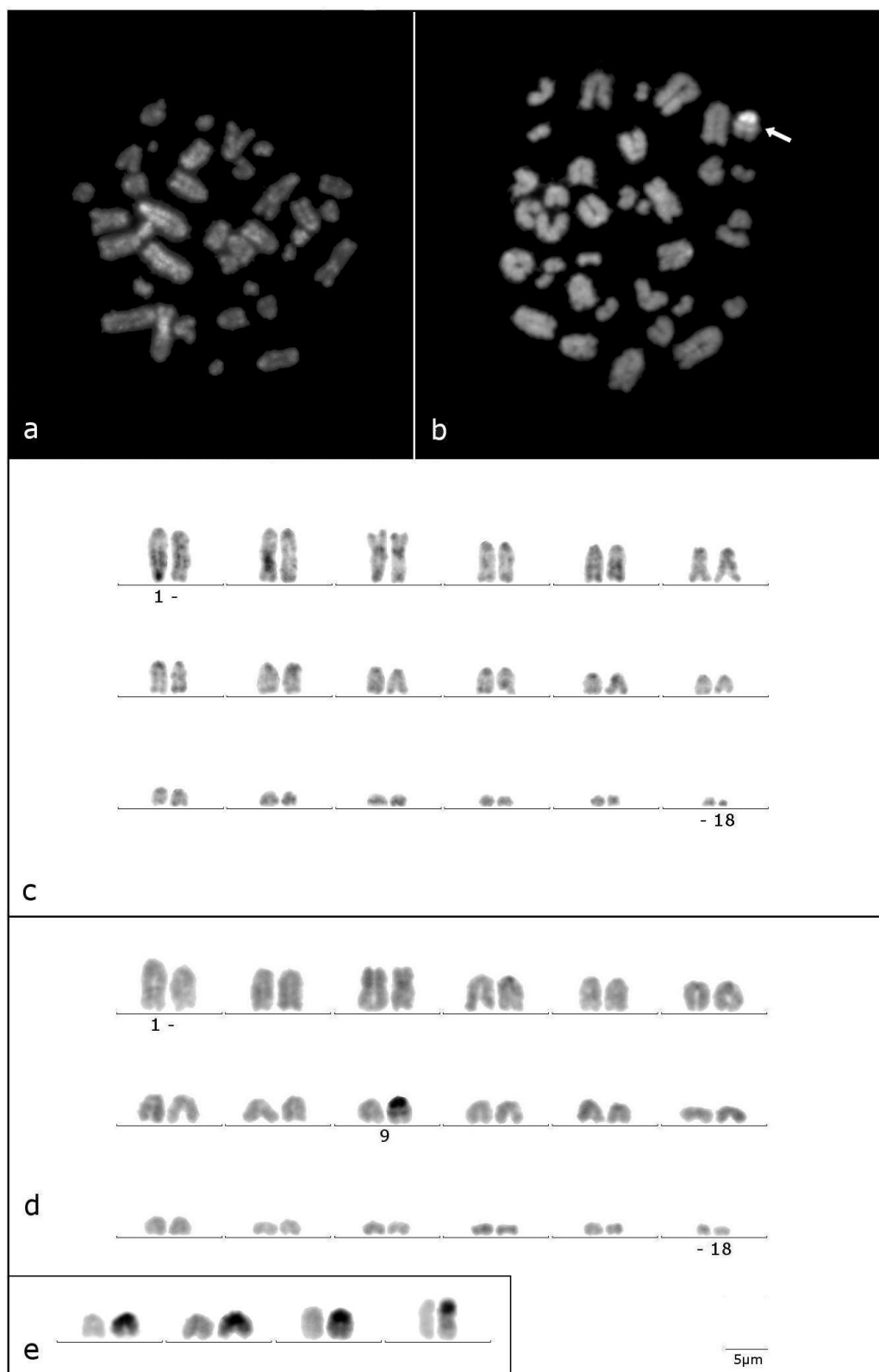
#### 4.4 *Paroedura oviceps*

*P. oviceps* má všechny chromozomy akrocentrické až na třetí submetacentrický pár. Diploidní počet chromozomů je i u tohoto druhu  $2n=36$  (Obr. 13). Obě pohlaví mají karyotyp shodný.



**Obr. 13:** Metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (c) samce *P. oviceps*. Metafáze barvená Giemsou (b) a odpovídající karyotyp (d) samice *P. oviceps*

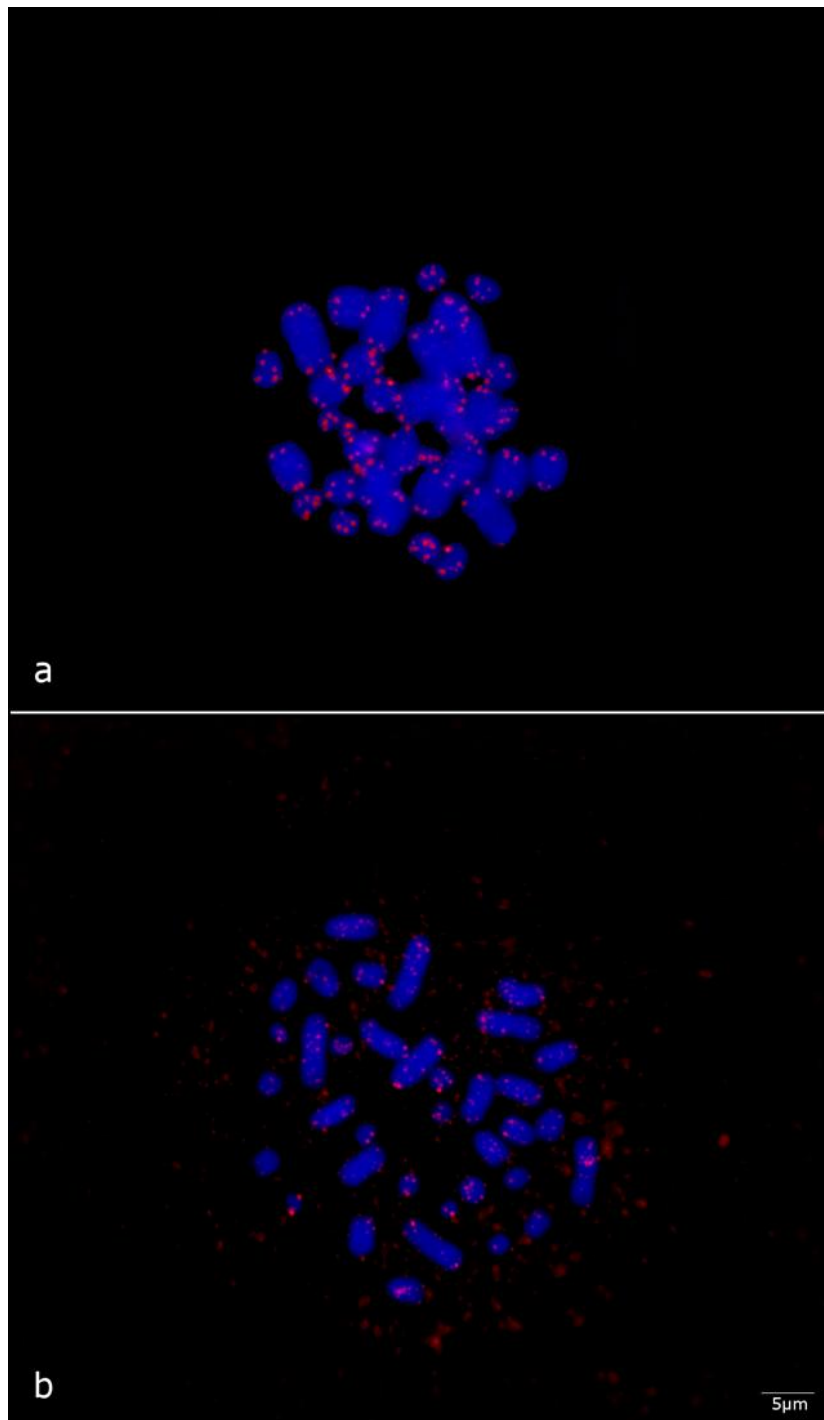
C-pruhování u samce *P. oviceps* odhalilo jen velmi nízkou kumulaci konstitutivního heterochromatinu v oblasti centromer u všech chromozomových párů (Obr. 14). U všech samic byl objeven jeden výrazně heterochromatinizovaný chromozom 9. páru (Obr. 14, d).



**Obr. 14:** C-pruhování v metafázi barvené pomocí směsi DAPI (a) a odpovídající invertovaný karyotyp (c) samce *P. oviceps*, C-pruhování v metafázi barvené pomocí směsi DAPI (b) a odpovídající invertovaný karyotyp (d) samice *P. oviceps* s dalšími příklady podob 9. páru z ostatních metafází (e)



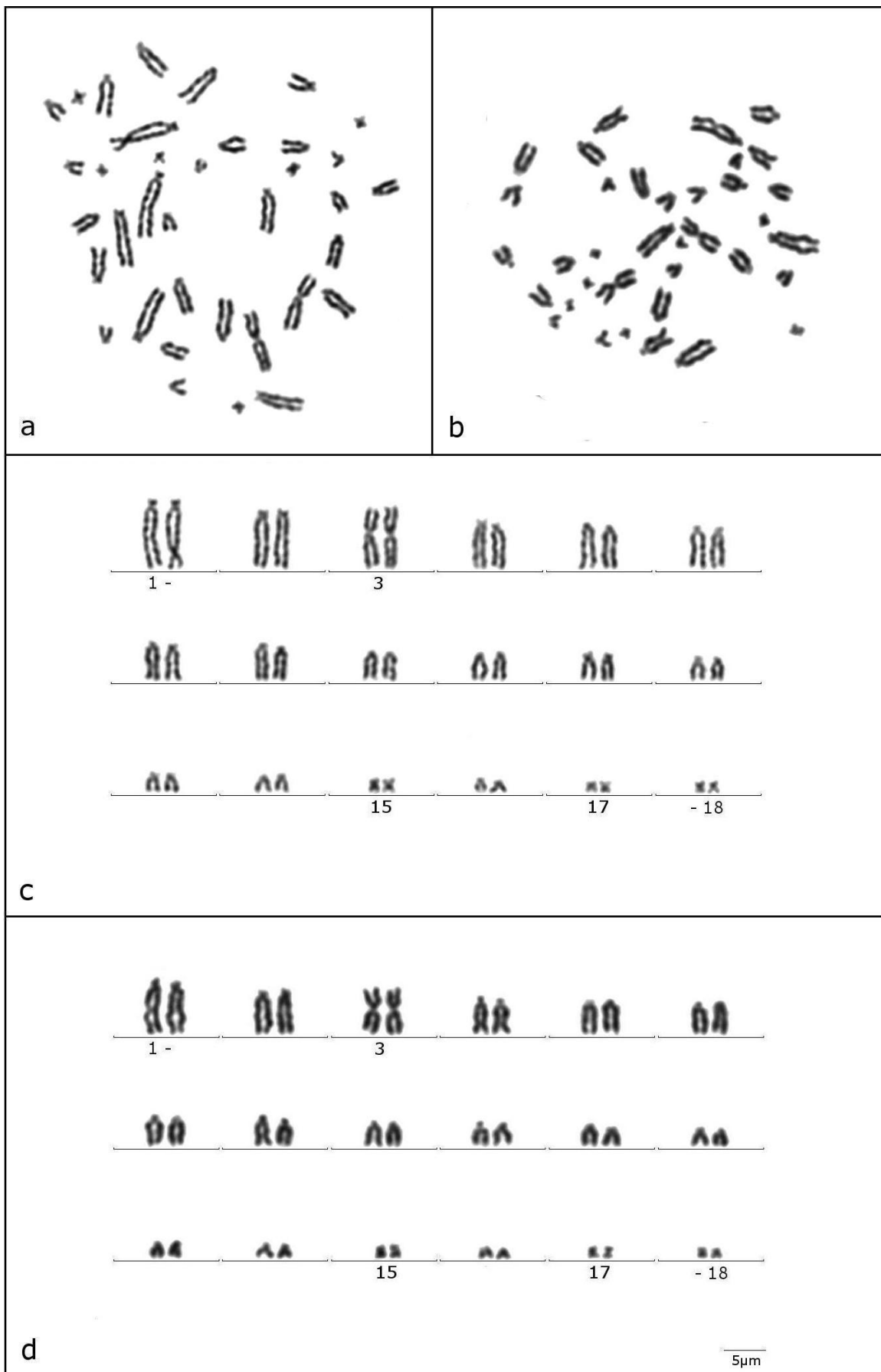
U samce *P. oviceps* jsem po hybridizaci s telomerickou sondou detekovala signály výhradně v telomerických oblastech (Obr. 15, a). U samice se sonda vážala často nespecificky a díky velkému množství backgroundu nejsem schopna vyloučit přítomnost intersticiálních signálů.



**Obr. 15:** FISH s telomerickou sondou aplikovaná na metafázi samce (a) a samice (b) *P. oviceps*

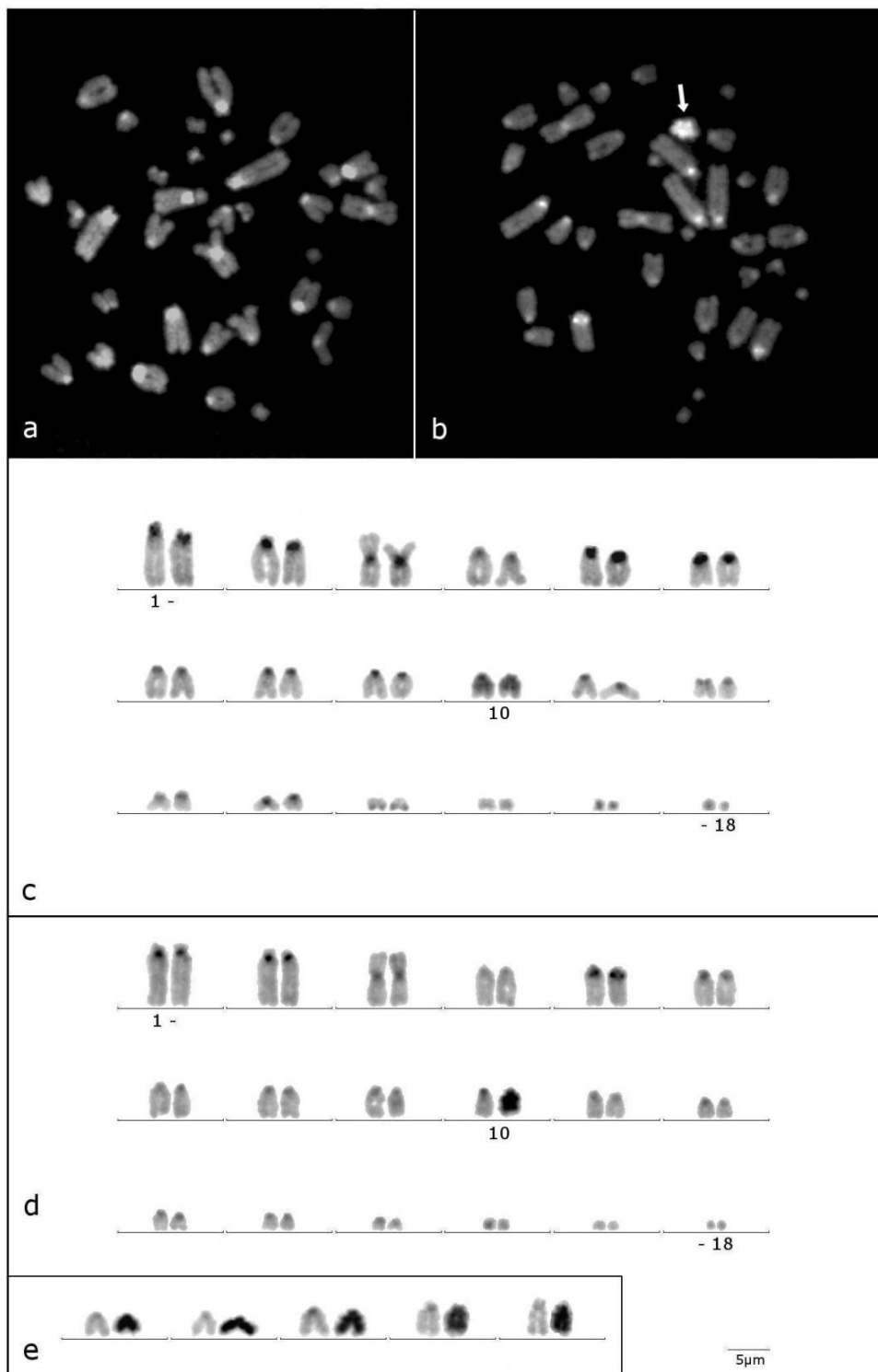
#### 4.5 *Paroedura stumpffi*

Obě pohlaví *P. stumpffi* mají  $2n=36$  chromozomů (Obr. 16). Třetí pár je jistě submetacentrický. Páry 15, 17 a 18 mohou být subtelo- až metacentrické. Všechny zbylé páry jsou buď akrocentrické nebo subtelocentrické.



