

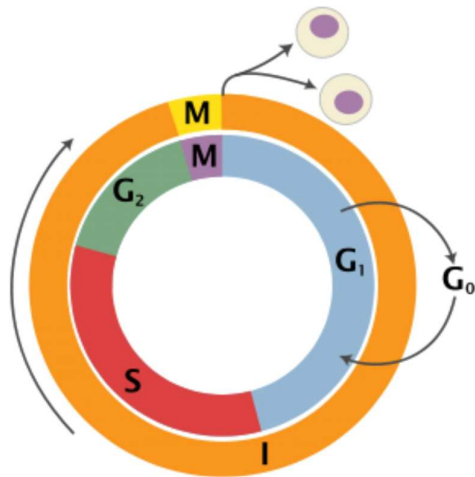
4 Cytogenetika pavoukoců

Jiří Král & Martin Forman

Studiu biologie bezobratlých je všeobecně věnována menší pozornost než biologii obratlovců. Toto platí i pro cytogenetiku. Využití cytogenetiky v arachnologii je přitom poměrně široké. Může sloužit jako metoda použitelná pro systematiku a pro rekonstrukci evoluce jednotlivých skupin. Díky diverzitě cytogenetických znaků mohou pavoukocvi sloužit také jako modelové organismy při analýze genetických fenoménů, např. holocentrických chromozomů nebo různých modifikací meiotického dělení. Pavouci jsou nedoceněnou modelovou skupinou při sledování evoluce pohlavních chromozomů. Bez nadsázky můžeme říci, že systémy pohlavních chromozomů známé u pavouků nemají u jiných organismů obdoby.

4.1 Buněčný cyklus

Drtivá většina genetické informace eukaryotní buňky je umístěna v jádře. Jaderná DNA je organizována v chromozomech, jejichž studium je hlavním předmětem cytogenetiky. Materiál chromozomů (tzv. chromatin) je po většinu buněčného cyklu despiralizován a ve světelném mikroskopu nelze odlišit jednotlivé chromozomy. K jejich kondenzaci dochází až v průběhu dělení jádra (mitózy nebo meiózy).



Průběh buněčného cyklu u eukaryotní buňky

I - interfáze - Po většinu buněčného cyklu je buňka v interfázi. Chromozomy nejsou spiralizované, pod mikroskopem je nelze rozlišit.

G₁ fáze - První růstová fáze. Dochází k růstu buňky, s chromozomy se neděje nic.

S fáze - Syntetická fáze. Dochází k syntéze DNA (ke tvorbě druhé chromatidy).

G₂ fáze - Druhá fáze růstu. Buňka se připravuje na dělení.

G₀ - tzv. stacionární fáze. Pokud buňka nebude ihned pokračovat v dělení, může z buněčného cyklu na různě dlouhou dobu vystoupit a ustrnout v G₀ fázi, většina buněk v organismu je v G₀ fázi.

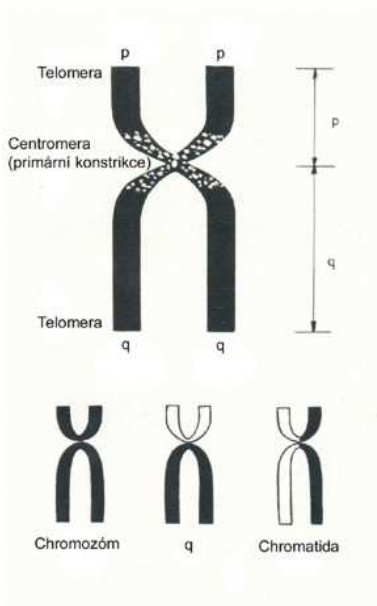
M - Samotné jaderné a buněčné dělení, zaujímá jen nepatrnou část buněčného cyklu.

Chromatin rozdělujeme do dvou typů. **Euchromatin** je méně spiralizovaný, nachází se v něm většina genů. Oproti tomu **heterochromatin** je více spiralizován a většinou je tvořen nekódujícími sekvencemi. Heterochromatinizace může být stálá po celou dobu života organismu, tyto části genomu označujeme jako **konstitutivní heterochromatin**. Jiným typem je **fakultativním heterochromatin**, který je omezen na určité pohlaví, ontogenetické stádium nebo tkáň.

4.2 Mitóza a stavba chromozomu

Část buněčného cyklu, ve které dochází k dělení jádra, se nazývá mitóza. Její hlavní biologickou funkcí je rovnoměrné rozdělení genetické informace mezi dceřiné buňky. Po ukončení mitózy (po vzniku dvou dceřiných jader) dojde k dělení samotné buňky. Do mitózy vstupuje chromozom tvořený dvěma **chromatidami**, z nichž každá obsahuje identickou dvoušroubovici DNA. Výsledkem mitózy jsou dva chromozomy, které jsou tvořeny jedinou chromatidou. Mitózu lze rozdělit na několik fází, je však nutné mít na paměti, že je to dynamický proces, jednotlivé fáze přecházejí plynule jedna do druhé.

V **profázi** začíná kondenzace chromozomů, chromozomy jsou relativně dlouhé, často mají tvar vlnovky, což odráží spiralizaci chromatinu. Na konci profáze se rozpadají jaderné membrány. V **metafázi** vrcholí kondenzace chromozomů. Metafázní chromozomy jsou krátké, do oblastí centromer se na specifickou strukturu (**kinetochor**) uchycuje dělicí vřeténko a začíná rozchod chromatid. V **anafázi** jsou chromatidy vřeténkem taženy k opačným pólům. Během **telofáze** se chromozomy rozvolňují a tvoří se opět jádro. Pro studium mitotických chromozomů jsou nejlepším stádiem buňky v metafázi, kdy jsou chromozomy nejvíce spiralizované, a je nejlépe patrná jejich morfologie.



Telomery - koncové oblasti chromozomu, jejich DNA je tvořena repeticemi (u většiny pavoukovců se několikanásobně opakuje tzv. „hmyzí motiv“ TTAGG).

Centromera - úsek chromozomu, ve které dochází k navázání dělicího vřeténka. Obvykle je na chromozomu patrna jako výrazné zúžení (tzv. **primární konstriktce**).

Rameno chromozomu - oblast chromozomu mezi centromerou a telomerou. Kratší rameno se někdy označuje písmenem „p“, delší rameno se označuje písmenem „q“.

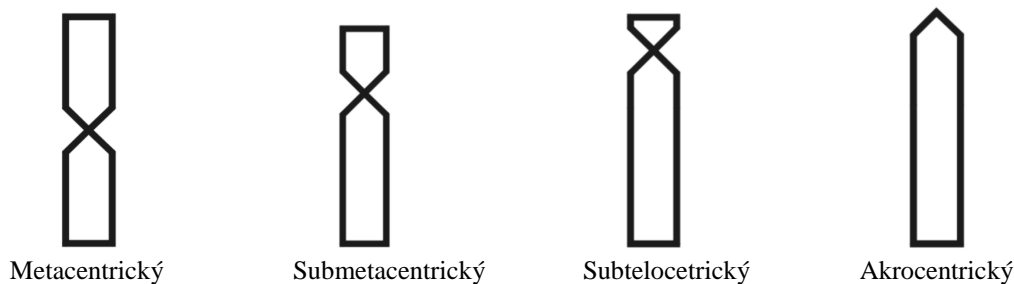
Chromatida - obsahuje jeden řetězec DNA, po metafázi se chromatidy rozcházejí do dceřiných jader.



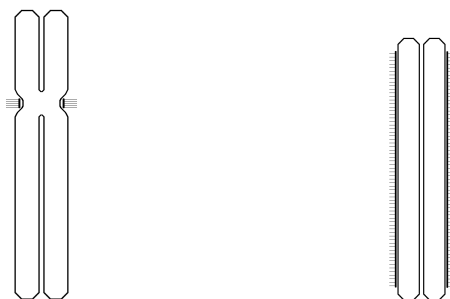
Mitotické metafáze různých entelegynních pavouků ukazující postupný rozchod chromatid. Vlevo – těsně přiložené chromatidy na začátku metafáze. Vpravo – chromatidy jsou již dobře separované.

