

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



**Role repetitivních sekvencí v molekulární diferenciaci
pohlavních chromosomů bělásků rodu *Pieris***

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autorka: Kristina Pinkrová

Školitelka: RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D.

České Budějovice

2020

Bakalářská práce

Pinkrová K. 2020 “Role repetitivních sekvencí v molekulární diferenciaci pohlavních chromosomů bělásků rodu *Pieris*.” [The role of repetitive sequences in molecular diversifications of sex chromosomes in white butterflies of genus *Pieris*. Bc. Thesis, in Czech.] – 40 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Annotation

The aim of this bachelor thesis was to uncover the role of repetitive sequences in sex chromosomes diversifications in three white butterfly species of genus *Pieris*. I tested variability in W chromosome appearance in the species under study and the presence of W-linked satellite sequences. My results reveal large differences among W chromosomes in studied species. The fluorescence in situ hybridization revealed that one of the selected satellites (CL26) is localized on the W chromosome of *P. brassicae* and another (CL 187) is localized on the W chromosome of *P. napi*. The rest of the selected satellites is autosomal.

Finanční podpora

Tato práce byla financována z grantu prof. RNDr. Františka Marece, CSc. 17-13713S Grantové agentury České republiky a realizována v Laboratoři molekulární cytogenetiky na Entomologickém ústavu Biologického centra AV ČR.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

České Budějovice, 22. 5. 2020

.....

Kristina Pinkrová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Magdě Zrzavé, která mi pomáhala při mých prvních krůčcích v laboratoři a která mi i nadále ochotně radila a pomáhala po celou dobu mé práce na této práci. Také bych ráda poděkovala mé rodině za to, že mi vždy věřili a stáli za mnou, Aničce Michalčíkové, za to že mi pomáhala zvládnout mé neúspěchy a postavit se opět na nohy a v neposlední řadě mému příteli Davidovi, že mi dodával sílu a naději ve chvílích, kdy už jsem chtěla vše vzdát.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Evoluce pohlavních chromozomů	1
1.2. Pohlavní chromosomy motýlů	2
1.2.1. Chromozom Z	3
1.2.2. Chromozom W	4
1.3. Satelitní sekvence	5
1.4. Bělásci (<i>Pierinae</i>)	6
1.4.1. Bělásek zelný (<i>Pieris brassicae</i>)	6
1.4.2. Bělásek řepkový (<i>Pieris napi</i>)	7
1.4.3. Bělásek řepový (<i>Pieris rapae</i>)	7
2. Cíl práce	8
3. Materiály a metody	9
3.1. Použitý hmyz	9
3.2. Příprava chromozomálních preparátů	9
3.3. Izolace DNA	9
3.4. Příprava sond pro CGH	10
3.5. CGH	11
3.6. Navržení primerů k satelitním sekvencím	13
3.7. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	13
3.8. Značení satelitních sond pro FISH pomocí PCR	15
3.9. FISH	16
3.10. Prohlížení preparátů	17
4. Výsledky	18
4.1. DAPI	18
4.2. CGH	18
4.3. PCR	21

4.4.	Analýza a lokalizace satelitních sekvencí.....	24
5.	Diskuze	28
5.1.	Chromozom W je u zkoumaných bělásků snadno identifikovatelný a mezi druhy se výrazně liší.....	28
5.2.	Satelitní sekvence na chromozomu W	29
5.3.	Výskyt satelitních sekvencí napříč zkoumanými druhy	31
	Další postup:	31
6.	Závěr.....	33
7.	Použité zdroje	34

1. Úvod

1.1. Evoluce pohlavních chromozomů

U většiny eukaryotních živočichů je pohlaví určováno párem pohlavních chromozomů, přičemž jedno pohlaví je homogametické, tudíž jeho genom obsahuje dva stejné pohlavní chromozomy (XX, ZZ), a druhé pohlaví je heterogametické, jehož genom obsahuje pár rozdílných pohlavních chromozomů (XY, ZW). Systém pohlavních chromozomů se vyvinul nezávisle na sobě mnohokrát. Jedním ze společných znaků je postupná degenerace genů na chromozomu Y a W (Barchtog, 2006).