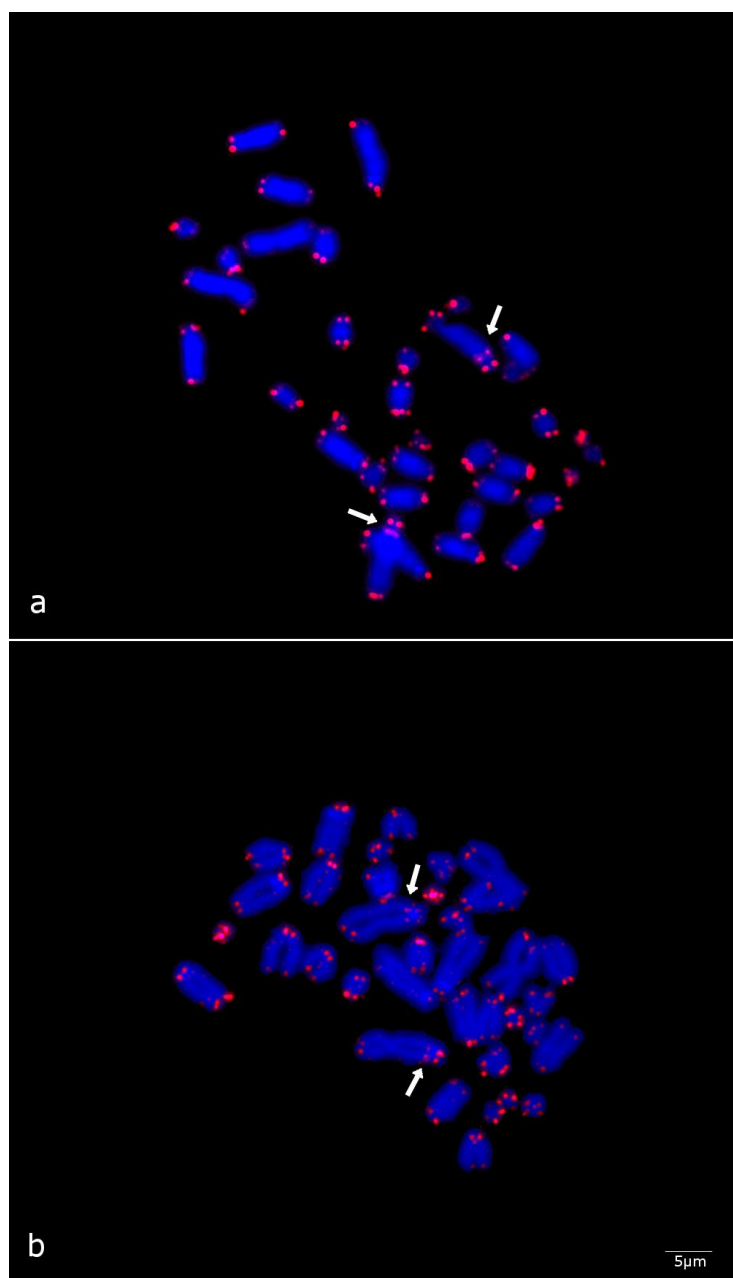
**Obr. 16:** Metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (c) samce *P. stumptzii*. Metafáze barvená Giemsou (b) a odpovídající karyotyp (d) samice *P. stumptzii*

Metoda C-pruhování odhalila u obou pohlaví druhu *P. stumpffi* konstitutivní heterochromatin v oblasti centromer u všech chromozomových párů (Obr. 17). Samice se od samce liší výraznou kumulací konstitutivního heterochromatinu na jednom chromozomu 10. páru (Obr. 17, d). U samce jsem u většiny metafází odhalila kumulaci heterochromatinu na obou chromozomech 10. páru.



**Obr. 17:** C-pruhování v metafázi barvené pomocí směsi DAPI (a) a odpovídající invertovaný karyotyp (c) samce *P. stumpffi*, C-pruhování v metafázi barvené pomocí směsi DAPI (b) a odpovídající invertovaný karyotyp (d) samice *P. stumpffi* s dalšími příklady podob 10. páru z ostatních metafází (e)

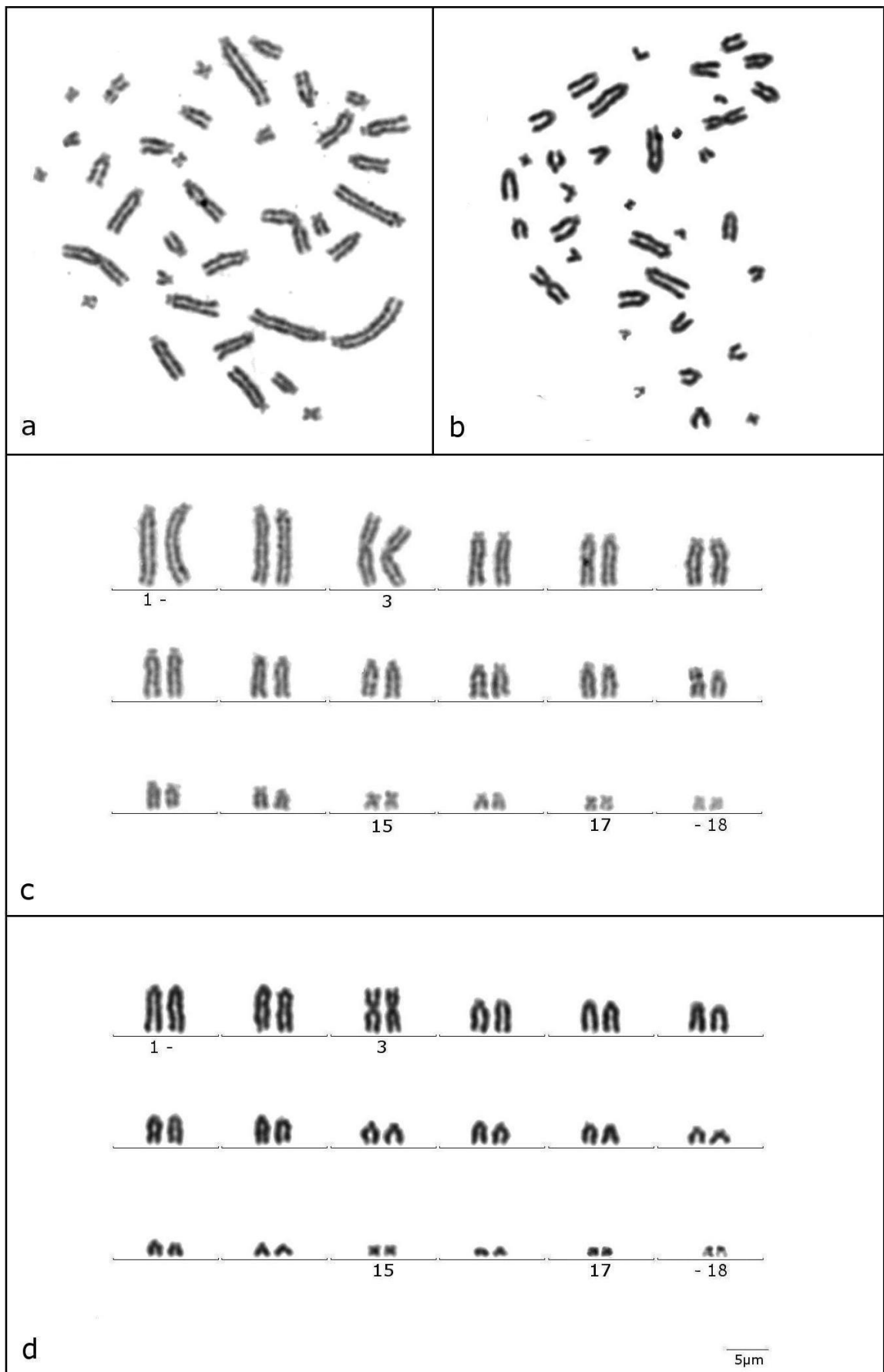
Po hybridizaci s telomerickou sondou jsem u všech párů detekovala signály v telomerických oblastech. U největšího subtelocentrického páru jsem navíc objevila intersticiální telomerické signály (ITS) v centromeře (Obr. 18).



**Obr. 18:** FISH s telomerickou sondou aplikovaná na metafázi samce (a) a samice (b) *P. stumpffi*, ITS označeny šipkami

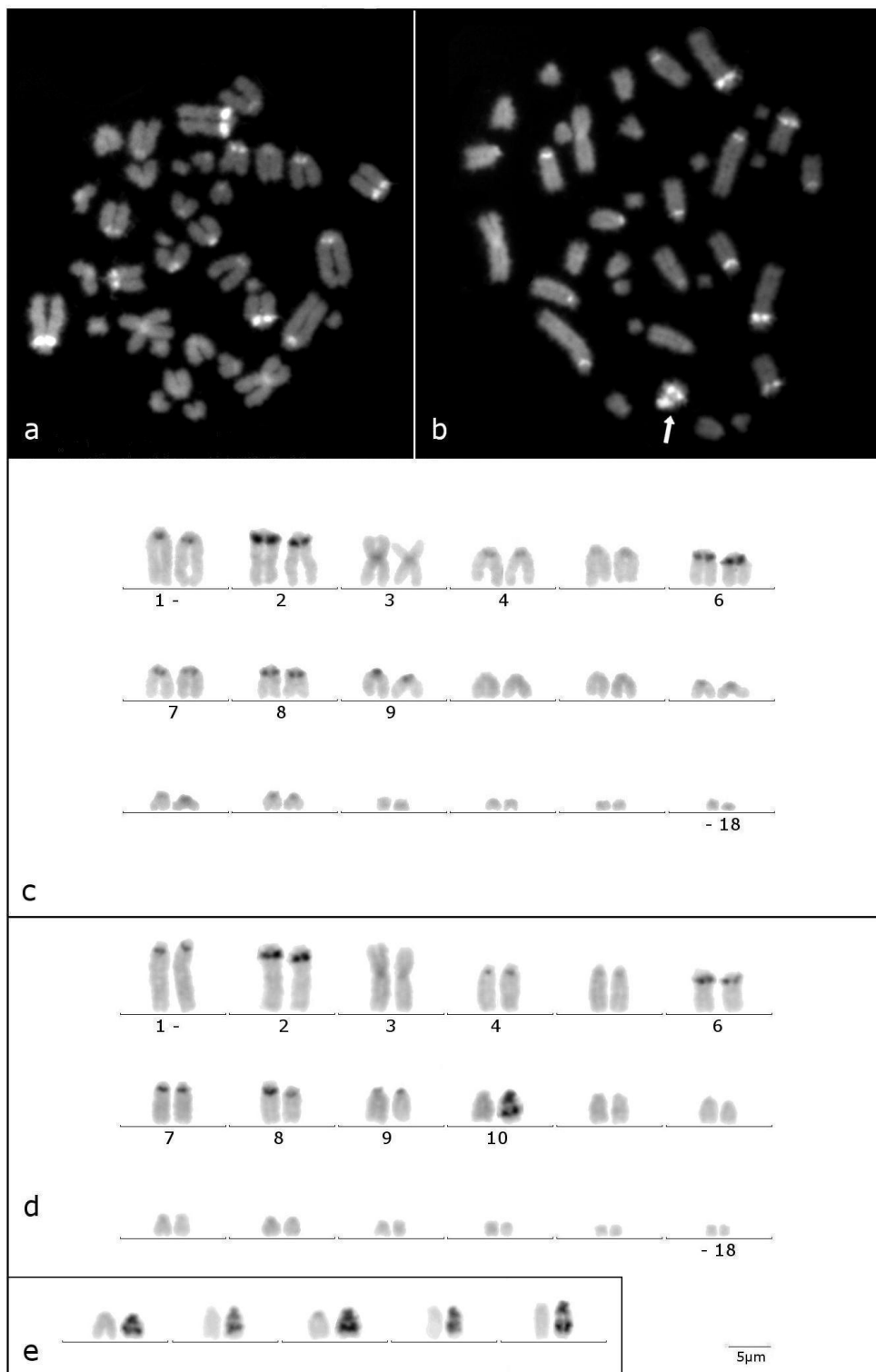
#### 4.6 *Paroedura lohatsara*

Druh *Paroedura lohatsara* má pravděpodobně stejný karyotyp jako *P. stumpffi*. Podařilo se mi získat velmi kvalitní karyotyp samce, na jehož základě usuzuji, že páry 15 a 17 jsou submetacentrické a poslední pár subtelocentrický. Třetí pár je stejně jako u *P. stumpffi* submetacentrický (Obr. 19). Ostatní páry jsou buď akrocentrické nebo subtelocentrické. Celkový počet chromozomů je  $2n=36$ . Karyotypy se mezi pohlavími nijak neliší.



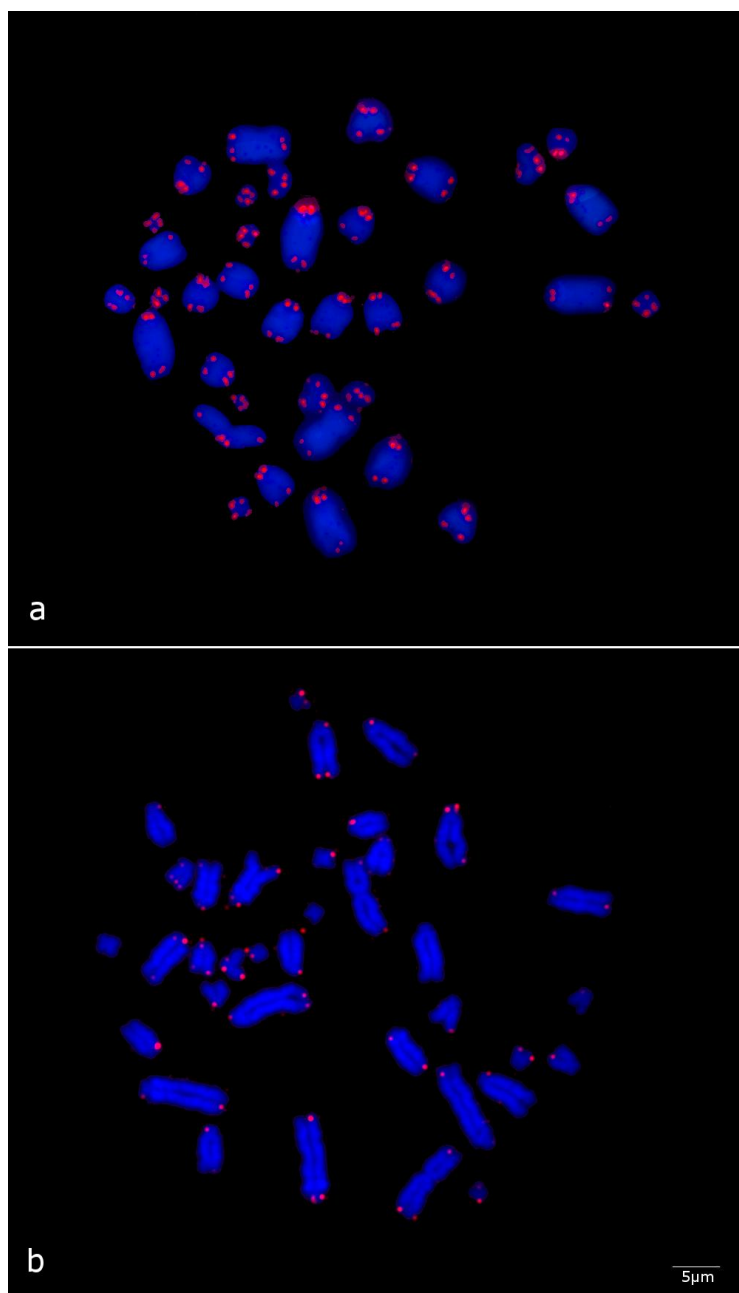
**Obr. 19:** Metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (c) samce *P. lohatsara*. Metafáze barvená Giemsou (b) a odpovídající karyotyp (d) samice *P. lohatsara*

C-pruhování odhalilo u obou pohlaví druhu *P. lohatsara* přítomnost konstitutivní heterochromatinu v oblasti centromer u sedmi akrocentrických a jednoho submetacentrického páru (Obr. 20). Samice má navíc jeden výrazně heterochromatinizovaný chromozom 10. páru (Obr. 20, d).