4.3 Klasifikace chromozomů

Podle polohy centromery (poměru ramen) rozdělujeme chromozomy na několik **morfologických typů**. Základní dělení je na jednoramenné chromozomy (centromera je umístěna na jednom z konců chromozomu, v mitotické metafázi a metafázi druhého meiotického dělení má chromozom tvar písmene „V“) a dvouramenné chromozomy (chromozom připomíná písmeno „X“).



Zvláštním typem chromozomů jsou **holocentrické** (někdy nazývané **holokinetické**) chromozomy. V tomto případě zcela chybí primární konstriktce, chromozomy postrádají centromerickou oblast včetně spojení obou chromatid. Dělicí vřetenko se u takových chromozomů navazuje na většinu nebo i celý povrch chromozomu přivrácený k pólu. U pavoukocvů se holocentrické chromozomy vyskytují u štírů čeledi Buthidae, pavouků nadčeledi Dysderoidea a akariformních roztočů.



Schématické znázornění monocentrického (vlevo) a holocentrického (vpravo) chromozomu. V prvním případě je kinetochor lokalizován na centromere, v druhém případě pokrývá většinu povrchu chromatid.

4.4 Přestavby karyotypu a karyotypová evoluce

Počet a morfologie chromozomů jsou v rámci druhu obvykle stabilní. Změny v karyotypu jsou často letální nebo způsobí závažné poruchy vývoje a komplikace (u člověka popsána celá řada poruch). Ve výjimečných případech však může chromozomová mutace přetrvat a dokonce se v populaci zafixovat, což vede k diverzifikaci karyotypu mezi organismy. Chromozomové přestavby jsou důležitým **speciačním mechanismem**. Srovnáním karyotypu různých taxonů lze často objasnit jejich vzájemné **evoluční vztahy**.

Početní změny chromozomů

Polyploidie: Zmnožení celé chromozomové sádky. U pavoukocvů hrála roli v evoluci sekáčů.

Aneuploidie: Zmnožení jednoho chromozomu, většinou nesprávným rozchodem chromozomů v mitóze nebo meióze (tzv. **nondisjunkce**). Jeden z předpokládaných mechanismů vzniku a evoluce pohlavních chromozomů u pavouků.

Intrachromozomové přestavby

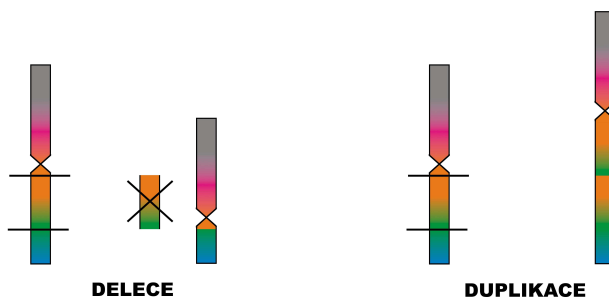
Většina ostatních přestaveb vzniká dvouřetězcovými **zlomy DNA chromozomů**. Zlomené konce DNA jsou rekombinogenní (jakoby „lepivé“), takže chromozomy mají tendenci se spojovat ve všech myslitelných kombinacích. Pokud se přestavba týká jen jednoho chromozomu, mluvíme o tzv. **intrachromozomové přestavbě**:

Delece - ztráta části chromozomu.

Inzerce - vložení segmentu do chromozomu.

Duplikace - zdvojení určité části chromozomu.

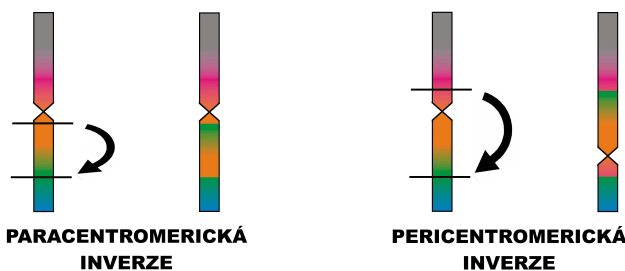
Transpozice - přemístění určitého chromozómového úseku do jiné oblasti



Inverze - otočení části chromozomu

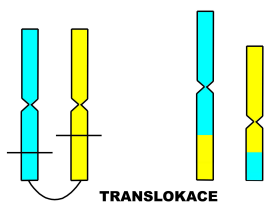
a) pokud zasáhne oblast centromery - **pericentrická inverze** (může změnit morfologii chromozomu).

b) **paracentrická inverze** - nezasahuje oblast centromery.

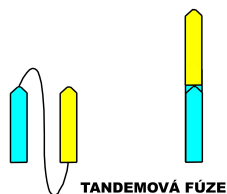


Interchromozomové přestavby

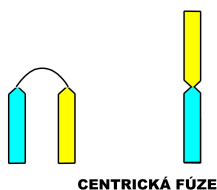
Pokud jsou do přestavby karyotypu zapojeny nehomologní chromozomy mluvíme o **interchromozomových přestavbách**.



Translokace - přesun části chromozomu na nehomologní chromozom, zahrnuje i **vzájemné výměny** úseků mezi nehomologními chromozomy (tzv. **reciproké translokace** viz obr.).



Fúze - spojení minimálně dvou chromozomů; podle způsobu spojení rozlišujeme **tandemové** a **centrické fúze**. Centrické fúze se označují též jako **Robertsonovy translokace**.



4.5 Pohlavní chromozomy

U některých živočichů je pohlaví určeno faktory vnějšího prostředí (např. teplotou v době inkubace vajíčka). U jiných je pohlaví určeno při oplození kombinací specifických genů nesených zvláštními, tzv. **pohlavními chromozomy** (= **gonozomy**, **heterochromozomy**).

Základním způsobem vzniku pohlavních chromozomů je postupná diferenciací chromozomů nepohlavních (**autozomů**). Pokud jsou u určitého druhu vyvinuty pohlavní chromozomy, obě pohlaví se liší sestavou pohlavních chromozomů. Rozlišujeme pohlaví **homogametické**, kde je jeden nebo více párů pohlavních chromozomů, z nichž každý je tvořen homologickými chromozomy, a pohlaví **heterogametické**, které nese nehomologní pohlavní chromozomy. Pokud je heterogametickým pohlavím samec, pohlavní chromozomy se označují písmeny X (párový chromozom) a Y (nepárový chromozom, alozom). Pokud je heterogametickým pohlavím samice, označujeme pohlavní chromozomy písmeny Z (párový chromozom) a W (alozom). Pokud alozom chybí, označujeme to číslicí „0“. Pokud je pohlavních chromozomů stejného typu (např. X, Y) více, číslováme je spodním indexem. U pavoukoviců se můžeme setkat s rozmanitými systémy pohlavních chromozomů. Zejména pavouci představují v tomto směru značně diverzifikovanou skupinu.

	♀	♂	výskyt u pavoukoviců
XY (typ <i>Drosophila</i>)	XX	XY	někteří parazitiformní a acariformní roztoči, výjimečně u štírků a pavouků jako odvozený stav
ZW (typ <i>Abraxas</i>)	ZW	ZZ	vyskytuje se u některých sekáčů
X0 (typ <i>Pronetor</i>)	XX	X	častý u štírků a některých pavouků
X_1X_20	$X_1X_1X_2X_2$	X_1X_2	nejrozšířenější systém u pavouků

Systémy pohlavních chromozomů

Pokud dojde v evoluci k translokacím nebo fúzím mezi pohlavními chromozomy a autozomy, autozomy se mohou začlenit do systému pohlavních chromozomů. Tak vznikají často i velmi složité systémy tzv. **nepohlavních chromozomů**.

Protože pohlavní chromozomy vznikají z autozomů, jsou v počátečních stádiích evoluce morfologicky neodlišitelné, **homomorfní**. Odlišují se jen na molekulární úrovni. Podle některých názorů jsou mezi živočichy poměrně rozšířené a je velice obtížné je detekovat. U pavouků se systémem X_1X_20 byly detekovány pomocí metod elektronové mikroskopie.

Zvláštním typem chromozomového určení pohlaví je tzv. **haplodiploidie**. V tomto případě nejsou vyvinuty pohlavní chromozomy, pohlaví jsou odlišeny počtem chromozomových sad. Samci jsou haploidní (každý chromozom je tedy zastoupen jen jednou) a vznikají z neoplozených vajíček (arrhenotokie) nebo destrukcí paternální sady chromozomů v embryu (parahaplodie), samice jsou diploidní. Arrhenotokie je dobře známa u blanokřídlého hmyzu. U pavoukoviců můžeme haplodiploidii nalézt u některých skupin akariformních a parazitiformních roztočů.