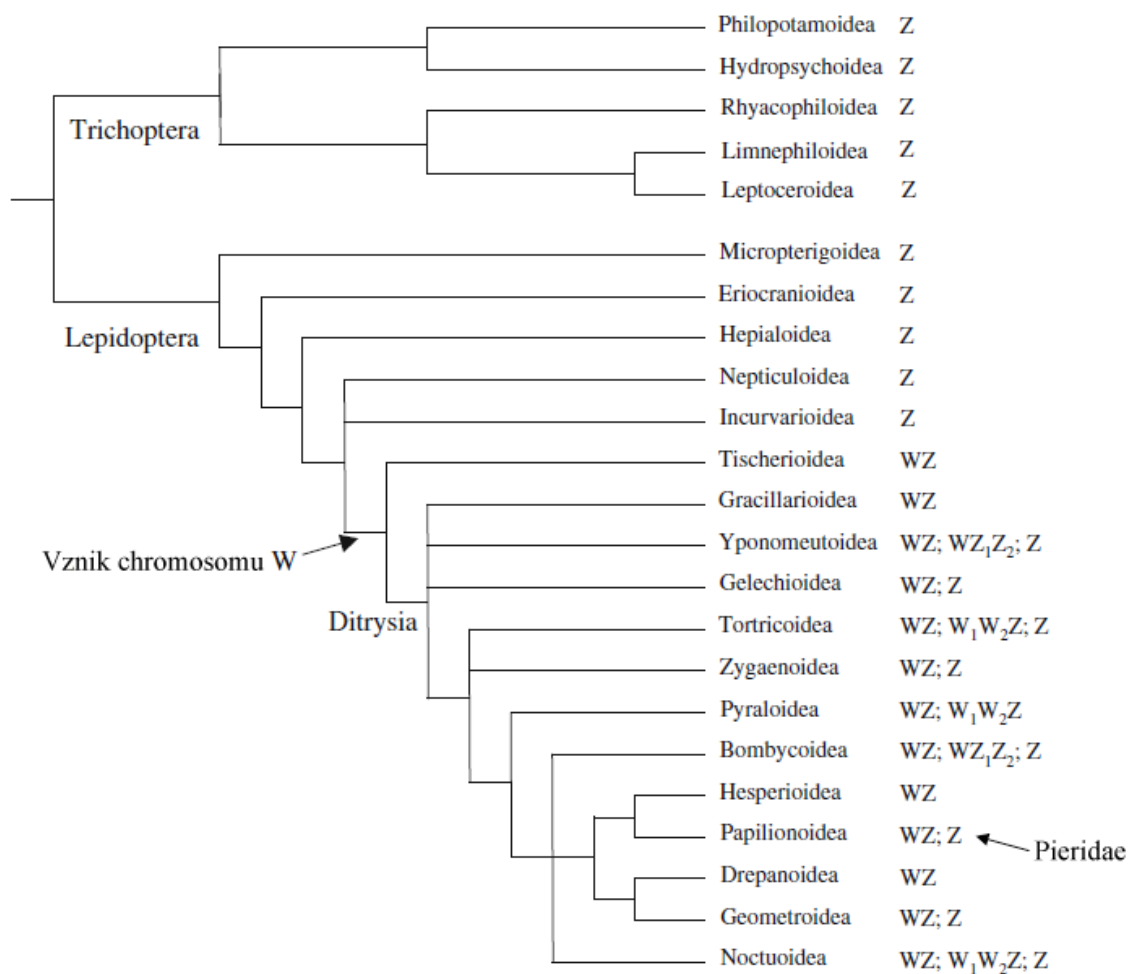
Pohlavní chromozomy se ve většině případů vyvinuly z páru autozomů. Počátek evoluce byl iniciován tím, že se na jednom z těchto autozomů vyskytl gen určující jedno pohlaví (Charlesworth, 1996). Na tomto chromozomu se časem začaly objevovat a shromažďovat geny pro toto pohlaví přínosné. Pro nositele je výhodné, aby se tyto geny přenášely spolu, proto byly selektivně upřednostněny změny v chromozomální struktuře, které zabrání rekombinaci mezi homologními chromozomy (Rice, 1987). Ztráta rekombinace postupně vedla k degeneraci jiných genů v této oblasti, protože bylo zabráněno reparacím a výměně alel během crossing-overu. S přibývajícimi pro pohlaví příhodnými geny se začala nerekombinantní oblast zvětšovat a došlo tak ke ztrátě dalších původních genů (Charlesworth a Charlesworth 1978; Charlesworth a Charlesworth, 2000). Výsledkem všech těchto procesů je malé množství aktivních genů, a naopak velké množství repetitivních sekvencí a mobilních elementů na chromozomech Y a W. Tento proces může vést až k úplné ztrátě chromozomu W či Y, když se gen určující dané pohlaví přesune na jiný chromozom nebo je nahrazen genem novým (Charlesworth, 2005; Kaiser, Bachtrog, 2010). Tímto cyklem procházejí všechny druhy s determinací pohlaví pohlavními chromozomy, ale mohou se nacházet v jiném stádiu.