**Obr. 20:** C-pruhování v metafázi barvené pomocí směsi DAPI (a) a odpovídající invertovaný karyotyp (c) samce *P. lohatsara*, C-pruhování v metafázi barvené pomocí směsi DAPI (b) a odpovídající invertovaný karyotyp (d) samice *P. lohatsara* s dalšími příklady podob 10. páru z ostatních metafází (e)

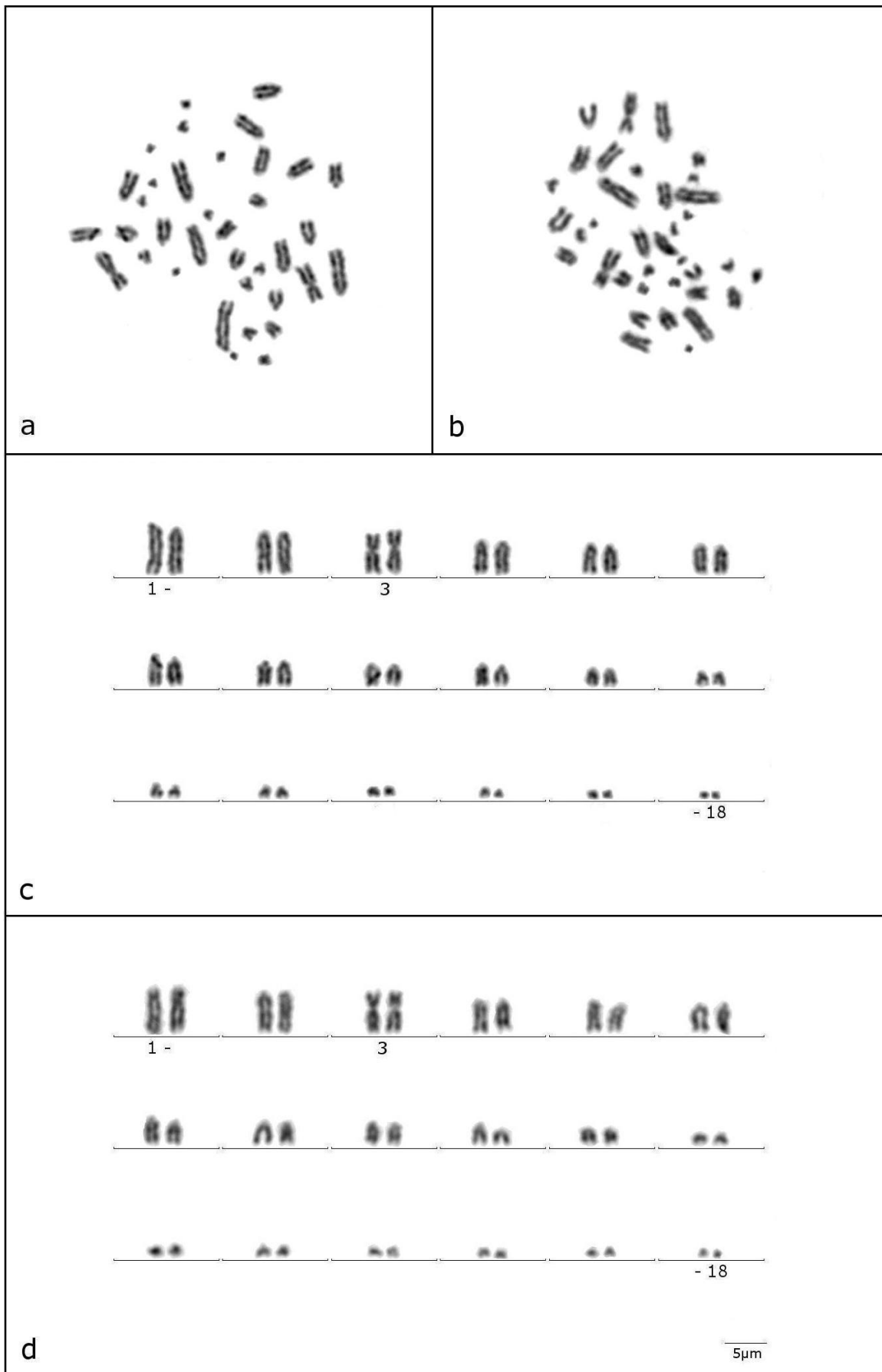
U druhu *P. lohatsara* odhalila FISH s telomerickou sondou signály pouze v telomerických oblastech (Obr. 21).



**Obr. 21:** FISH s telomerickou sondou aplikovaná na metafázi samce (a) a samice (b) *P. lohatsara*

#### 4.7 *Paroedura picta*

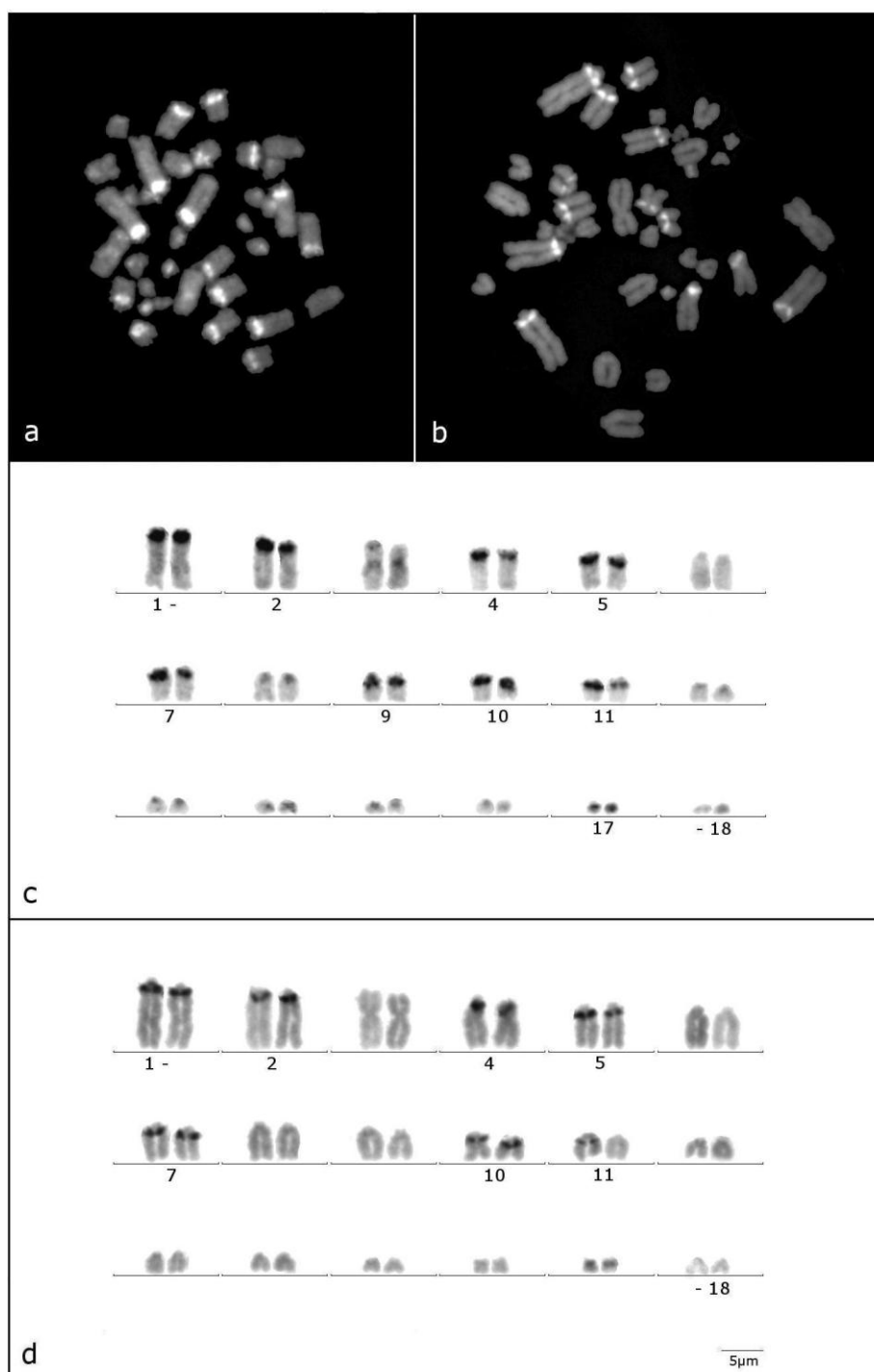
Karyotyp modelového druhu *P. picta* byl popsán u obou pohlaví jako  $2n=36$ , s třetím párem submetacentrickým a všemi ostatními chromozomy akrocentrickými (Main *et al.* 2012; Obr. 22). Karyotypy *P. oviceps* a *P. picta* by se tedy měly shodovat. Já jsem na některých hodnocených metafázích druhu *P. picta* pozorovala alespoň jeden malý chromozomový pár submetacentrický, ovšem jejich podíl nebyl dostatečný na to, abychom mohla tvrzení o akrocentrických chromozomech s jistotou odporovat.



**Obr. 22:** Metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (c) samce *P. picta*. Metafáze barvená Giemsou (b) a odpovídající karyotyp (d) samice *P. picta*

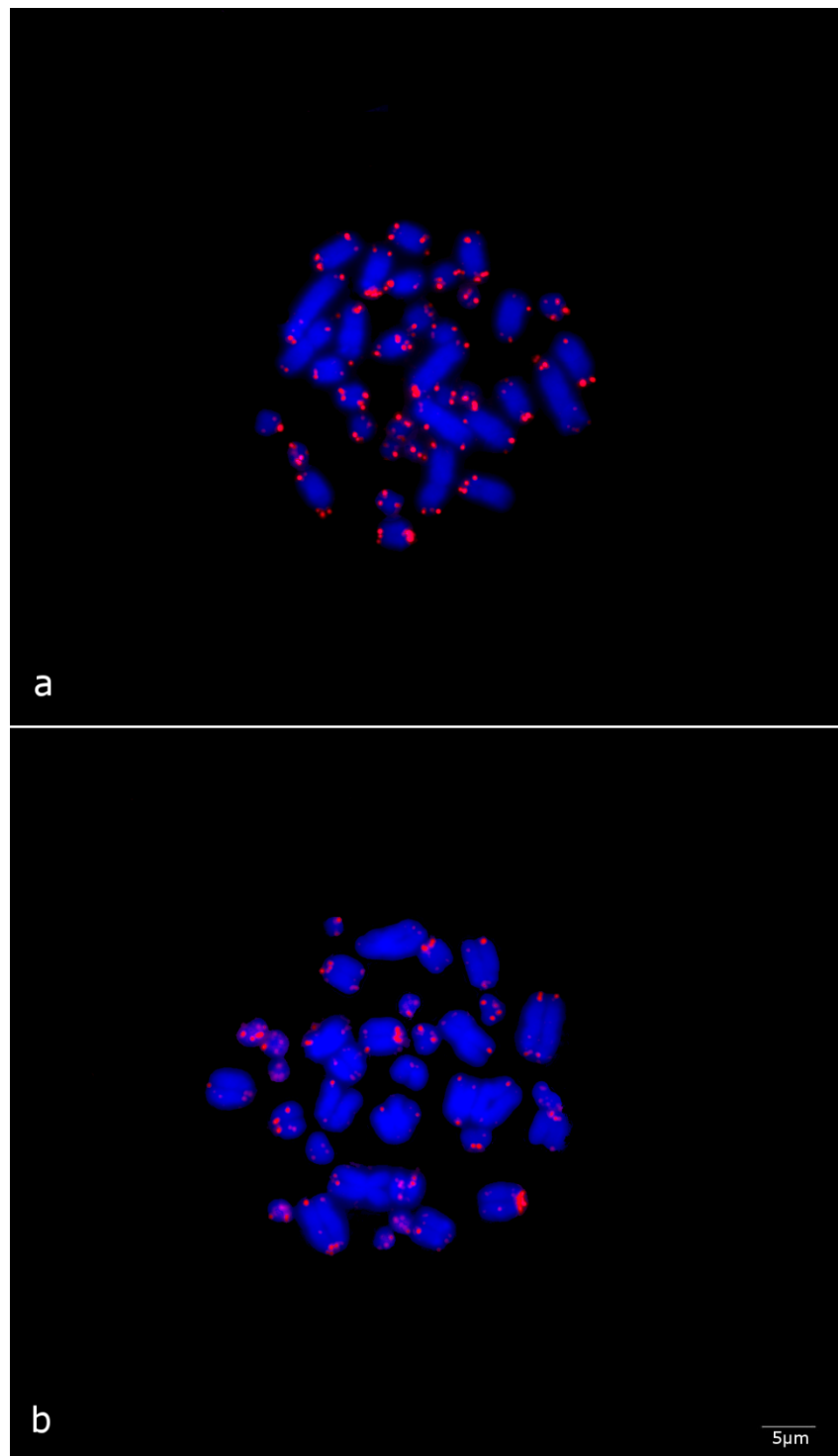


Pomocí metody C-pruhování jsem u druhu *P. picta* vizualizovala výrazné akumulace konstitutivního heterochromatinu v oblasti centromer u sedmi akrocentrických chromozomových párů u obou pohlaví (Obr. 23). U samce jsem oproti samici navíc pozorovala výrazné heterochromatinové bloky v centromerách u 9. a 17. páru (Obr. 23, c). Jeden chromozom z 11. páru byl u obou pohlaví vždy více heterochromatinizovaný než druhý.