Meioza

Meioza je specializované dělení, při kterém vznikají pohlavní buňky (spermie nebo vajíčka). Jejimi základními biologickými funkcemi jsou: **redukce počtu chromozomových sad** (tvorba haploidních (**n**) gamet z diploidních (**2n**) buněk) a tvorba gamet s **různými variantami** genetické informace, která je zajištěna jednak **náhodným rozchodem homologních chromozomů**, jednak **rekombinací**. Na rozdíl od mitozy jde o složitější proces zahrnující dvě dělení. Při prvním (tzv. **redukčním**) **dělení**, dojde k rekombinaci a rozchodu homologních chromozomů. Druhé dělení (**ekvační**) je analogické mitóze a dochází k rozchodu chromatid.

První dělení - redukční

Profáze I - profáze prvního meiotického dělení je na rozdíl od mitozy poměrně komplikovaný proces. Kromě kondenzace chromozomů v ní dochází k párování homologních chromozomů (tedy chromozomů od rodičů) a k jejich rekombinaci. Rozlišujeme několik etap profáze I:

Leptotene - chromozomy se zviditelňují, kondenzují a spiralizují, začínají být morfologicky odlišitelné.

Zygotene - začíná párování homologních chromozomů a jejich těsné spojení (synapse) prostřednictvím zvláštní proteinové struktury, **synaptonemálního komplexu**.

Pachytene - dokončena synapse homologních chromozomů a tvorba synaptonemálního komplexu. Bivalenty jsou v tomto stadiu poměrně dlouhé. Probíhá rekombinace zahrnující crossing over. Na konci pachytene se . rozpadá synaptonemální komplex.

Diplotene – rozpad synaptonemálního komplexu je následován oddělováním homologních chromozomů. Ty zůstávají spojeny jen v místech překřížení nesesterských chromatid, kde předtím proběhl crossing over (tzv. **chiazmata**). Sledováním polohy a počtu chiazmat se tedy dají získat poměrně přesné informace o počtu a poloze crossing overu v karyotypu.

Dikineze - zkracování chromozomů, bivalenty mají tvar křížků, kruhu nebo složitějších útvarů (podle počtu chiazmat). Na konci diakineze se rozpadají jaderné membrány.

Metafáze I - vrchol kondenzace chromozomů. Každý pár homologních chromozomů je připojen kinetochory k dělicímu vřeténku.

Anafáze I - rozchod homologních chromozomů k opačným pólům dělicího vřeténka.

Telofáze I - dekonenzace chromozomů, tvorba jaderných membrán.

Interkineze – modifikovaná krátká interfáze mezi meiotickými děleními (bez syntézy DNA). U některých organismů chybí. V tomto případě se kolem chromozomů v telofázi nevytváří jaderné membrány, buňka plynule přechází do druhého meiotického dělení.

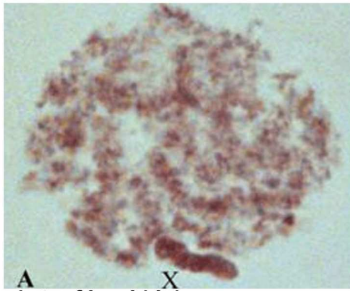
Druhé meiotické dělení - ekvační

Profáze II - spiralizace chromozomů, chromozomy jsou dvouchromatidové, je jich haploidní počet. Na konci profáze se rozpadá jádro.

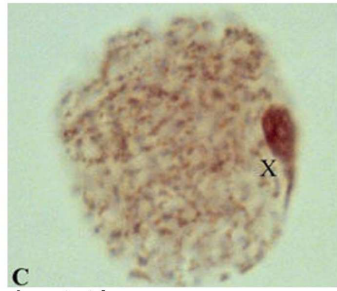
Metafáze II – Chromozomy se seskupují ve středu buňky. Sesterské chromatidy se oddalují, jsou však stále spojeny centromerou. Poloha centromer je v této fázi tedy velmi dobře patrná, čehož lze využít pro stanovení morfologie chromozomů (dvouramenné chromozomy - tvar písmene „X“, jednoramenné - tvar písmene „V“).

Anafáze II - rozdělení centromer, sesterské chromatidy putují k opačným pólům.

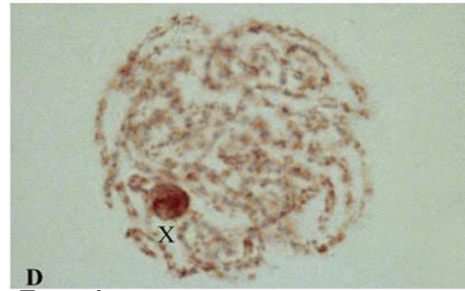
Telofáze II - vznik haploidních jader gamet.



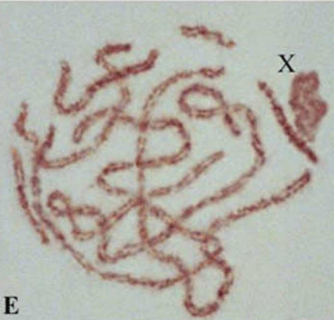
A Interfázni jádro



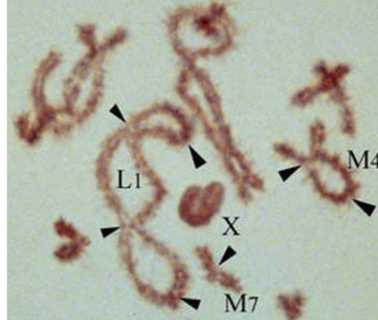
C Leptoténe



D Zygoténe



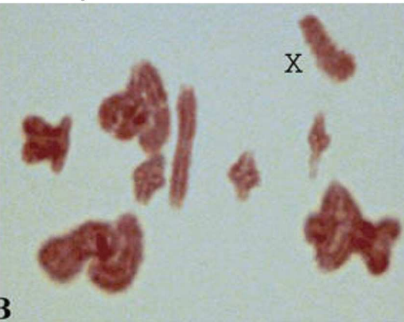
E Pachyténe



Diploténe



Diakineze



B Pozdní diakineze



Metafáze I



Anafáze I



Profáze II



A Metafáze II (polovina)



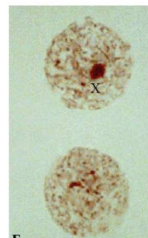
B Pozdní metafáze II (polovina)



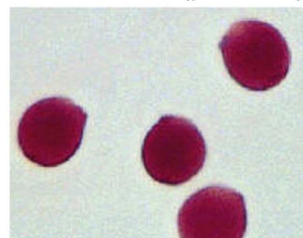
C Anafáze II (polovina)



D Telo fáze II



E Jádra spermatid a tvořící se spermie



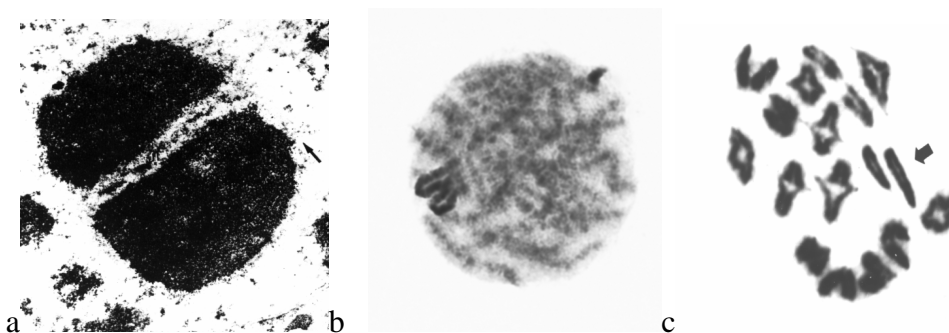
G

Chování pohlavních chromozomů v meioze heterogametického pohlaví

Primitivní, málo diferencované pohlavní chromozomy párují v meiotickém dělení prostřednictvím chiazmat stejně jako autozomy. V průběhu evoluce však dochází k postupné diferenciaci nepárového pohlavního chromozomu, takže párový a nepárový pohlavní chromozom nakonec nejsou homologické. Takové chromozomy nemohou rekombinovat a tedy ani párovat prostřednictvím chiazmat. Pro meiotické párování nehomologických pohlavních chromozomů se vyvíjejí různé náhradní mechanismy.