**Obr. 23:** C-pruhování v metafázi barvené pomocí směsi DAPI (a) a odpovídající invertovaný karyotyp (c) samce *P. picta*, C-pruhování v metafázi barvené pomocí směsi DAPI (b) a odpovídající invertovaný karyotyp (d) samice *P. picta*

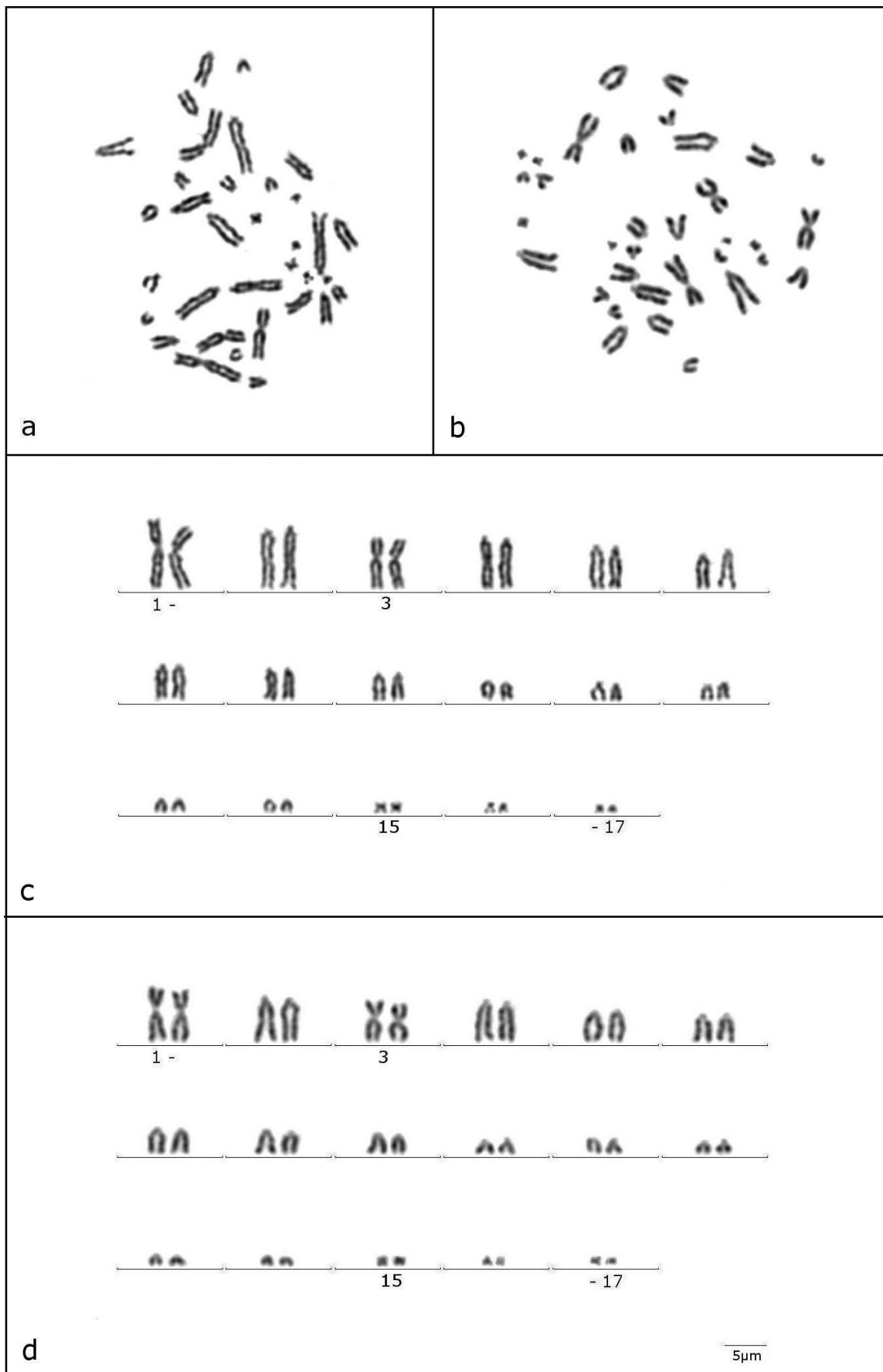
Hybridizací s telomerickou sondou jsem u obou pohlaví *P. picta* získala signály jen v telomerických oblastech (Obr. 24).



**Obr. 24:** FISH s telomerickou sondou aplikovaná na metafázi samce (a) a samice (b) *P. picta*

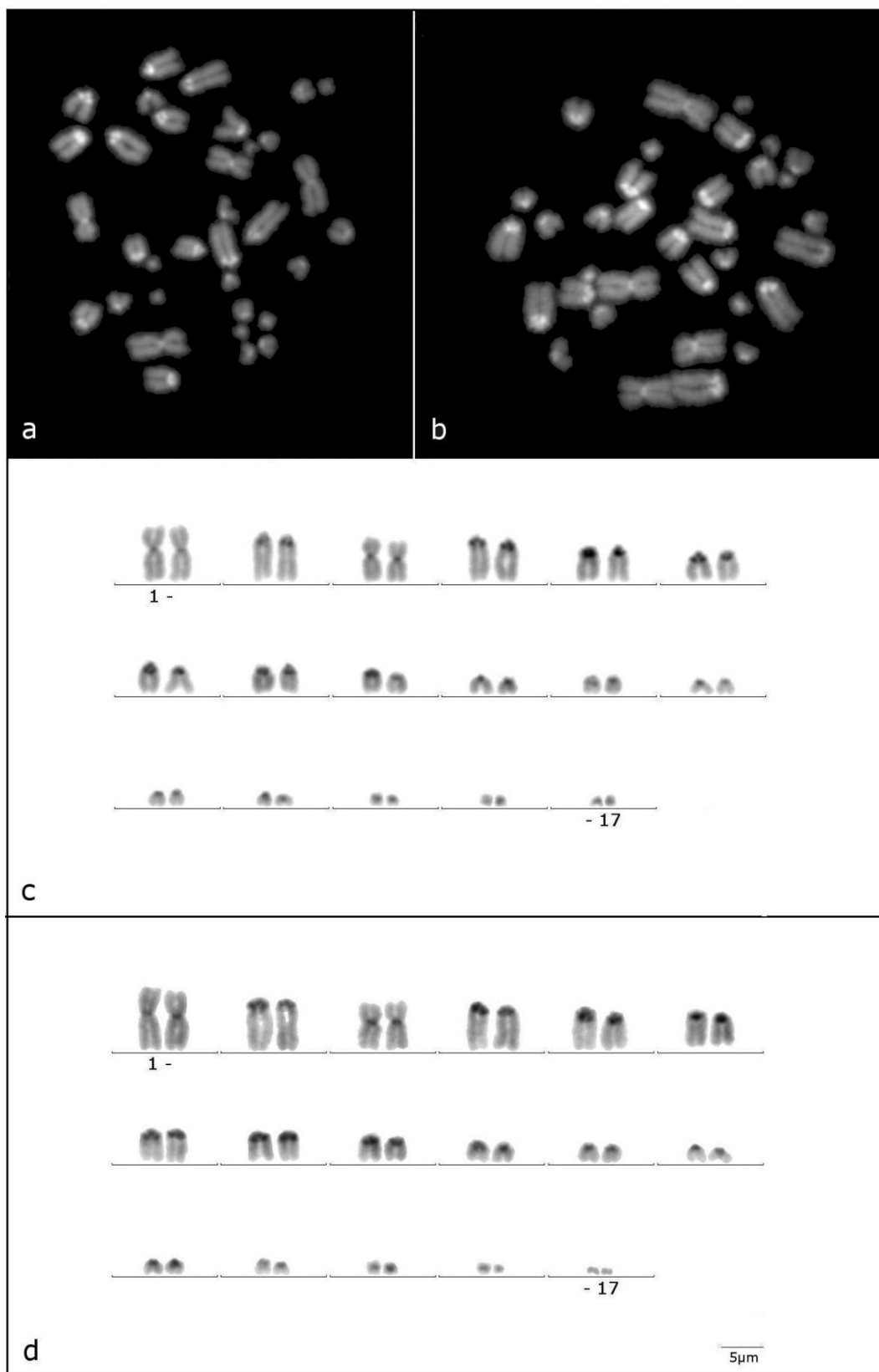
#### 4.8 *Paroedura bastardi*

Obě pohlaví druhu *P. bastardi* mají  $2n=34$  chromozomů v karyotypu. První a třetí pár jsou submetacentrické, 15. pár submeta- nebo subtelocentrický a všechny ostatní chromozomy akrocentrické (Obr. 25).



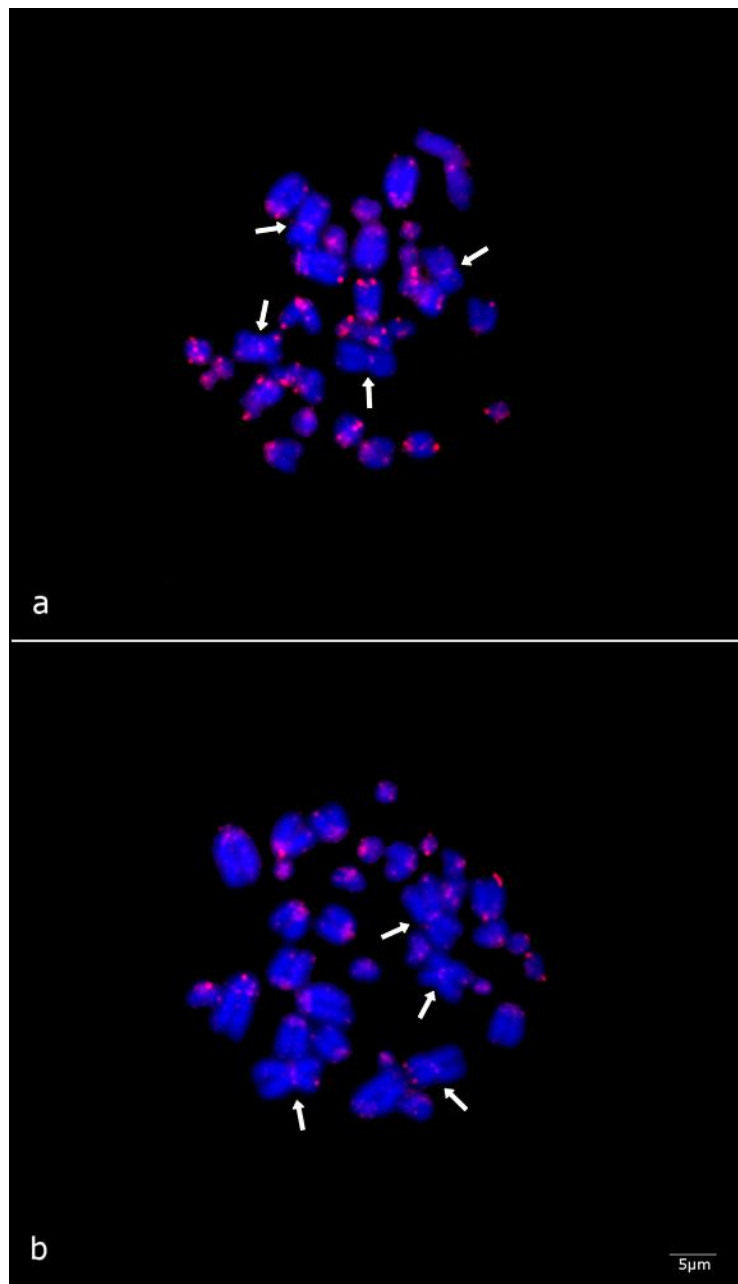
**Obr. 25:** Metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (c) samec *P. bastardi*. Metafáze barvená Giemsou (b) a odpovídající karyotyp (d) samice *P. bastardi*

Pomocí metody C-pruhování jsem u obou pohlaví druhu *P. bastardi* odhalila akumulaci konstitutivního heterochromatinu pouze v centromerách u všech párů chromozomů (Obr. 26).



**Obr. 26:** C-pruhování v metafázi barvené pomocí směsi DAPI (a) a odpovídající invertovaný karyotyp (c) samce *P. bastardi*, C-pruhování v metafázi barvené pomocí směsi DAPI (b) a odpovídající invertovaný karyotyp (d) samice *P. bastardi*

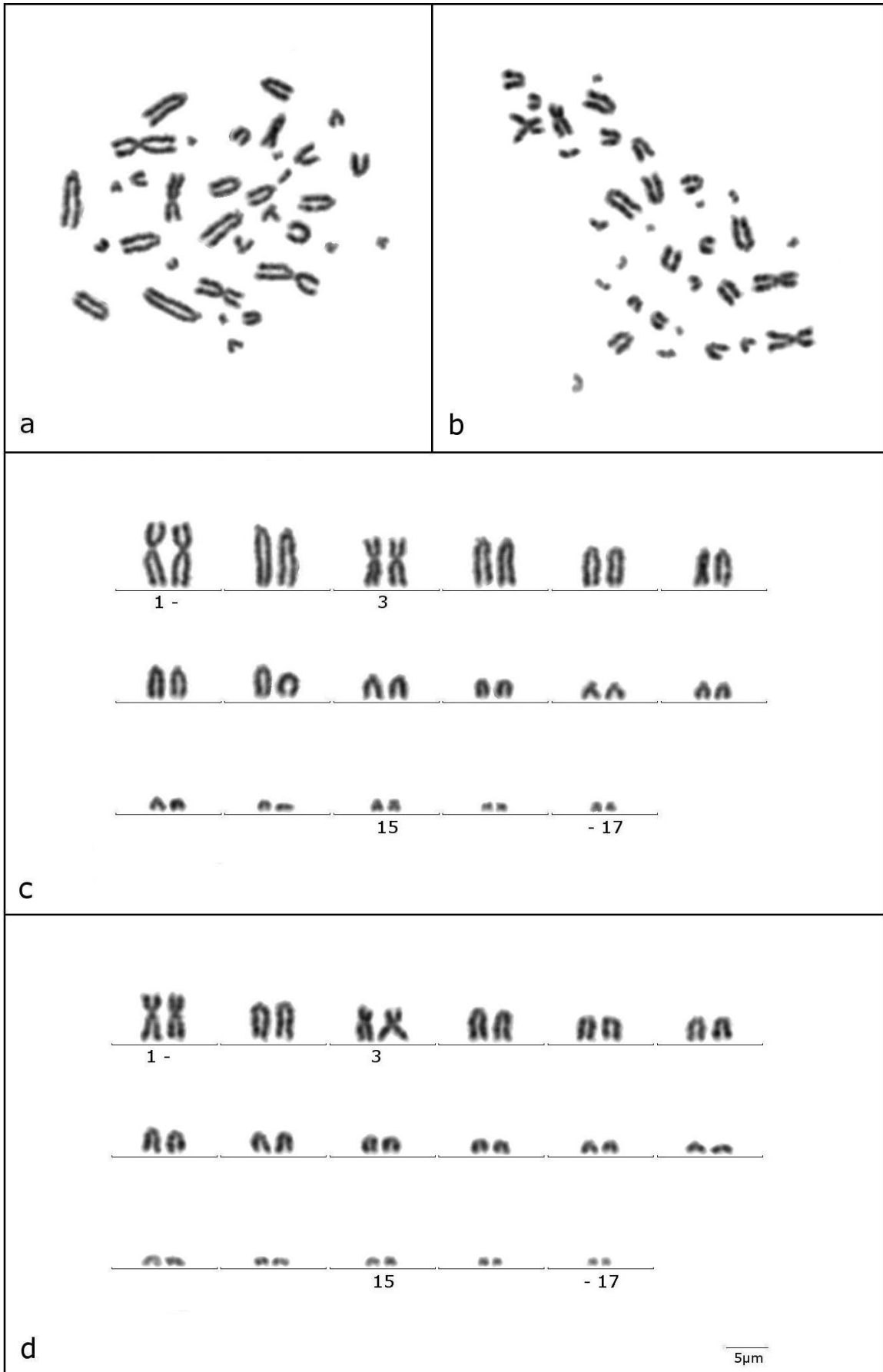
Hybridizace s telomerickou sondou u druhu *P. bastardi* pomohla odhalit intersticiální telomerické signály u obou submetacentrických párů (Obr. 27). Signály v telomerických oblastech jsou u druhu zajímavé tím, že netvoří jasně ohraničené body jako u ostatních druhů, ale jsou na koncových částech chromozomů často rozptýleny.



**Obr. 27:** FISH s telomerickou sondou aplikovaná na metafázi samce (a) a samice (b) *P. bastardi*; ITS zvýrazněny šipkami

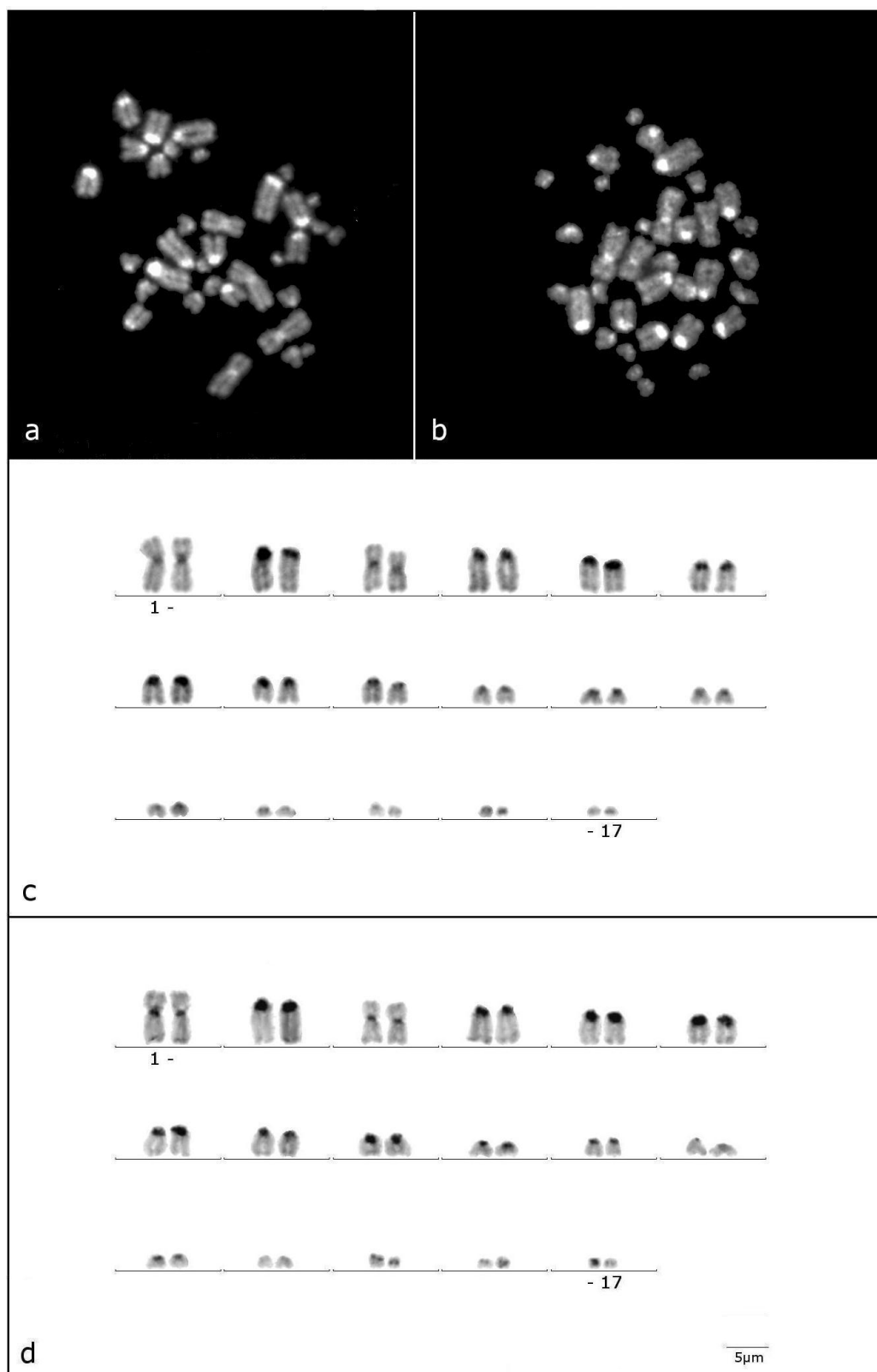
#### 4.9 *Paroedura ibityensis*

Druh *Paroedura ibityensis* má stejně jako *P. bastardi* karyotyp s diploidním počtem  $2n=34$ . První a třetí pár jsou rovněž submetacentrické, ale 15. pár je buď akrocentrický nebo subtelocentrický (Obr. 28). Všechny ostatní páry jsou akrocentrické. Samec i samice mají karyotyp shodný.



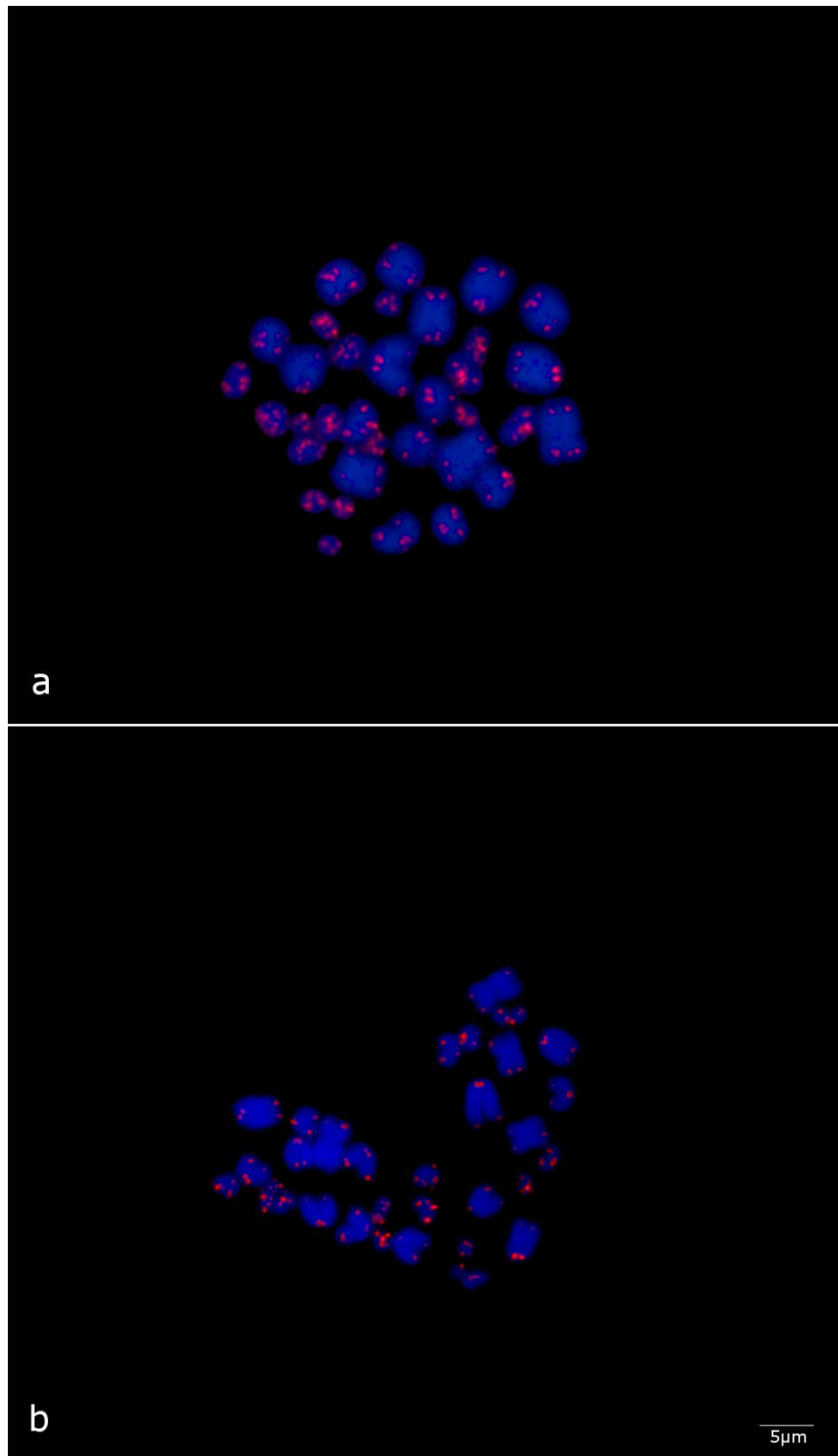
**Obr. 28:** Metafáze barvená Giemsou (a) a odpovídající karyotyp (c) samce *P. ibityensis*. Metafáze barvená Giemsou (b) a odpovídající karyotyp (d) samice *P. ibityensis*

Metoda C-pruhování u druhu *P. ibityensis* vizualizovala akumulaci konstitutivního heterochromatinu v centromerách u všech párů chromozomů (Obr. 29). Vzor pruhování byl u obou pohlaví stejný.



**Obr. 29:** C-pruhování v metafázi barvené pomocí směsi DAPI (a) a odpovídající invertovaný karyotyp (c) samce *P. ibityensis*, C-pruhování v metafázi barvené pomocí směsi DAPI (b) a odpovídající invertovaný karyotyp (d) samice *P. ibityensis*

U samce i samice *P. ibityensis* se mi metodou hybridizace telomerickou sondou podařilo detekovat signály pouze v telomerických oblastech (Obr. 30).



**Obr. 30:** FISH s telomerickou sondou aplikovaná na metafázi samce (a) a samice (b) *P. ibityensis*



## 5. DISKUZE

### Fylogenetická analýza získaných dat o gekonech rodu *Paroedura*

Vytvořila jsem fylogenetickou analýzu za účelem určení ancestrálního diploidního počtu chromozomů pro rod *Paroedura* metodou maximální parsimonie. Výsledky jednoznačně potvrdily, že nejčastější stav -  $2n=36$ , zastoupený u šesti druhů, je i s největší pravděpodobností pro rod *Paroedura* ancestrální (Obr. 31). Při tomto scénáři by došlo v evoluci pouze ke dvěma změnám a to u druhu *P. gracilis*, kde se vyskytuje o jeden chromozomový pár více, a u předka linie zahrnující druhy *P. bastardi*, *P. ibityensis* a *P. sp.*, kde naopak došlo k redukci jednoho chromozomového páru.

Pokud vyneseme na kladogram morfologii chromozomů, analýza vyjde sporně. S jistou pravděpodobností by mohl být ancestrální karyotyp *P. masobe*, ale i karyotyp, který sdílí druhy *P. oviceps* a *P. picta*. Tato část analýzy je ale spíše orientační, jelikož morfologii některých chromozomových párů, především mikrochromozomů, nelze přesně klasifikovat. Účelem bylo graficky znázornit karyotypy druhů, které jsou si nejpodobnější (*P. oviceps* s *P. picta*, *P. lohatsara* s *P. stumpffi*, *P. bastardi* s *P. ibityensis*) a mohou být shodné, a vizualizovat ve fylogenezi případné přestavby ke kterým mohlo dojít.

Pokud uvažujeme, že původní karyotyp pro rod je karyotyp  $2n=36$  s jedním metacentrickým párem, došlo u druhu *P. masobe* pravděpodobně k pericentrickými inverzím u prvního a dvanáctého páru.

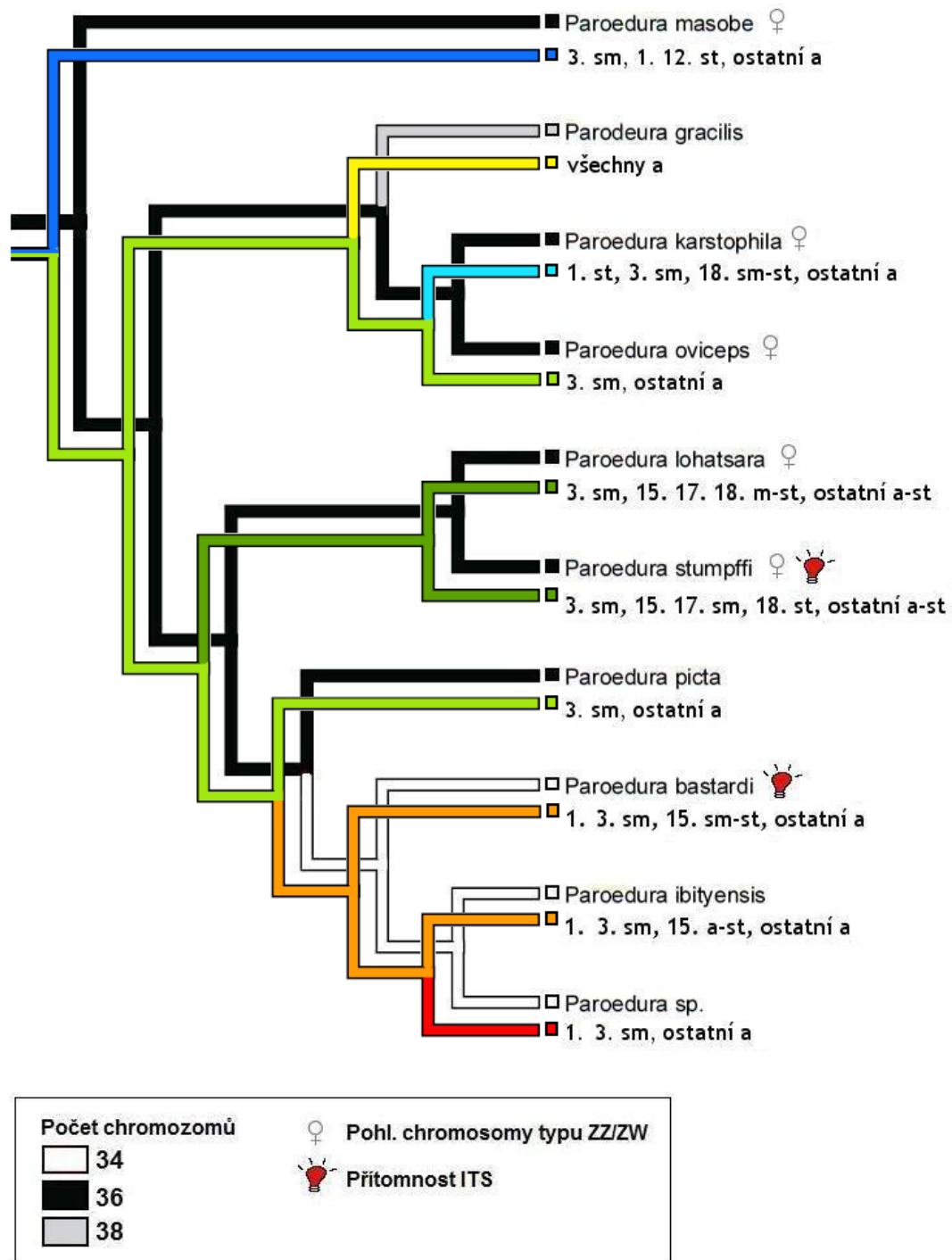
Karyotyp druhu *Paroedura gracilis* odpovídá karyotypu v současné době mnohými autory považovanému za ancestrální pro celou skupinu Gekkota (Gorman 1973, King 1977a, 1990), nicméně v kontextu mnou studovaných druhů je zcela ojedinělý – a to jak diploidním počtem, tak morfologií chromozomů, dokonce i vnitřní strukturou chromatinu. Jelikož druh neleží na bázi fylogenetického stromu pro rod *Paroedura*, je pravděpodobnější, že je odvozený od karyotypu společného předka *P. oviceps* a *P. picta*. Karyotyp *P. gracilis* mohl vzniknout chromozomovým rozpadem homologu 3. submetacentrického páru karyotypu *P. oviceps*.

Druh *P. karstophila* se liší od *P. oviceps* prvním subtelocentrickým a 18. submetacentrickým až subtelocentrickým párem, ty mohly vzniknout díky pericentrickými inverzím.