Pokud jsou pohlavní chromozomy dostatečně morfologicky diferencovány, lze je snadno identifikovat v meioze heterogametického pohlaví. Nejvíce prostudovanou skupinou pavoukovců jsou v tomto ohledu pavouci se systémem pohlavních chromozomů X_1X_20 . Jejich pohlavní chromozomy v průběhu profáze I navzájem párují. Na rozdíl od autozomových bivalentů není jejich párování chiazmatické. Je zajištěno různými způsoby, nejznámější je párování prostřednictvím zvláštní struktury (**junction lamina**) patrně odvozené od synaptonemálního komplexu. Toto párování vyžaduje paralelní polohu pohlavních chromozomů, která je u pavouků nejčastější. Zejména u bazálních skupin pavouků se však můžeme setkat s párováním telomerickými oblastmi (tzv. end-to-end párování), nebo s přechody mezi paralelním a end-to-end párováním.

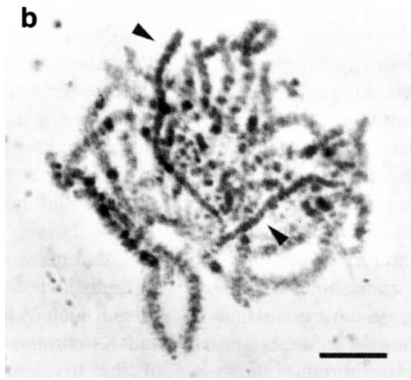
V průběhu meiozy jsou pohlavní chromozomy **fakultativně heterochromatinizovány**, přičemž vykazují jiný stupeň kondenzace chromatinu než autozomy. Pokud jsou více kondenzovány, jsou ve světelném mikroskopu více obarveny (tzv. **pozitivní heteropyknóza**). V jiných případech mohou být pohlavní chromozomy méně barvitelné (tzv. **negativní heteropyknóza**) **popř.** protáhlejší. Vzorec jejich chování v průběhu meiozy se mezi jednotlivými druhy odlišuje.



Chování pohlavních chromozomů X_1X_2 v průběhu samčí meiozy: a – *Schizocosa malitiosa* (Lycosidae), pachytene, řez pohlavními chromozomy. Pohlavní chromozomy párují paralelně, mezi nimi je patrná junction lamina (snímek z transmisního elektronového mikroskopu), b – *Pax islamita* (Zodariidae), párování pohlavních chromozomů oběma konci (typ end-to-end párování) v pachytene, pohlavní chromozomy jsou pozitivně heteropyknotické. c – *Titanoecca* sp. (Titanoeccidae), paralelní asociace pohlavních chromozomů v diakinezi.

Chování pohlavních chromozomů v meioze homogametického pohlaví

Toto chování je detailně prostudováno zatím jen u samic pavouků. Stejně jako u homogametického pohlaví všech ostatních živočichů tvoří homologické pohlavní chromozomy standardní chiazmatické bivalenty. Tyto bivalenty jsou však fakultativně heterochromatinizovány podobně jako pohlavní chromozomy samců, což se u homogametického pohlaví jiných živočichů nevyskytuje. Heterochromatinizace v pachytene může zabraňovat nelegitimní rekombinaci pohlavních chromozomů X náležejících k různým párům.

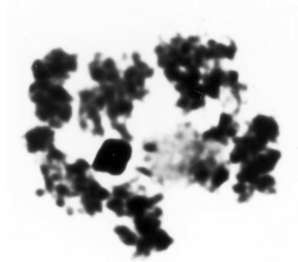


Samičí pachytene pokoutníka *Tegenaria silvestris* (Agelenidae). Heterochromatizované bivalenty X_1X_1 a X_2X_2 jsou označeny šipkami, tyto bivalenty vzájemně párují koncovými oblastmi.

Modifikace meiozy u pavoukoců

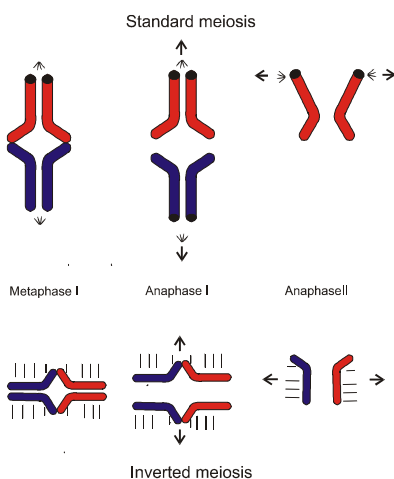
Difúzní stádium

V průběhu profáze prvního meiotického dělení (nejčastěji diplotene) dochází u některých organismů k dočasné dekondenzaci chromozomů. Tento stav nazýváme difúzním stádiem. Vyskytuje se patrně u samic všech pavouků, u některých skupin (např. haplogynní pavouci) také u samců. Rozvolněná struktura chromatinu umožňuje jeho transkripci. V tomto případě tedy mohou být geny aktivní i v průběhu meiotického dělení.



Difúzní stádium samce pavouka *Loxosceles spinulosa* (Sicariidae).

Invertovaná meióza



Zatímco u standardní meiózy se rozchází sesterské chromatidy až v druhém meiotickém dělení, u invertované již v prvním meiotickém dělení (obr.). Segregační posloupnost meiozy je tedy v tomto případě **převrácena**, první dělení je ekvační a druhé redukční. Výsledný produkt je ale stejný jako u standardní meiozy. Vyskytuje se u některých živočichů s holokinetickými chromozomy. U pavoukoců byla invertovaná meióza popsána u svilušek a některých zástupců nadčeledi Dysderoidea.

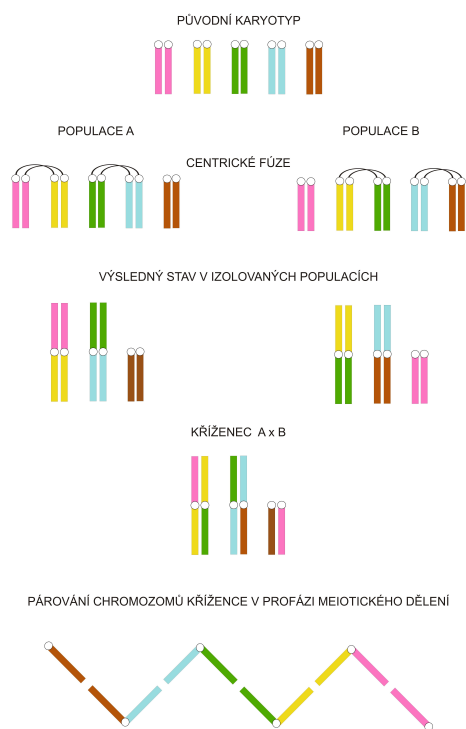
Achiazmatická meióza

Achiazmatická meioza je modifikace prvního meiotického dělení. V tomto případě je potlačen crossing over, nedochází tedy k tvorbě chiazmat. Vyskytuje se u heterogametického pohlaví některých prvoků, živočichů a rostlin. Ve světelném mikroskopu se tato modifikace projeví absencí diplotene a diakineze vzhledem k nepřítomnosti chiazmat. Homologní chromozomy párují plynule po celé své délce až do metafáze I. Stádium nahrazující diplotene a diakinezi se označuje jako

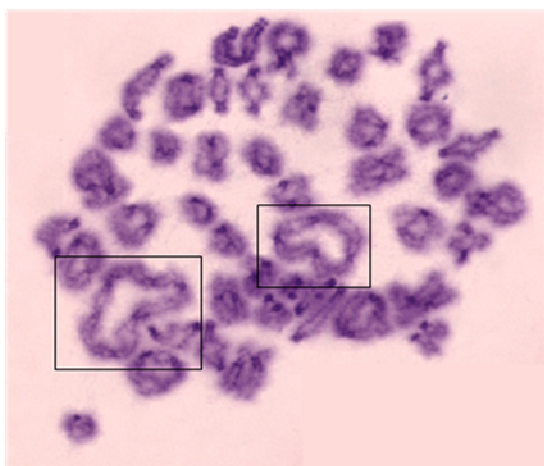
postpachytene. Následující meiotické fáze jsou stejné jako u standardní meiozy. U pavoukvců se vyskytuje u štírů, některých akariformních roztočů, štírků a pavouků.