Druhy *P. lohatsara* a *P. stumpffi* s velmi podobnou morfologií chromozomů náleží do jedné linie, je tedy pravděpodobné že už u jejich společného předka došlo k mnohačetným

pericentrickým inverzím, díky nimž došlo ke změně morfologie většiny chromozomů včetně 15., 17. a 18. páru. Pericentrická inverze by mohla teoreticky odůvodnit i přítomnost intersticiálních telomerických sekvencí u prvního subtelocentrického páru u *P. stumpffi*, ale jelikož se nám nepodařilo detekovat ITS u *P. lohatsara*, bude se spíše jednat o amplifikaci telomerických repetit, tvořících přirozenou součást heterochromatinu.

Pro nejodvozenější linii s druhu *P. bastardi*, *P. ibityensis* a *P. sp.* jsou společným znakem dva páry submetacentrických chromozomů. Jeden submetacentrický pár navíc oproti karyotypu  $2n=36$  pravděpodobně vznikl Robertsonskou fúzí dvou středních akrocentrických párů tohoto karyotypu. Přítomnost intersticiálních telomerických signálů (ITS) v centromerách u obou submetacentrických párů *P. bastardi* podporuje jejich ovlivnění chromozomovými přestavbami v minulosti, ovšem u druhu *P. ibityensis* se nám žádné ITS detekovat nepodařilo, což může mít hned několik vysvětlení. U *P. ibityensis* mohlo v průběhu evoluce dojít k degeneraci telomerických repetit díky strukturním chromozomovým aberacím či bodovým mutacím, nebo naopak došlo k amplifikaci telomerických repetit v centromerách u *P. bastardi* podobně jako u *G. taniae* (Schmid *et al.* 1994), čemuž by nasvědčoval i atypický vzor telomerických signálů v samotných telomerách. Vysvětlením může být i rozdílný osud telomerických sekvencí předcházejících samotné fúzi. Jelikož telomerické sekvence zajišťují stabilitu chromozomů, aby došlo k Robertsonské fúzi je potřeba je předem buď eliminovat nebo deaktivovat (Slijepcevic 1998). V tomto případě by teoreticky výsledky nasvědčovali tomu, že u druhu *P. bastardi* došlo nejprve k inaktivaci telomer, a díky tomu mohly zůstat u sfúzovaných chromozomů zachovány, naopak u *P. ibityensis* samotné fúzi předcházely chromozomové zlomy, které vedly k eliminaci telomer a tím pádem nejsou v centromerách sfúzovaných chromozomů přítomny. Jelikož ale víme, že oba druhy mají velmi podobný karyotyp, je toto vysvětlení nejméně pravděpodobné. Posledním a nejjednodušším vysvětlením může být nedostatečný rozsah telomerických repetit k detekci pomocí použité telomerické sondy u *P. ibityensis* ve srovnání s příbuzným druhem.



**Obr. 31** **Fylogenetická analýza získaných a publikovaných cytogenetických dat rodu *Paroedura*;** Pod názvem každého druhu je uveden krátký popis morfologie chromozomů v jeho karyotypu – číslice znázorňují pořadí konkrétního páru v karyotypu daného druhu a písemné zkratky morfologický typ chromozomů (a- akrocentrický, st- subtelocentrický, sm- submetacentrický, m-metacentrický), zápis dvou zkratkami s pomlčkou (např. sm-st) znamená rozmezí morf. typů v rámci nichž nebylo možné chromozomy přesně klasifikovat. Strom ve stupních šedi je analýzou ancestrálního diploidního počtu chromozomů pro rod *Paroedura* metodou maximální parsimonie. Barevný strom je analýzou ancestrálního karyotypu pro rod se zahrnutím morfologie chromozomů, taktéž metodou maximální parsimonie, analýza je založená na fylogenetické hypotéze Jackman *et al.* 2008

Celkově můžeme prohlásit, že karyotyp je v rámci rodu poměrně stabilní v počtu a základní morfologii, jelikož v evoluci došlo jen ke dvěma mezichromozovým přestavbám – jedné centrické fúzi a jednomu rozpadu. Oproti tomu rozdíly v morfologii malých chromozomů a někdy i makrochromozomů a jistá variabilita v C-pruhování mezi druhy značí, že k vnitrochromozomovým přestavbám docházelo poměrně často.

K bližšímu porozumění původu karyotypu *P. gracilis* by napomohlo v budoucnu použití dalších molekulárně cytogenetických či genetických metod pro přesnou detekci chromozomových přestaveb.

Jak jsem předeslala v úvodu, ancestrální karyotyp pro skupinu Gekkota není zcela uzavřená otázka díky nedostatečným znalostem ve fylogenetických vztazích některých vnitřních linií gekonů. Za ancestrální je tradičně považován karyotyp  $2n=38$  se všemi chromozomy akrocentrickými (Gorman 1973, King 1977a, 1990), ale má bakalářská práce se zahrnutím jak nejnovějších poznatků z cytogenetiky gekonů, tak jejich fylogeneze ukazuje, že ancestrální počet chromozomů pro skupinu Gekkota mohl být rovněž  $2n=36$  (Koubová 2011). Ancestrální karyotyp pro rod *Paroedura*  $2n=36$  opět dokazuje, že příklánět se pouze k jedné z variant by bylo v současnosti předčasné a je třeba dalších studií k zaujmutí jednoznačného stanoviska. Rod *Paroedura* patří do afro-madagaskarské linie gekonů (Gamble *et al.* 2011). Z této linie sdílejí stejný diploidní počet ( $2n=36$ ) druhy rodů *Phelsuma*, *Homopholis* a *Chondrodactylus* (Apréa *et al.* 1996, De Smet 1981). Kvůli nejasnostem ve fylogenetických vztazích ale nevíme, jaký karyotyp je ancestrální pro čeleď Gekkonidae, ani jaký původ má ancestrální karyotyp  $2n=36$  rodu *Paroedura*. Převažující diploidní počty chromozomů u druhů v čeledi Gekkonidae spíše nasvědčují odvozenosti  $2n=36$  stavu od jiného vyššího diploidního počtu.

Zdá se, že chromozomové přestavby nehrály ve speciaci v rámci rodu *Paroedura* klíčovou roli. Například druh *P. bastardi* má velmi podobný karyotyp jako *P. ibityensis*, ačkoli linie s *P. ibityensis* je od linie s *P. bastardi* fylogeneticky odvozená. Oba druhy se se mezi sebou výrazně liší ve velikosti – *P. bastardi* je robustní druh střední velikosti (15 cm), zatímco *P. ibityensis* je ze zahrnutých druhů nejmenší (do 10 cm). Druhy se současně vyskytují v centrální oblasti Madagaskaru, a proto pravděpodobně vznikly sympatrickou speciací. Druh *P. picta* zase sdílí stejný karyotyp jako *P. oviceps*, ačkoli se výrazně liší velikostí (*P. oviceps* - 11cm, *P. picta* – největší, 18cm), stavbou těla a geografickou i fylogenetickou distribucí. Naopak chromozomové přestavby mohly hrát určitou roli ve speciaci linie vedoucí k druhům *P. stumpffi* a *P. lohatsara*, jelikož sdílejí velmi podobné

karyotypy a zároveň jsou velikostně srovnatelné a obývají stejné biotopy v severozápadní části Madagaskaru.

Pouhé porovnání diploidních počtů a morfologie chromozomů mezi druhy ale nemusí spolehlivě vypovídat o míře vlivu chromozomových přestaveb na speciaci. Například u ptáků jsme svědky obrovské druhové diverzity a přitom velké konzervativnosti karyotypů. Ptáčích druhy mají téměř neměnné diploidní počty chromozomů a v karyotypové evoluci u nich došlo k minimu mezichromozomových přestaveb. Až porovnáním celých genomů ptačích druhů bylo odhaleno překvapivě mnoho přestaveb vnitrochromozomových (Skinner & Griffin 2012), které určitou roli ve speciích stále hrát mohou.

U druhů *P. masobe*, *P. karstophila*, *P. oviceps*, *P. lohatsara* a *P. stumpffi* byly detekovány pohlavní chromozomy. Jako většina gekonů, u kterých byly objeveny pohlavní chromozomy, mají i tyto druhy rodu *Paroedura* pohlavní chromozomy typu ZZ/ZW. Pohlavní chromozomy všech druhů jsou homomorfní - W i Z jsou akrocentrické a liší se pouze vnitřní strukturou chromatinu, což bylo též dokumentováno např. u druhu *Heteronotia binoei* (Moritz 1984a). Na rozdíl od variability v rámci druhu *H. binoei* ale mají Z i W pohlavní chromozomy zástupců rodu *Paroedura* velmi podobný vzor C-pruhů uvnitř druhů i v rámci celého rodu. Z a W chromozomy jednotlivých druhů jsou i podobně velké – 10. pár karyotypu *P. masobe*, *P. karstophila*, *P. lohatsara* a *P. stumpffi*. Jedinou výjimkou je *P. oviceps*, kde pohlavní chromozomy představují 9. chromozomový pár. Tato odchylka bude pravděpodobně způsobená rozsáhlou heterochromatinizací hlavně v pericentromerické oblasti. Morfologická konzervativnost pohlavních chromozomů napříč druhy může indikovat jejich vzájemnou homologii, tu bude potřeba v budoucnu otestovat pokročilejšími molekulárně cytogenetickými metodami. Proti hypotéze, že jsou ZZ/ZW páry mezi druhy homologické, stojí fakt, že druh *Paroedura gracilis*, fylogeneticky ležící mezi *P. masobe* a ostatními druhy, u kterých byly pohlavní chromozomy detekované, nebyl tento znak pozorován. Samice *P. gracilis* má heterochromatinizované oba chromozomy 17. páru. Jelikož byla prostudována jen jedna samice, nemůžeme ale vyloučit, že se jedná pouze o individuální variabilitu v heterochromatinizaci. K odhalení pohlavních chromozomů by bylo nezbytné studovat další jedince tohoto druhu. U *P. gracilis* mohlo dojít k rozsáhlým chromozomovým přestavbám, jejichž výsledkem je jiná podoba pohlavních chromozomů homologických s pohlavními chromozomy ostatních druhů, případně došlo k úplnému vymizení pohlavních chromozomů u předka *P. gracilis*. Jednou z možností také je, že pohlavní chromozomy druhů *P. karstophila*, *P. oviceps* a *P. lohatsara*, *P. stumpffi* vznikly nezávisle.

Pohlavní chromozomy se opakovaně nepodařilo detekovat u *P. picta*, ačkoli tento druh vykazuje vyrovnané poměry pohlaví u snůšek inkubovaných za různých teplot (Blumberg *et al.* 2002, Kratochvíl *et al.* 2006, 2008). Pohlavní chromozomy nebyly detekovány ani u *P. bastardi* a *P. ibityensis*. Uvedené tři druhy společně tvoří monofylum, což znamená, že již u předka této linie mohlo dojít k dediferenciaci či aspoň dechromatinizaci pohlavních chromozomů, popřípadě k změně způsobu určení pohlaví. Absenci pohlavních chromozomů u těchto druhů bude nutné ještě v budoucnu prověřit pokročilejšími molekulárně cytogenetickými metodami.

#### Studie Aprea *et al.* (2013)

Po skončení všech laboratorních analýz, při finálním dokončování textové podoby mé diplomové práce, byl publikován článek zabývající se právě chromozomovými přestavbami v rámci rodu *Paroedura*. Následující text tak bude věnován srovnání mých výsledků s touto prací.

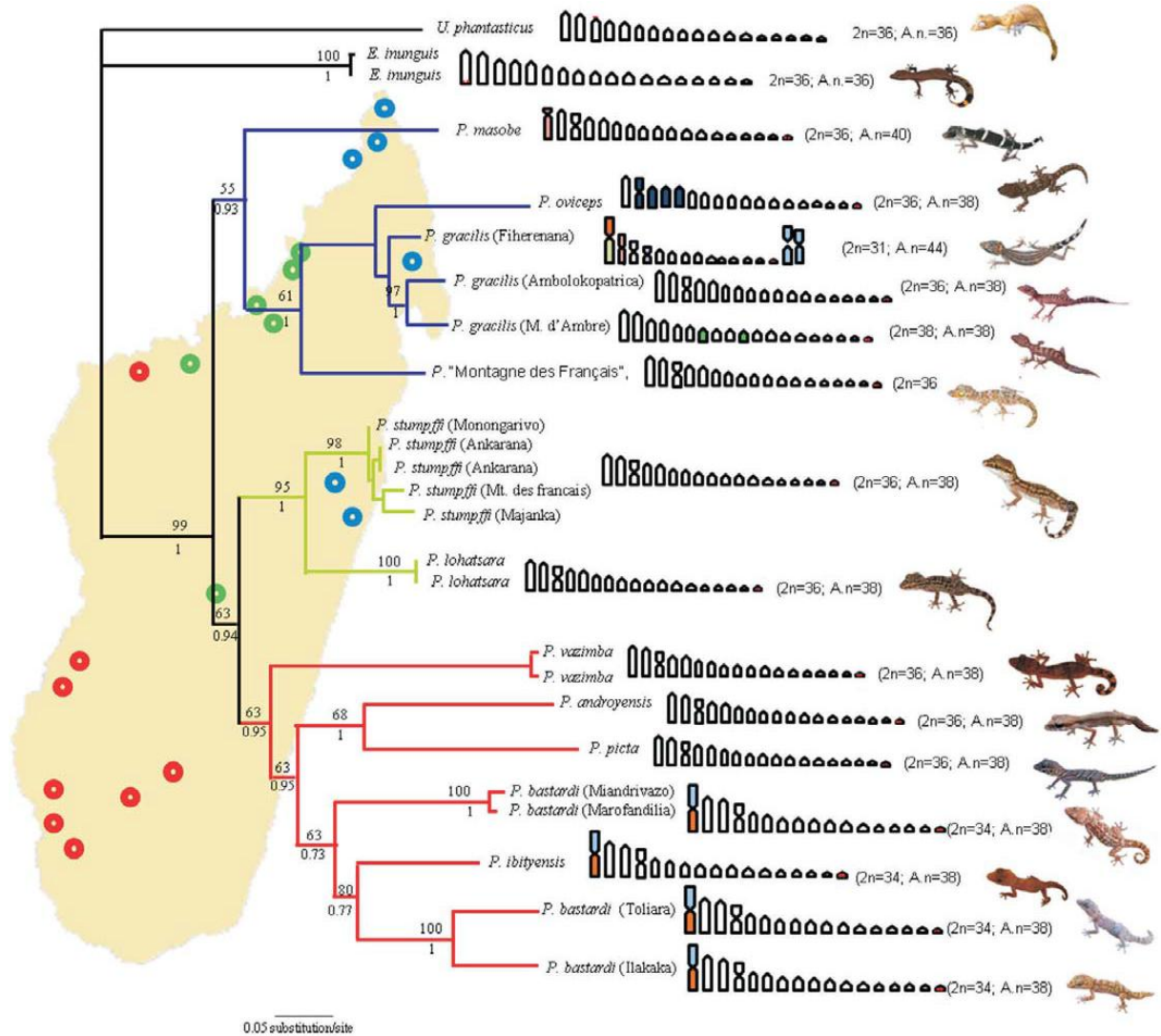
Aprea *et al.* (2013) získali karyotypy 11 druhů rodu *Paroedura* (*P. masobe*, *P. oviceps*, *P. gracilis*, *P. stumpffi*, *P. lohatsara*, *P. vazimba*, *P. androyensis*, *P. picta*, *P. bastardi*, *P. ibityensis* a *P. sp.* z lokality Montagne des Francais) a dvou blízké příbuzných druhů *Uroplatus phantasticus* (sesterský k rodu *Parodura* podle Raxworthy *et al.* 2008) a *Ebenavia inunguis* (sesterská k rodu *Parodura* podle Jackman *et al.* 2008).

S autory se shodují u všech druhů v diploidním počtu chromozomů, zatímco morfologii chromozomů hodnotíme mírně odlišně – všechny chromozomy, které já klasifikuji jako akrocentrické, klasifikují jako telocentrické, a chromozomy, které jsem určila jako submetacentrické, řadí mezi metacentrické. Aprea *et al.* (2013) navíc posuzují první pár v karyotypu *P. masobe* jako submetacentrický a ostatní všechny telocentrické, u *P. lohatsara* a *P. stumpffi* zase kromě třetího páru posuzují všechny páry bez výjimky jako telocentrické. U druhů *P. ibityensis* a *P. bastardi* řadí autoři dvouramenné chromozomy mezi páry na čtvrté místo, zatímco u *P. oviceps* naopak na druhé. Studie italského týmu oproti mé práci zahrnuje i druhy *P. vazimba* NUSSBAUM & RAXWORTHY, 2000, *P. androyensis* (GRANDIDIER, 1867) a *P. sp.* (lokality Montagne des Francais), které vlastní karyotyp v rámci rodu *Parodura* nejčastější –  $2n=36$ , se všemi páry jednoramennými až na třetí chromozomový pár. U blízké příbuzných druhů k rodu *Paroedura* - *U. phantasticus* (BOULENGER, 1888) a *E. inunguis* BOETTGER, 1878, rovněž z Madagaskaru, popsali karyotyp také  $2n=36$ , ale se všemi chromozomy telocentrickými. Studie Aprea *et al.* (2013) je naopak chudší o karyotyp druhu *P. karstophila*.

Velmi zajímavé je odhalení variability mezi populacemi *P. gracilis*. U jedinců obou pohlaví z lokalit na severu ostrova byl popsán karyotyp  $2n=38$  se všemi chromozomy telocentrickými, populace na severovýchodě vykazovala karyotyp  $2n=36$  s třetím párem metacentrickým a ostatními telocentrickými, a z populací ve střední části ostrova se podařilo získat pouze karyotypy samic, které měly  $2n=31$  s páry 1-4 metacetrickými, 5-14 telocentrickými a dva chromozomy z trivalentu byli střední telocentricki zatímco třetí velký metacentrik. Autoři nijak nekomentují, že by tento karyotyp mohl znamenat přítomnost  $Z_1Z_2W$  systému pohlavních chromozomů.

Apra *et al.* (2013) použili kromě klasického barvení Giemsovým barvivem metodu barvení chromozomů dusičnanem stříbrným a odhalili tak u zkoumaných druhů pozice organizátorů jadérka (nucleolar organiser region – NOR). Všechny druhy rodu *Paroedura* mají NOR na posledním nejmenším chromozomovém páru, zatímco u druhu *E. inunguis* se NOR vyskytuje v peritelomerické oblasti prvního chromozomového páru a u *U. phantasticus* v apikální oblasti třetího chromozomového páru. Podle nejnovějších studií se zdá, že chromozomová divergence u rodu *Uroplatus* se odehrála bez změny diploidního počtu nebo morfologie, zatímco k přesunu NOR došlo několikrát, stejný trend pozorujeme i v rámci rodu *Phelsuma* (Apra *et al.* 1996, Apra 2013 podle Apra 2006 nepublikováno). V kontrastu s tím v rámci rodu *Paroedura* ke změně množství nebo umístění NORů nedošlo, zatímco ke změně v počtu a morfologii chromozomů došlo hned několikrát.

Součástí studie bylo rovněž porovnání sekvencí dvou mitochondriálních a jednoho jaderného genu mezi odchycenými jedinci jednotlivých druhů za účelem odhadnutí nukleotidové variability v těchto genech a genetické vzdálenosti mezi druhy. Vysoká nukleotidová diverzita v těchto genech byla pozorována mezi populacemi druhů *P. bastardi* a *P. gracilis*, naopak nízká u *P. stumpffi*. V průměru jsou si nejméně geneticky vzdálené druhy *P. stumpffi* a *P. lohatsara*, nejvíce naopak *P. gracilis* a *P. vazimba*. Autoři na závěr použili tato získaná data k rekonstrukci fylogenetických vztahů mezi druhy pomocí Bayesiánského přístupu (Obr. 32).



**Obr. 32: Rekonstrukce fylogenetických vztahů Bayesiánskou metodou, založená na mitochondriálních i jaderných sekvencích a výsledky cytogenetických analýz rodu *Paroedura*;** Nad/pod jednotlivými větvemi jsou uvedeny hodnoty pravděpodobností pro jednotlivé nody; barvy jednotlivých linií reprezentují distribuci druhů na Madagaskaru: tmavě modrá=východ a severovýchod, zelená=sever a severozápad, červená=střed a jihozápad; na zobrazených karyogramech každého druhu jsou barevnou výplní zřazorněny přestavby (pokud k nějakým došlo); za karyogramy je uvedena hodnota diploidního počtu (2n) a počet chromozomových ramen v karyotypu (A.n.). Obrázek převzat z Aprea *et al.* (2013).

Analýza autorů nedokázala objasnit fylogenetické vztahy mezi rody *Uroplatus*, *Ebenavia* a *Paroedura*, ale monofylum rodu *Paroedura* silně podporuje. Překvapivým objevem je označení druhů *P. gracilis* a *P. bastardi* za parafyletické seskupení několika příbuzných druhů a to proto, že jejich určité populace mají významně geneticky blíže k příslušníkům ostatních druhů než k jedincům z jiných populací vlastního druhu.

Italští kolegové neaplikovali metodu C-pruhování, fluorescenční *in situ* hybridizace nebo jiných pokročilejších molekulárně cytogenetických metod a tudíž nedetekovali žádné pohlavní chromozomy.



## 6. ZÁVĚR

Výsledky mé práce a výsledky nejnovější publikované studie o druzích rodu *Paroedura* (Aprea *et al.* 2013) dokládají, že se jedná o cytogeneticky velmi zajímavý rod vyžadující další zkoumání.

Ukázalo se, že ancestrálním karyotypem celé skupiny je diploidní počet chromozomů  $2n=36$ . Uvnitř rodu pak došlo k několika mezichromozomovým přestavbám. Nicméně základní počet a morfologie chromozomů je v této skupině poměrně konzervativní. Přesto však rozdíly v morfologii chromozomů na užší škále (akrocentrické či submetacentrické mikrochromozomy) nasvědčují, že k vnitrochromozomovým přestavbám v rámci rodu docházelo poměrně často. Odhalení pohlavních chromozomů u pěti druhů navíc přináší nové informace o pohlavně determinačních mechanismech pro další skupinu šupinatých plazů a věřím, že tyto informace přispějí k porovnání s ostatními liniemi a k diskuzi o evoluci pohlavních chromozomů u plazů.

Molekulární a chromozomová data nasvědčují tomu, že k chromozomovým přestavbám (chr. fúzí, inverzí i štěpení) v rámci rodu došlo několikrát nezávisle. Velkým přínosem k úplnému porozumění karyotypové evoluce a jejího vlivu na speciaci rodu by bylo nyní získat karyotypy ostatních popsaných druhů a porovnat je s těmi známými; otestovat homologii pohlavních chromozomů u druhů, u kterých byly objeveny; definitivně určit způsob sexuální determinace u ostatních druhů, a s ohledem na parafyletičnost několika druhů navázat s dalšími taxonomickými i fylogenetickými studiemi.

## SEZNAM LITERATURY

- Apra, G. (2006). Radiazione evolutiva dei Geconidi africani: un approccio cromosomico e molecolare. Unpublished theseis of Dottorato di Ricerca in Biologia avanzata. Università degli Studi di Napoli Federico II, Naples, Italy.\*
- Apra, G., Odierna, G., Capriglione, T., Caputo, V., Morescalchi, A. & Olmo, E. (1996). Heterochromatin and NOR distribution in the chromosomes of six gekkonid species of the genus *Phelsuma* (Squamata:Gekkonidae). *Journal of African Zoology* 110: 341-349.
- Apra, G., Andreone, F., Fulgione, D., Petracchioli, A. & Odierna, G. (2013). Chromosomal Rearrangements Occurred Repeatedly and Independently during Species Diversification in Malagasy Geckos, Genus *Paroedura*. *African Zoology* 48: 96-108.
- Austin, J.J., Arnold, E.N. & Jones, C.G. (2003). Reconstructing an island radiation using ancient and recent DNA: the extinct and living day geckos (*Phelsuma*) of the Mascarene islands, *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 109-122.
- Bickham, J.W. & Baker, R.J. (1979). Canalization model of chromosomal evolution. *Bulletin Carnegie Museum of Natural History* 13: 70-84.
- Blumberg, M.S., Lewis, S.J. & Sokoloff, G. (2002). Incubation temperature modulates post-hatching thermoregulatory behavior in the Madagascar ground gecko, *Paroedura pictus*. *Journal of Experimental Biology* 205: 2777-2784.
- Brown, J.D. & O'Neill, R.J. (2010). Chromosomes, conflict, and epigenetics: chromosomal speciation revisited. *The Annual Review of Genomics and Human Genetics* 11: 291-316.
- Bush, G.L., Case, S.M., Wilson, A.C. & Patton, J.L. (1977). Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 3942-3946.
- Carranza, S., Arnold, E.N., Mateo, J.A. & Geniez, P. (2002). Relationships and evolution of the North African geckos, *Geckonia* and *Tarentola* (Reptilia: Gekkonidae), based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23: 244-256.
- Chen, J.C., Peng, X.B. & Yu, D.W. (1986). Studies on the karyotypes of three species of the genus *Gekko*. *Acta Herpetologica Sinica* 5: 24-29.
- Coomber, P., Crews, D. & Gonzalez-Lima, F. (1997). Independent effects of incubation temperature and gonadal sex on the volume and metabolic capacity of brain nuclei in the leopard gecko (*Eublepharis macularius*), a lizard with temperature-dependent sex determination. *The Journal of Comparative Neurology* 380: 409-21.
- Craig-Holmes, A.P. & Shaw, M.W. (1971). Polymorphism of human constitutive heterochromatin. *Science* 174: 702-704.
- Crews, D. (1998). On the organization of individual differences in sexual behaviour. *Integrative and Comparative Biology* 38: 118-132.
- Darevsky, I.S., Kupriyanova, L.A. & Roshchin, V.V. (1984). A new all-female triploid

- species of gecko and karyological data on the bisexual *Hemidactylus frenatus* from Vietnam. *Journal of Herpetology* 18: 277-284.
- De Smet, W.H.O. (1981). Description of the orcein stained karyotypes of 27 lizards species (Lacertilia-Reptilia) belonging to the families Iguanidae, Agamidae, Chameleontidae and Gekkonidae (Ascalabota). *Acta Zoologica et Pathologica Antverpiensia* 76: 35-72.
- Dixon, J.R. & Kroll, J.C. (1974). Resurrection of the generic name *Paroedura* for the phyllodactyline geckos of Madagascar, and description of a new species. *Copeia* 1974: 24-30.
- Ezaz, T., Sarre, S.D., O'Meally, D., Graves, J.A.M. & Georges, A. (2010). Sex chromosome evolution in lizards: independent origins and rapid transitions. *Cytogenetic and genome research* 127: 249-260.
- Ferguson-Smith, M.A. & Trifonov, V. (2007). Mammalian karyotype evolution. *Nature Reviews, Genetics* 8: 950-962.
- Gamble, T. (2010). A review of sex determining mechanisms in geckos (Gekkota: Squamata). *Sexual Development* 4: 88-103.
- Gamble, T., Bauer, A.M., Colli, G.R., Greenbaum, E., Jackman, T.R., Vitt, L.J. & Simons, A.M. (2011). Coming to America: multiple origins of New World geckos. *Journal of Evolutionary Biology* 24: 231-244.
- Gorman, G.C. (1973). The chromosomes of the Reptilia, a cytotaxonomic interpretation. In: Chiarelli, A.B. & Capanna, E. (eds.). *Cytotaxonomy and vertebrate evolution*. Academic Press, London, pp 349-424.
- Gornung, E., Mosconi, F., Annesi, F. & Castiglia, R. (2013). The first cytogenetic description of *Euleptes europaea* (Gené, 1839) from Northern Sardinia reveals the highest diploid chromosome number among sphaerodactylid geckos (Sphaerodactylidae, Squamata). *Comparative Cytogenetics* 7: 153-161.
- Graves, J.A.M. (2009). Weird animal genomes and the evolution of vertebrate sex and sex chromosomes. *Annual Review of Genetics* 42: 565-586.
- Günter, A. (1879). On mammals and reptiles from Johanna, Comoro Islands. *Annals and Magazine of Natural History* 3: 215-219.
- Hawlitschek, O. & Glaw, F. (2012). Complex colonization history of nocturnal geckos (*Paroedura*) in the Comoros Archipelago. *Zoologica Scripta* 42: 135-150.
- Heinicke, M.P., Greenbaum, E., Jackman, T.R. & Bauer, A.M. (2012). Evolution of gliding in Southeast Asian geckos and other vertebrates is temporally congruent with dipterocarp forest development. *Biology Letters* 8: 994-997.
- Jackman, T.R., Bauer, A.M., Greenbaum, E., Glaw, F., & Vences, M. (2008). Molecular phylogenetic relationships among species of the Malagasy-Comoran gecko genus *Paroedura* (Squamata: Gekkonidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 46: 74-81.

- Janes, D.E., Organ, C.L., Fujita, M.K., Shedlock, A.M. & Edwards, S.V. (2010). Genome evolution in Reptilia, the sister group of mammals. *Annual review of genomics and human genetics* 11: 239-264.
- Jonniaux, P. & Kumazawa, Y. (2007). Molecular phylogenetic and dating analyses using mitochondrial DNA sequences of eyelid geckos (Squamata: Eublepharidae). *Gene* 407: 105-115.
- King, M. (1977a). Chromosomal and morphometric variation in the gecko *Diplodactylus vittatus* (Gray). *Australian Journal of Zoology* 25: 43-57.
- King, M. (1977b). The evolution of sex chromosomes in lizards. Proceedings of 4<sup>th</sup> international Conference on Reproduction and Evolution. *The Australian Academy of Science*: 55-60.
- King, M. (1979). Karyotypic Evolution in *Gehyra* (Gekkonidae: Reptilia) I. The *Gehyra variegata-punctata* complex. *Australian Journal of Zoology* 27: 373-393.
- King, M. (1982a). Karyotypic Evolution in *Gehyra* (Gekkonidae: Reptilia) II. A new species from the Alligator Rivers region in Northern Australia. *Australian Journal of Zoology* 30: 93-101.
- King, M. (1982b). Karyotypic evolution in *Gehyra* (Gekkonidae: Reptilia). III. The *Gehyra australis* complex. *Australian Journal of Zoology* 30: 93-101.
- King, M. (1984). Karyotypic evolution in *Gehyra* (Gekkonidae: Reptilia) IV. Chromosome change and speciation. *Genetica* 64: 101-114.
- King, M. (1987). Chromosomal evolution in the Diplodactylinae (Gekkonidae: Reptilia). I. Evolutionary relationships and patterns of change. *Australian Journal of Zoology* 35: 507-531.
- King, M. (1990). Chromosomal and immunogenetic data: a new perspective on the origin of Australia's reptiles. In: Olmo, E. (ed.). *Cytogenetics of Amphibians and Reptiles*. Birkhäuser Verlag, Switzerland, pp153-180.
- King, M. (1995). Species evolution the role of chromosome change. *Cambridge University Press*, Cambridge New York, Melbourne.
- King, M. & King, D. (1977). An additional chromosome race of *Phyllodactylus marmoratus* (Gray) (Reptilia: Gekkonidae) and its phylogenetic implications. *Australian Journal of Zoology* 25: 667-672.
- Kluge, G.C. & Eckardt, J.M. (1969). *Hemidactylus garnotii* Duméril and Bibron, a triploid all-female species of gekkonid lizard. *Copeia* 4: 651-664.
- King, M. & Rofe, R. (1976). Karyotypic variation in the Australian gekko *Phyllodactylus marmoratus* (Gray) (Gekkonidae: Reptilia). *Chromosoma* 54: 75-87.
- Koubová, M. (2011). Evoluce pohlavních chromozomů a karyotypů u gekonů (Squamata: Gekkota), Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze.