Meioza u heterozygotů s translokacemi

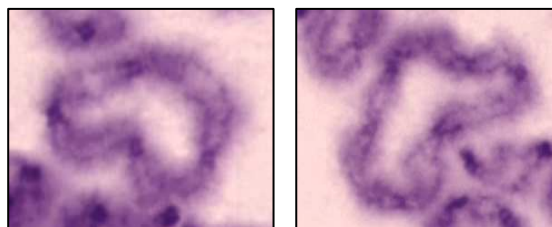
Chromosomy párují v meiotickém dělení homologními úseky. Pokud dojde k translokacím nebo fúzím, homologní úseky spolu párují i nadále, přestože jsou translokovány na jiný chromozom. Proto dochází u takových jedinců v profázi I k tvorbě **multivalentů** (řetězců nebo kruhů tvořených více chromozomy). Multivalenty autozomů jsou často nalézány u štírků a štírů, méně obvyklé jsou u pavouků. Pokud se do translokací zapojí i pohlavní chromozomy mohou vzniknout systémy nepohlavních chromozomů.



Schematické znázornění vzniku hexavalentu (chromozomového řetězce s šesti chromozomy) hybridizací jedinců nesoucích různé translokace. Původní stav byl pět párů akrocentrických chromozomů. V populacích A a B dojde následně k sérii centrických fúzí, v každé populaci však fúzují jiné chromozomové páry. Výsledkem jsou jedinci s metacentrickými chromozomy. V každé z populací jsou však jejichž ramena tvořena jinou kombinací původních akrocentriků. Pokud se zkříží jedinci z různých populací, bude mít vzniklý potomek metacentrické chromozomy s různými kombinacemi ramen. V profázi I se vytvoří multivalent, neboť ramena metacentrických chromozomů budou párovat podle původní homologie.



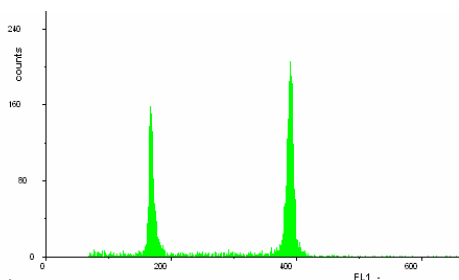
Samčí diakineze štírka *Atemnus politus* (Atemnidae) s multivalenty, hexavalent (výsek vlevo) a tetravalent (výsek vpravo).



4.6 Přehled vybraných cytogenetických technik

Stanovení velikosti genomu

Nejčastěji se používá metoda **průtokové cytometrie**. Připraví se suspenze buněk (u pavoukoců používáme hemolymfu nebo nadrcené končetiny), DNA jader se obarví fluorescenčním barvivem. Měření probíhá ve stroji – cytometru, který měří intenzitu fluorescence jednotlivých jader. Intenzita fluorescence je přímo úměrná množství barviva, které se naváže na DNA, tedy velikosti genomu. Spolu se vzorkem se měří referenční standard (buňky organismu o známé velikosti genomu). Z poměru standard/vzorek se stanoví velikost genomu vzorku.



Výsledek měření průtokovou cytometrií (**histogram**), osa X – intenzita fluorescence, osa Y - počet částic (jader), maxima odpovídají dvěma typům buněk – standardu a vzorku.

Velikost genomu se nejčastěji uvádí jako tzv. **C hodnota (1C)**, což odpovídá jeho haploidní velikosti. Pro přepočítání hmotnosti DNA na páry bazí platí, že 1 pg = 978 Mb.

Příprava chromozomového preparátu

Získání živé tkáně s větším počtem dělicích se buněk je základem pro chromozomovou analýzu. Relativně větší frakce dělicích se buněk se nalézá v epitelech (např. střevo nebo epitel pohlavních orgánů), možné je použít i vyvíjející se embrya. Nejčastěji používanou tkání bývají u bezobratlých pohlavní orgány, kde lze navíc pozorovat i meiotické buňky. U pavoukoců preferujeme použití samců, kteří jsou ve většině případů heterogametickým pohlavím. U organismů s morfologicky diferencovanými pohlavními chromozomy je toto pohlaví pro studium výhodnější. Gonády samců obsahují také mnohem více meiotických buněk než gonády samic.

Před preparací živočicha usmrtíme a ihned poté vypitváme tkáň. Ponoříme ji do hypotonického roztoku (buňky v takovém roztoku přijímají vodu a zvětšují objem, chromozomy jsou pak lépe rozprostřeny). Tkáň usmrtíme ve fixáži (nejčastěji směs jednosytného alkoholu a kyseliny octové). Nakonec je nutno vyrobit suspenzi buněk. Ta je rozvlékána, nakapána nebo roztláčena na mikroskopickém skle, čímž se snažíme docílit ideálního rozprostření chromozomů. Takto připravený chromozomový preparát můžeme použít na další aplikace včetně technik molekulární cytogenetiky.

Stanovení základních charakteristik karyotypu

Pokud preparát obarvíme (v živočišné cytogenetice se používá nejčastěji barvivo Giemsa) a pozorujeme pod mikroskopem, můžeme zjistit základní znaky karyotypu. Spočítáním chromozomů v mitózách stanovíme **diploidní počet chromozomů (2n)**. Proměřením jednotlivých chromozomových párů získáme informaci o jejich relativní délce, podle polohy centromery určíme **morfologii jednotlivých autozomových párů**. Analýzou meiotického dělení heterogametického pohlaví nebo porovnáním mitóz obou pohlaví lze stanovit **systém pohlavních chromozomů**, jejich morfologii a velikost. Cenné informace nám poskytne i analýza průběhu meiotického dělení,

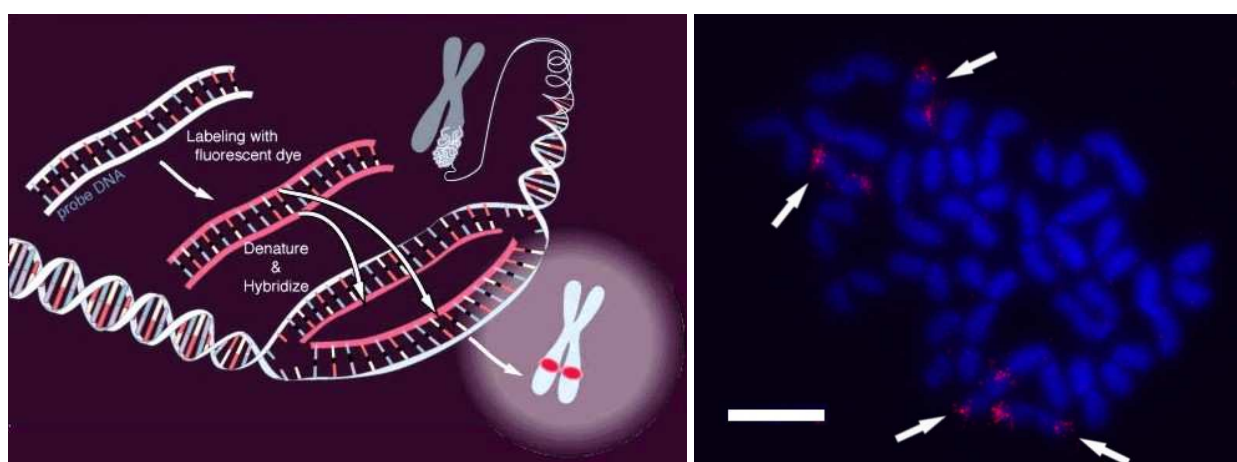
zaměřujeme se na různé modifikace meiozy (viz výše), frekvenci a polohu chiazmat a chování pohlavních chromozomů (specifická spiralizace, průběh párování).