- Kratochvíl, L., Kubička, L. & Landová, E. (2006). Yolk hormone levels in the synchronously developing eggs of *Paroedura picta*, a gecko with genetic sex determination. *Canadian Journal of Zoology* 84: 1683-1687.
- Kratochvíl, L., Kubička, L. & Landová, E. (2008). Does mechanism of sex determination constrain the potential for sex manipulation? A test in geckos with contrasting sex-determining systems. *Naturwissenschaften* 95: 209-215.
- Kubička, L. & Kratochvíl, L. (2009). First grow, then breed and finally get fat: hierarchical allocation to life-history traits in a lizard with invariant clutch size. *Functional Ecology* 23: 595-601.
- Kubička, L., Starostová, Z. & Kratochvíl, L. (2012). Temperature-dependent rate of clutch production in a tropical lizard (*Paroedura picta*: Gekkonidae): Intraspecific test of the Metabolic Theory of Ecology. *Journal of Thermal Biology* 37: 179-184.
- Larson, A., Prager, E.M. & Wilson, A.C. (1984). Chromosomal evolution, speciation and morphological change in vertebrates the role of social behaviour. *Chromosomes Today* 8: 215–228.\*
- Levan, A., Fredga, K. & Sanberg, A.A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220.
- Main, H., Scantlebury, D.P., Zarkower, D. & Gamble, T. (2012). Karyotypes of two species of Malagasy ground gecko (*Paroedura*: Gekkonidae). *African Journal of Herpetology* 61: 81-90.
- Matsuda, M., Shinomiya, A., Kinoshita, M., Suzuki, A., Kobayashi, T., Paul-Prasanth, B., Lau, E., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M. & Nagahama, Y. (2007). DMY gene induces male development in genetically female (XX) medaka fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 3865-3870.
- Moritz, C. (1983). Parthenogenesis in the endemic Australian lizard *Heteronotia binoei* (Gekkonidae). *Science* 220: 735-737.
- Moritz, C. (1984a). The origin and evolution of parthenogenesis in *Heteronotia binoei* (Gekkonidae). *Chromosoma* 89: 151-162.
- Moritz, C. (1984b). The evolution of a highly variable sex chromosome in *Gehyra purpurascens* (Gekkonidae). *Chromosoma* 90: 111-119.
- Moritz, C. (1986). The Population Biology of *Gehyra* (Gekkonidae): Chromosome change and speciation. *Systematic Zoology* 35: 46-67.
- Moritz, C. (1990) In: Olmo, E. (ed). Patterns and processes of sex-chromosome evolution in gekkonid lizards. *Cytogenetics of Amphibians and Reptiles*. Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, Berlin, pp 205-219.
- Moritz, C. & King, D. (1985). Cytogenetic perspectives on parthenogenesis in the Gekkonidae. In: Grigg, G., Shine, R. & Ehrmann, H. (eds.). *Biology of Australasian Frogs and Reptiles*. Royal Zoological Society of new South Wales, Sydney, Australia, pp 327-337.
- Moyzis, R.K., Buckingham, J.M., Cram, L.S., Dani, M., Deaven, L.L., Jones, M.D., Meyne,

- J., Ratliff, R.L. & Wu, J.R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 6622-6626.
- Nakamura, K. (1932). Studies on reptilian chromosomes. Chromosomes of some geckos. *Cytologia* 3: 156-168.
- Navarro, A. & Barton, N.H. (2003). Accumulating postzygotic isolation genes in parapatry: a new twist on chromosomal speciation. *Evolution* 57: 447-459.
- Nevo, E., Filiopucci, M.G., Redi, C., Korol, A. & Beiles, A. (1994). Chromosomal speciation and adaptive radiation of mole rats in Asia, minor correlated with increased ecological stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 8160-8164.
- Nielsen, S.V., Bauer, A.M., Jackman, T.R., Hitchmough, R.A & Daugherty, C.H. (2011). New Zealand geckos (Diplodactylidae): cryptic diversity in a post-Gondwanan lineage with trans-Tasman affinities. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 59: 1-22.
- Noro, M., Uejima, A., Abe, G., Manabe, M. & Tamura, K. (2009). Normal developmental stages of the Madagascar ground gecko *Paroedura pictus* with special reference to limb morphogenesis. *Development Dynamics* 238: 100-109.
- Odierna, G., Aprea, G., Capriglione, T., Caputo, V. & Olmo, E. (1994). Chromosomal diversification in the gekkonid *Tarentola mauritanica* (Reptilia, Gekkonidae). *Bolletino di zoologia* 61: 325-330.
- Ohno, S. (1967). Sex chromosomes and sex-linked genes. *Springer Verlag*, Berlin, pp192.
- Okajima, Y. & Kumazawa, Y. (2009). Mitogenomic perspectives into iguanid phylogeny and biogeography: Gondwanan vicariance for the origin of Madagascan Oplurines. *Gene* 441: 28-35.
- Oliver, P.M., Hutchinson, M. & Hutchinson, R. (2007). Karyotypic variation in the Australian gecko *Diplodactylus tessellatus*, with the description of a new karyotypic complement for Diplodactyline geckos. *Journal of Herpetology* 41: 540-543.
- Oliver, P.M., Adams, M. & Doughty, P. (2010). Molecular evidence for ten species and oligo-miocene vicariance within a nominal Australian gecko species (*Crenadactylus ocellatus*, Diplodactylidae). *Evolutionary Biology* 10: 386-396.
- Oliver, P.M. & Bauer, A.M. (2011). Systematics and evolution of the Australian knob-tail geckos (*Nephruerus*, Carphodactylidae, Gekkota): plesiomorphic grades and biome shifts through the miocene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 59: 664-674.
- Oliver, P.M., Bauer, A.M., Greenbaum, E., Jackman, T. & Hobbie, T. (2012). Molecular phylogenetics of the arboreal Australian gecko genus *Oedura* Gray 1842 (Gekkota: Diplodactylidae): another plesiomorphic grade? *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63: 255-264.
- Olmo, E. (2005). Rate of chromosome changes and speciation in reptiles. *Genetica* 125: 185-203.

- Olmo, E. (2008). Trends in the evolution of reptilian chromosomes. *Integrative and Comparative Biology* 48: 486-493.
- Olmo, E. & Signorino, G.G. (2011). Chromorep: a reptile chromosomes database. <http://www.scienze.univpm.it/professori/chromorep.pdf>
- Ota, H., Matsui, M., Hikida, T. & Hidaka, T. (1987). Polyclony in a triplod gecko, *Cosymbotus platyurus*, from Sabah, Borne, Malaysia. *Zoological Science* 4: 385-386.
- Ota, H., Hikida, T. & Lue, K.Y. (1989). Polyclony in a triplod gecko, *Hemidactylus stejnegeri*, from Taiwan, with notes on its bearing on the chromosomal diversity of the *H. garnotii-vietnamensis* complex (Sauria: Gekkonidae). *Genetica* 79: 183-189.
- Pellegrino, K.C.M., Rodrigues, M.T. & Yonenaga-Yassuda, Y. (1999). Chromosomal evolution in the Brazilian lizards of genus *Leposoma* (Squamata, Gymnophthalmidae) from Amazon and Atlantic rain forests: banding patterns and FISH of telomeric sequences. *Hereditas* 131: 15-21.
- Pellegrino, K.C., dos Santos, R.M., Rodrigues, M.T., Laguna, M.M., Amaro, R.C. & Yonenaga-Yassuda, Y. (2009). Chromosomal evolution in the Brazilian geckos of the genus *Gymnodactylus* (Squamata, Phyllodactylidae) from the biomes of Cerrado, Caatinga and Atlantic rain forest: evidence of Robertsonian fusion events and supernumerary chromosomes. *Cytogenetic and Genome Research* 127: 191-203.
- Pokorná, M. & Kratochvíl, L. (2009). Phylogeny of sex-determining mechanisms in squamate reptiles: are sex chromosomes an evolutionary trap? *Zoological Journal of the Linnean Society* 156: 168-183.
- Pokorná, M., Rábová, M., Ráb, P., Ferguson-Smith, M.A., Rens, W. & Kratochvíl, L. (2010). Differentiation of sex chromosomes and karyotypic evolution in the eye-lid geckos (Squamata: Gekkota: Eublepharidae), a group with different modes of sex determination. *Chromosome Research* 18: 809-820.
- Pokorná, M., Giovannotti, M., Kratochvíl, L., Kasai, F., Trifonov, V.A., O'Brien, P.C.M., Caputo, V., Olmo, E., Ferguson-Smith, M.A. & Rens, W. (2011). Strong conservation of the bird Z chromosome in reptilian genomes is revealed by comparative painting despite 275 million years divergence. *Chromosoma* 120: 455-468.
- Pokorná, M., Giovannotti, M., Kratochvíl, L., Caputo, V., Olmo, E., Ferguson-Smith, M.A. & Rens, W. (2012). Conservation of chromosomes syntenic with avian autosomes in squamate reptiles revealed by comparative chromosome painting. *Chromosoma* 121: 409-418.
- Porter, C.A. & Sites, J.W. Jr. (1986). Evolution of *Sceloporus grammicus* complex (Sauria: Iguanidae) in central Mexico II. Studies on rates of nondisjunction and the occurrence of spontaneous chromosomal mutations. *Genetica* 75: 131-144.
- Quinn, A.E., Georges, A., Sarre, S.D., Gustino, F., Ezaz, T. & Graves, J.A.M. (2007). Temperature sex reversal implies sex gene dosage in a reptile. *Science* 316: 411.
- Radder, R.S., Quinn, A.E., Georges, A., Sarre, S.D. & Shine, R. (2008). Genetic evidence for co-occurrence of chromosomal and thermal sex-determining systems in a lizard. *Biology Letters* 4: 176-178.

- Raxworthy, C.J., Pearson, R.G., Zimkus, B.M., Reddy, S., Deo, A.J., Nussbaum, R.A. & Ingram, C.M. (2008). Continental speciation in the tropics: contrasting biogeographic patterns of divergence in the *Uroplatus* leaf-tailed gecko radiation of Madagascar. *Journal of Zoology* 275: 423-440.
- Rice, R.W. (1984). Sex chromosomes and the evolution of sexual dimorphism. *Evolution* 38: 735-742.
- Rieseberg, L.H. (2001). Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 351-58.
- Ruiz-Herrera, A., Nergadze, S.G., Santagostino, M. & Giulotto, E. (2008). Telomeric repeats far from the ends: mechanisms of origin and role in evolution. *Cytogenetic and Genome Research* 122: 219-228.
- Sarre, S.D., Georges, A. & Quinn, A. (2004). The ends of a continuum: genetic and temperature-dependent sex determination in reptiles. *Bio Essays* 26: 639-645.
- Sato, K., Seki, R., Noro, M., Yokoyama, H. & Tamura, K. (2010). Morphogenetic change of the limb bud in the hand plate formation. *Journal of Experimental Zoology* 314B: 539-551.
- Schmid, M., Feichtinger, W., Nanda, I., Schakowski, R., Garcia, V.R., Puppo, M.J. & Badillo, A.F. (1994). An extraordinarily low diploid chromosome number in the reptile *Gonatodes taniae* (Squamata, Gekkonidae). *Journal of Heredity* 85: 255-60.
- Schönecker, P. (2008). Geckos of Madagascar, the Seychelles, Comoros and Mascarene Islands. *Edition Chimaira*, Frankfurt am Main, pp144.
- Seufer, H., Kaverkin, Y., Kirschner, A. (2005). The eyelash geckos: care, breeding and natural history. *Kirschner and Seufer Verlag*, Karlsruhe.\*
- Shedlock, A.M., Botka, C.W., Zhao, S., Shetty, J., Zhang, T., Liu, J.S., Deschavanne, P.J. & Edwards, S.V. (2007). Phylogenomics of nonavian reptiles and the structure of the ancestral amniote genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 2767-2772.
- Shine, R., Elphick, M.J. & Donnellan, S. (2002). Co-occurrence of multiple, supposedly incompatible modes of sex determination in a lizard population. *Ecology Letters* 5: 486-489.
- Sites, J.W. Jr. (1983). Chromosome evolution in the Iguanid lizard *Sceloporus grammicus*. I. Chromosome polymorphisms. *Evolution* 37: 38-53.
- Skinner, B.M. & Griffin, D.K. (2012). Intrachromosomal rearrangements in avian genome evolution: evidence for regions prone to breakpoints. *Heredity* 108: 37-41.
- Slijepcevic, P. (1998). Telomeres and mechanisms of Robertsonian fusion. *Chromosoma* 107: 136-140.
- Solleder, E. & Schmid, M. (1984). XX/XY Sex chromosomes in *Gekko gekko* (Sauria, Reptilia). *Amphibia-Reptilia* 5: 339-345.



- Starostová, Z., Kubička, L. & Kratochvíl, L. (2010). Macroevolutionary pattern of sexual size dimorphism in geckos corresponds to intraspecific temperature-induced variation. *Journal of Evolutionary Biology* 23: 670-677.
- Starostová, Z., Angilletta, M.J., Kubička, L. & Kratochvíl, L. (2012). Thermal dependence of reproductive allocation in a tropical lizard. *Journal of Thermal Biology* 37: 159-163.
- Tokunaga, S. (1985). Temperature-dependent sex determination in *Gekko japonicus* (Gekkonidae, Reptilia). *Development, Growth & Differentiation* 27: 117-120.
- Valenzuela, N. (2004). Evolution and maintenance of temperature-dependent sex determination. In: Valenzuela, N., Lance, V.A. (eds.). *Temperature-dependent sex determination in vertebrates. Smithsonian Books*, Washington, pp131-147.
- Ventura, K., Silva, M.J., Fagundes, V., Christoff, A.U. & Yonenaga-Yassuda, Y. (2006). Non-telomeric sites as evidence of chromosomal rearrangement and repetitive (TTAGGG)<sub>n</sub> arrays in heterochromatic and euchromatic regions in four species of *Akodon* (Rodentia, Muridae). *Cytogenetic and Genome Research* 115: 169-175.
- Vicoso, B., Kaiser, V.B. & Bachtrog, D. (2013). Sex-biased gene expression at homomorphic sex chromosomes in emus and its implication for sex chromosome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 6453-6458.
- Vicoso, B. & Bachtrog, D. (2013). Reversal of an ancient sex chromosome to an autosome in *Drosophila*. *Nature* 499: 332-335.
- Viets, B.E., Schaley, J.E., Ewert, M.A. & Nelson, C.E. (1990). Sex determination in the eublepharid gecko *Hemitheconyx caudicinctus* with preliminary results on hatchling growth as a function of incubation temperature. *American Zoologist* 30: 57.
- Viets, B.E., Tousignant, A., Ewert, M.A., Nelson, C.E. & Crews, D. (1993). Temperature-dependent sex determination in the leopard gecko, *Eublepharis macularius*. *The Journal of Experimental Zoology* 265: 679-683.
- Wilson, A.C., Bush, G.L., Case, S.M. & King, M.C. (1975). Social structuring of mammalian populations and rate of chromosomal evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72: 5061-5065.
- Yoshida, C.M & Itoh, M. (1974). Karyotype of the gecko *Gekko japonicus*. *Chromosome Information Service* 17: 29-31.

Sekundární citace označeny \*

## PŘÍLOHA

**Obrázek 1: Fylogenetická analýza dat o dosud známých diploidních počtech chromozomů a pohlavních chromozomech u druhů v rámci skupiny Gekkota; (modifikováno z Gamble *et al.* 2011, Carranza *et al.* 2002, Jonniaux & Kumazawa 2007, Oliver *et al.* 2010, Nielsen *et al.* 2011, Oliver & Bauer 2011, Heinicke *et al.* 2012, Oliver *et al.* 2012)**