Diferenciální barvicí techniky

K identifikaci jednotlivých chromozomových párů se v cytogenetice teplokrevných obratlovců standardně používá G pruhování. Základem této techniky je natrávení preparátů trypsinem. Každý chromozomový pár má poté specifický vzor tmavších a světlejších příčných pruhů umožňující jejich identifikaci. U většiny bezobratlých nelze tuto metodu bohužel použít. Jedinou použitelnou pruhovací metodou je většinou jen tzv. **C – pruhování**. Při něm dochází k vizualizaci **konstitutivního heterochromatinu**. Většina heterochromatinu se nachází v oblastech centromer a telomer, heterochromatin v jiných oblastech (např. uvnitř ramen) je vzácnější. Tento typický obraz nalézáme také u většiny dosud prozkoumaných pavoukoců. Konstitutivním heterochromatinem jsou tvořeny také tzv. **B chromozomy**. Jedná se o nadbytečné chromozomy, které jsou většinou odvozeny ze standardních chromozomů. I když se organismus takových chromozomů často nedokáže zbavit, dokáže je inaktivovat heterochromatinizací. Pro tyto chromozomy jsou typické nondisjunkce v mitotickém a meiotickém dělení, jejich počet se tak může lišit nejen mezi jedinci téhož druhu, ale i mezi různými buňkami téhož individua. U pavoukoců jsou tyto chromozomy dosti vzácné, byly popsány jen u některých štírů, sekáčů a klíšřat.

Molekulárně cytogenetické metody

Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a její modifikace jsou nejpoužívanějšími metodami molekulární cytogenetiky. Účelem FISH je **lokalizovat** určitou **sekvenci DNA** v karyotypu. Pokud máme sondu pro určitý úsek DNA, označíme ji fluorescenčním barvivem a denaturujeme (na jednořetězcovou DNA). Obdobně denaturujeme také DNA chromozomů na preparátu, na který poté aplikujeme sondu. Preparát necháme hybridizovat se sondou, která se spojí s komplementární sekvencí na chromozomu. Při pozorování ve fluorescenčním mikroskopu označená sonda vizualizuje cílovou část genomu. V různých variantách FISH můžeme vizualizovat jakoukoliv sekvenci DNA (repetitivní sekvence, gen, část chromozomu, celý chromozom nebo genom).



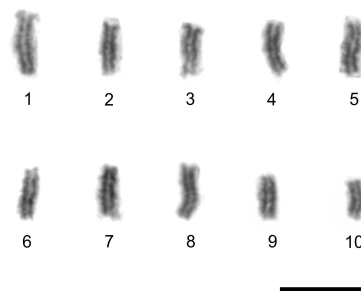
Příklad FISH. Vizualizace genů pro 18S rRNA v karyotypu samce pavouka *Stegodyphus dufouri* (Eresidae) ($2n = 30$). Jedná se o metafázi II, karyotyp je tvořen akrocentrickými chromozomy. Sonda je označena barvivem Cy3 (emituje fluorescenci v červené části spektra), chromozomy jsou obarveny DAPI (emise v modré části spektra). Geny jsou umístěny v terminálních oblastech dvou autozomových párů.

4.7 Přehled cytogenetiky jednotlivých skupin pavoukovců

Cytogenetice pavoukovců se soustavně věnuje jen několik výzkumných skupin, jedinou evropskou skupinou je naše laboratoř. Karyotypy jednotlivých řádů jsou různě prostudovány. Největší pozornosti se těší pavouci, dále pak akariformní a parazitiformní roztoči, štíři, štírci a sekáči. Probádanost ostatních řádů je velmi nízká, u většiny z nich (Amblypygi, Ricinulei, Schizomida, Solifugae) nebyly dosud publikovány žádné informace o karyotypu. Celkem byly popsány karyotypy cca. 1400 druhů pavoukovců.

Scorpiones

Je prostudováno zhruba 70 druhů ($2n = 6 - 176$). Zástupci čeledi Buthidae mají holokinetické chromozomy a nižší $2n$ (obvykle okolo 20). Ostatní zástupci mají monocentrické chromozomy a vyšší $2n$. Pohlavní chromozomy nejsou diferencovány, u všech dosud studovaných druhů byla nalezena achiasmatická meioza. Častá je heterozygotnost pro translokace a fúze, důsledkem je tvorba multivalentů v meiotickém dělení.



Tityus magnimanus (Buthidae), karyotyp zkonstruován z postpachytene.

Opisthacanthus asper (Liochelidae), karyotyp z metafáze II.

Solifugae

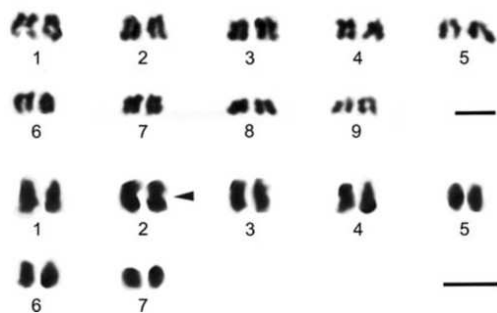
Karyotypy dosud nebyly popsány. Podle našich předběžných výsledků jsou chromozomy monocentrické.



Gluvia dorsalis (Daesidae), mitotická metafáze.

Palpigradi

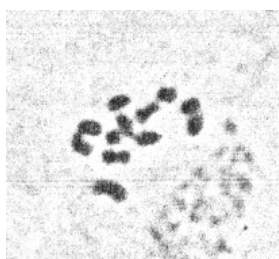
Byly karyotypovány dva druhy rodu *Eukoenia*. Chromosomy jsou drobné, patrně monocentrické. Pohlavní chromozomy nejsou diferencovány.



Karyotypy dvou druhů štírenek – *E. spelaea* ($2n = 18$) (nahore), *E. mirabilis* ($2n = 14$) (dole). Druhý pár *E. mirabilis* nese konstrikcii.

Acariformes

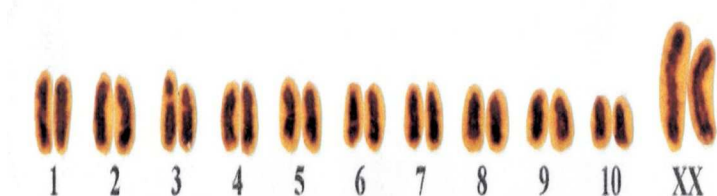
Diverzifikovaná skupina, karyotypy jsou tvořeny nízkým počtem drobných holocentrických chromozomů ($2n = 4 - 28$), bylo prostudováno přibližně dvě stě druhů. Pohlavní chromozomy většinou nejsou diferencovány (u čeledí Acarididae a Glycyphagidae byl popsány systémy X0 a XY). Pohlaví je často určeno pomocí haplodiploidie.



Mitotická metafáze zástupce čeledi Tetranychidae.

Parasitiformes

Známé karyotypy asi 100 druhů, $2n = 6$ až 36. Je zde značná diverzita způsobů determinace pohlaví. U klíšťat jsou diferencovány pohlavní chromozomy, byly popsány systémy XY a X0. Často se vyskytuje haplodiploidie včetně parahaploidie (Gamasida), thelytokie.



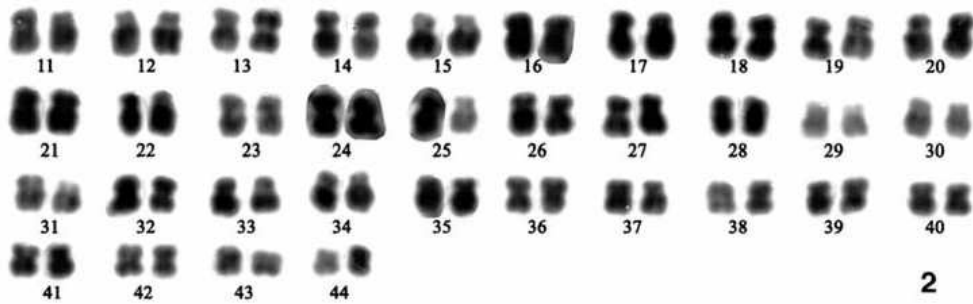
Klíště *Rhipicephalus microplus* (Ixodidae), $2n = 22$, karyotyp samice.

Ricinulei

Žádný zástupce tohoto řádu dosud nebyl studován.

Opiliones

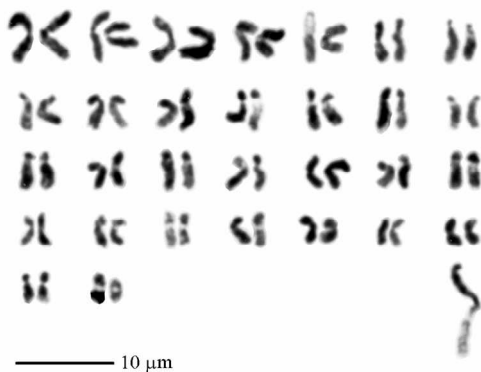
Dosud byly popsány karyotypy asi 80 druhů, $2n = 10 - 88$. Karyotypy jsou tvořeny monocentrickými chromozomy (většinou dvouramennými). U některých byly popsány B chromozomy. Pohlavní chromozomy jsou většinou XY (nejsou většinou morfologicky příliš diferencovány); zástupci čeledi Phalangiidae mají typ *Abraxas* (ZW, opět nízký stupeň diference). U některých skupin se vyskytuje thelytokie. Thelytokní formy jsou často polyploidní. U novosvětských zástupců skupiny Laniatores byl zjištěn vysoký počet chromozomů (viz obrázek), předpokládá se u nich polyploidizace.



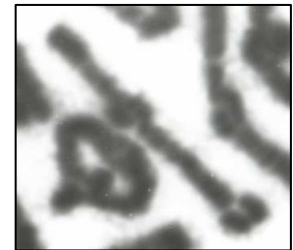
Goniosoma proximum (Gonyleptidae) - sekáč s nejvyšším počtem chromozomů ($2n = 88$).

Pseudoscorpiones

Dosud publikovány karyotypy cca 50 druhů. Počet chromozomů: $2n♂ = 7$ (Olpiidae) – 135 (Atemnidae). Značná proměnlivost počtu a morfologie chromozomů. V karyotypech převažují dvouramenné chromozomy (kromě čeledi Chthoniidae). Pohlavní chromozomy dobře vyvinuty. Nejčastěji se jedná o X0 systém, chromozom X je dvouramenný a většinou největší chromozom karyotypu. Systém pohlavních chromozomů může být i XY.



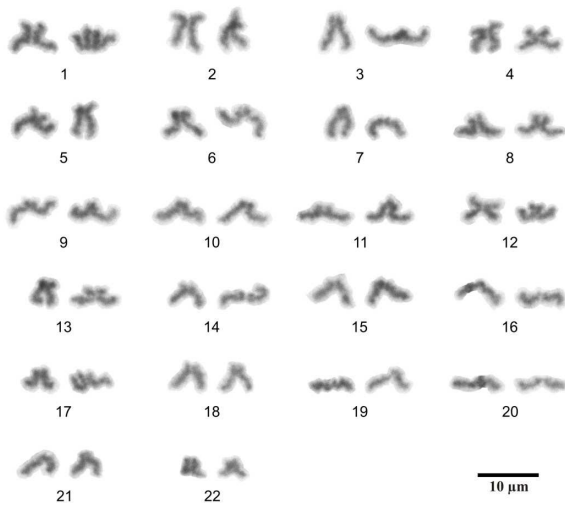
Lasiochernes pilosus (Chernetidae) $2n♂ = 61, X0$.



Roncus sp. (Neobisiidae), diplotene. Ve výseku je podlouhlý bivalent XY.

Pedipalpi: Amblypygi, Uropygi a Schizomida

Publikován byl jen karyotyp 1 druhu řádu Uropygi. Podle našich předběžných výsledků jsou chromozomy těchto skupin monocentrické.

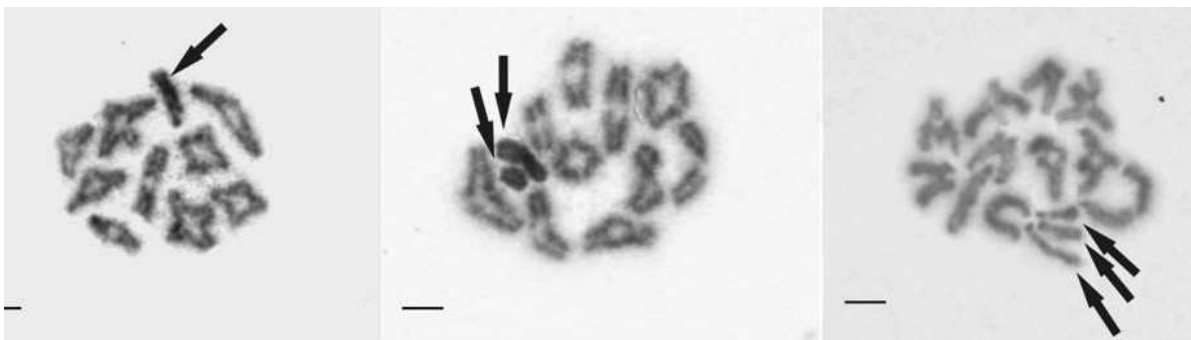


Ginosigma schimkewitchi (Uropygi: Thelyphonidae), $2n\sigma = 44$, metafáze II.

Araneae

Pohlavní chromozomy pavouků

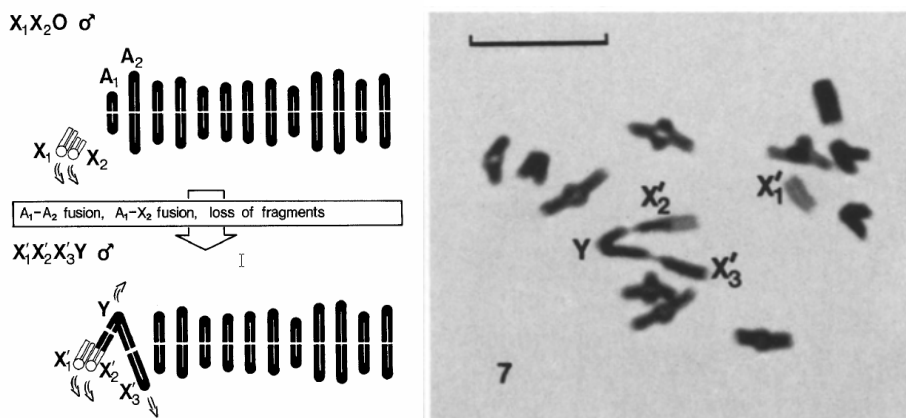
Jak už bylo zmíněno, systémy pohlavních chromozomů tvořené více chromozomy X se nacházejí u většiny dosud studovaných pavouků. U ostatních živočichů jsou tyto systémy vzácné. Nejčastěji nalézáným stavem je X_1X_20 systém. Ten byl nalezen u cca 70% studovaných druhů. Pravděpodobně je evolučně původní, neboť byl objeven i u nejprimitivnějších pavouků – sklípkošů. X_1X_20 systém se v evoluci dále vyvíjel. Poměrně často nalzáme systémy se třemi chromozomy X. Vzácněji byly objeveny i systémy s větším počtem X. Jiným typem chromozomového určení pohlaví u pavouků je systém $X0$. Všechny tyto systémy můžeme nalézt u nepříbuzných čeledí, tudíž vznikaly opakovaně. Systém $X0$ vznikal patrně fúzí popř. degenerací jednoho chromozomu X v systému X_1X_20 . Systémy s více chromozomy X vznikaly nondisjunkcemi či rozpady.



Oecobius spp., pozdní profáze I. Systémy pohlavních chromozomů $X0$, X_1X_20 , $X_1X_2X_30$.

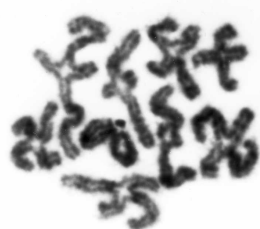
Systémy obsahující chromozom Y

Jako odvozené stavy vznikly u pavouků systémy nepohlavních chromozomů, obsahují vždy chromozom(y) Y.

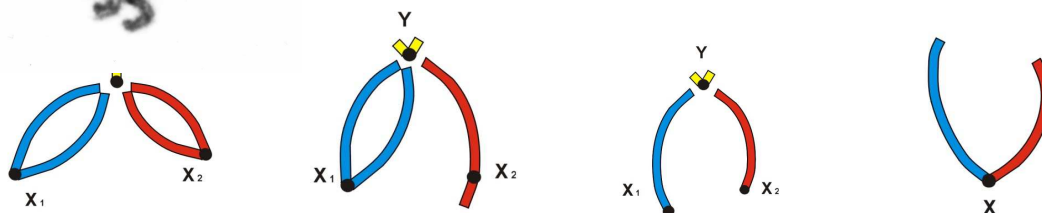


Vlevo: Schématické znázornění vzniku systému $X_1X_2X_3Y$ u skákavek rodu *Habronatus*. Systém vznikl tandemovou fúzí chromozomu X_2 a autosomu A_1 a centrickou fúzí autozomů A_1 a A_2 . Vpravo: Diakineze s multivalentem pohlavních chromozomů X_1X_2Y

Jiným systémem obsahujícím chromozom Y je X_1X_2Y , objevený u pěti čeledí haplogynních pavouků. Vznik tohoto systému není objasněn, může se jednat o starobylý nepohlavní systém.



Loxosceles spinulosa –Pohlavní chromozomy X_1 , X_2 a Y tvoří v profázi I samce typický trivalent. Systém X_1X_2Y se vyskytuje u celé řady haplogynních pavouků. Tento systém se u čeledi Pholcidae dále vyvíjel (dole) až na systém XO . Sérií inverzí se z metacentrických X_1 a X_2 staly akrocentrické X_1 a X_2 , po centrické fúzi vznikl dvouramenný X . Y zmizel z karyotypu degenerací.

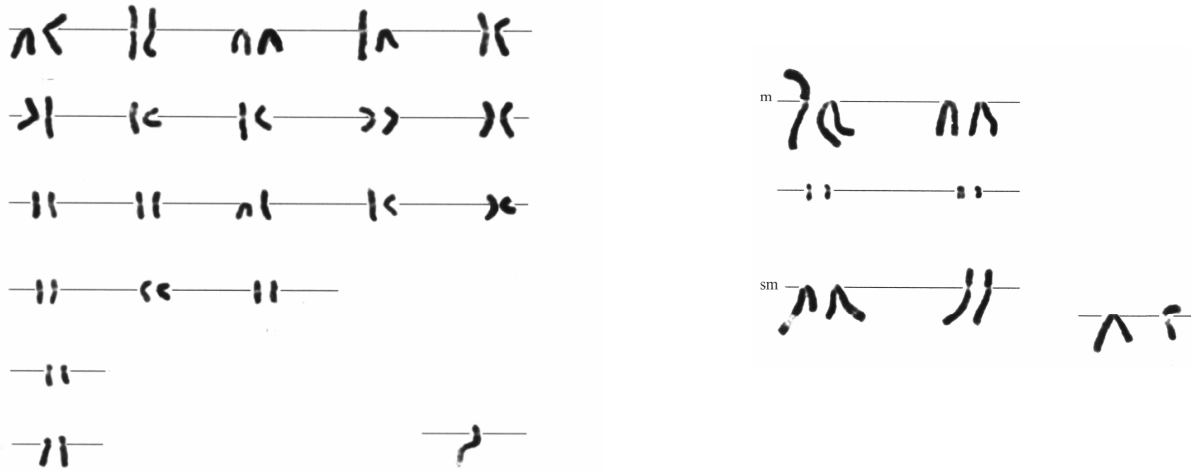


Základní údaje o karyotypech jednotlivých větví pavouků

Publikovány jsou karyotypy téměř 700 druhů. Seznam karyotypovaných pavouků a dalších pavoukoců můžete nalézt na <http://www.arthropodacytogenetics.bio.br/spiderdatabase/index.htm>. Nejprostudovanější skupinou pavouků jsou entelegynní pavouci, ostatní skupiny byly studovány spíše okrajově.

Sklípkoši (Mesothelae): karyotypován jeden druh (*Heptathela kimurai*, $2n♂ = 80$, X_1X_2O), chromozomy jsou akrocentrické.

Sklípkani (Mygalomorphae): převažují dvouramenné chromozomy, značný rozsah počtu chromozomů ($2n♂ = 14 - 32$). Enormní variabilita v systémech pohlavních chromozomů, nejčastější jsou systémy s jedním až čtyřmi chromozomy X . Vzácně se vyskytují i systémy s více než deseti (!) chromozomy X .



Diverzita mezi karyotypy dvou blízce příbuzných druhů sklípčánek rodu *Atypus* (Atypidae). Vlevo - *A. muralis* ($2n♂ = 41, X0$). Vpravo *A. affinis* ($2n♂ = 14, XY$). Karyotyp tohoto druhu vznikl sérií fúzí. Karyotypy byly sestaveny z mitotických metafází.

Araneomorphae

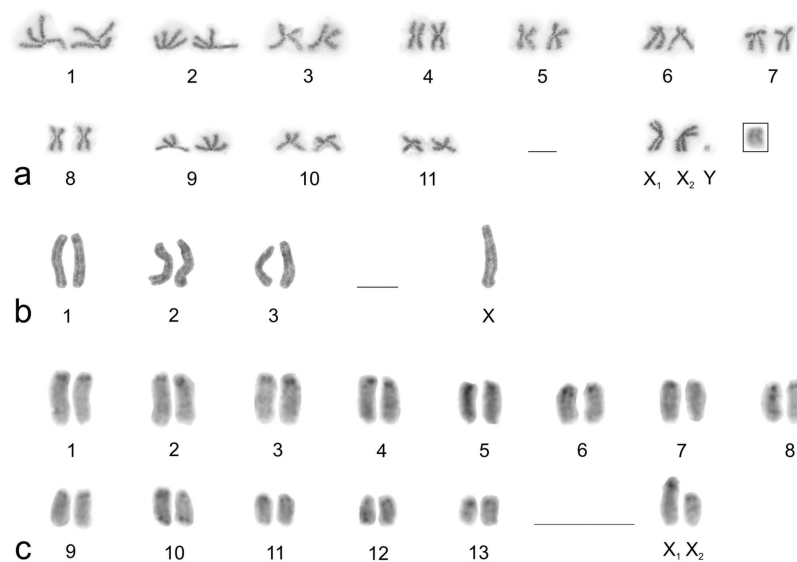
Haplogynae a skupiny s nejistým zařazením

Z cytogenetického hlediska zde můžeme rozlišit dvě základní linie: a) pavouky s holokinetickými chromozomy (nadčeleď Dysderoidea) a b) pavouky s monocentrickými chromozomy (ostatní studované skupiny).

Dysderoidea: Patří sem pavouci s nejnižším počtem chromozomů. Díky holokinetické stavbě chromozomů jsou u těchto pavouků snáze tolerovány rozpady a fúze chromozomů resp. další přestavby chromozomů. Velkou diverzitu v karyotypech některých rodů lze využít pro cytotaxonomické účely.

Ostatní haplogynní pavouci: karyotyp je tvořen převážně dvouramennými chromozomy, $2n♂ = 13 - 37$. Častý výskyt systému pohlavních chromozomů X_1X_2Y (méně často $X0, XY$ nebo X_1X_20).

Entelegynae: Karyotyp většiny entelegynů je tvořen výlučně akrocentrickými chromozomy, $2n♂$ se pohybuje obvykle mezi 20 a 40. Ancestrální karyotyp byl pravděpodobně $2n♂ = 42, X_1X_20$ nebo $2n♂ = 43, X_1X_2X_30$, v evoluci docházelo ke snižování počtu chromozomů fúzemi. Většinou nízká diverzita karyotypu (není výjimkou, že celá čeleď nebo dokonce několik příbuzných čeledí má shodný počet chromozomů).



Karyotypy araneomorfních pavouků. a – haplogynní pavouk *Kukulcania* aff. *hibernalis* (Filistatidae), $2n^{\sigma} = 25$, X_1X_2Y . Chromozomy jsou dvouramenné, včetně mikrochromozomu Y (zvětšen ve výseku). b – *Dasumia carpathica* (Dysderoidea), $2n^{\sigma} = 7$, $X0$. Karyotyp je tvořen nízkým počtem holokinetických chromozomů. c – zástupce entelegynních pavouků, slíďák *Pardosa wagleri* (Lycosidae), $2n^{\sigma} = 28$, X_1X_20 . Všechny chromozomy jsou akrocentrické. Všechny nesou centromerický heterochromatin (vizualizován pomocí C - pruhování).

Úkol

CHROMOZOMY SAMCŮ

Původní stav karyotypu u skákavek



Mitóza metafáze



Diakineze



Metafáze II

Mexcalla elegans – skákavka s odvozeným karyotypem



Mitóza metafáze



Diplotene



Metafáze II