Chromosom X se dvě třetiny své existence nachází v samici (chromozom Z v samci), což dává selekci jedinečnou příležitost uchovávat zde geny výhodné pro homogametické pohlaví. (Rice, 1984). K tomu může dojít dvěma způsoby, buď přenosem výhodných genů pro samice na chromozom X nebo specializací genů již přítomných na chromozomu X (Barchtog, 2006). Na druhou stranu je pro chromozom výhodné shromažďovat i geny pro heterogametické pohlaví, protože u něj selekce recesivních alel díky heterozygoty probíhá efektivněji.

1.2. Pohlavní chromosomy motýlů

Motýli (Lepidoptera) spolu se sesterským řádem chrostíků (Trichoptera) a některými druhy z čeledi Tephritidae (Diptera) jsou jedinými zástupci hmyzu s určením pohlaví typem, který spočívá v heterogametické samici a homogametickém samci (Bull, 1983; Bush 1966). Za původní neboli ancestrální se považuje typ Z/ZZ (Z_0/ZZ), protože se nachází u bazálních motýlů a sesterských chrostíků. Chromozom W se objevil až později, tudíž se systém WZ/ZZ , který nacházíme u většiny druhů, považuje spolu s dalšími systémy (W_1W_2Z/ZZ , $WZ_1Z_2/Z_1Z_1Z_2Z_2$) za odvozenější (Traut a Marec, 1996; Traut et al., 2007). Přestože je systém Z_0/ZZ původnější, vyskytuje se i u odvozenějších druhů motýlů u kterých došlo k druhotné ztrátě chromosomu W (Obrázek 1) (Sahara, Yoshido, Traut, 2012).

Podobnost chromozomů, chybějící morfologické znaky (centromery) společně s nedostatkem vhodných metod znemožnily identifikaci jednotlivých chromozomů. Studie motýlích chromozomů se tedy soustředila pouze na počítání chromozomů (Traut, 1976). Později se výzkum začal soustředit na pohlavní chromozomy, konkrétně na chromozom W, který bylo možné u mnoha druhů rozpoznat díky velkému množství heterochromatinu (Traut et al., 2007). Moderní postupy jako fluorescenční in situ hybridizace (FISH), genomová in situ hybridizace (GISH) a komparativní genomová hybridizace (CGH) spolu se sondami barvícími chromozom W umožnily detailnější studie jak morfologie, tak i evoluce chromozomu W (Traut et al., 1999; Yoshido et al., 2006; Vítková et al., 2007).



Obrázek 1: Fylogenetický strom superrodin motýlů (*Lepidoptera*) a jejich sesterské skupiny chrostíků (*Trichoptera*) a výskyt systémů pohlavních chromozomů (Marec, Sahara, Traut, 2010).

1.2.1. Chromozom Z

Motýlí chromozomy Z jsou velmi konzervativní, podobně jako chromozomy Z u ptáků (Nanda et al., 2008) a chromozomy X u savců (Rat Genome Sequencing Project Consortium, 2004). Chromozom Z motýlů patří mezi evolučně starší chromozomy a stejně jako autozomy je tvořen euchromatinem a obsahuje velké množství genů (Sahara, Yoshido, Traut, 2012). Pomocí mapování několika genů na chromozomu Z napříč skupinou Heteroneura (Dalíková et al., 2017a) a u hrotnokřídleců (Hepialoidea) (Voleníková, 2015) byla prokázána konzervativnost chromozomu Z nejen u bazálních skupin, ale i u odvozených motýlů.

1.2.2. Chromozom W

Chromozom W nese velmi málo genů a u některých druhů je tvořen z velké části heterochromatinem, který obsahuje především repetitivní sekvence a je bohatý obsahem mobilních elementů (Abe et al., 2005; Traut et al., 2013; Sahara et al., 2003). V somatických buňkách může chromozom W tvořit heterochromatinový útvar zvaný sex chromatin (W chromatin) (Traut a Marec, 1996). Na rozdíl od chromozomu Z se chromozom W velmi rychle vyvíjí, takže i u příbuzných druhů může být velmi odlišný, což bylo potvrzeno za použití CGH a Zoo – FISH s malovací sondou pro chromozom W různých druhů. Pomocí těchto metod byla zjištěna malá podobnost chromozomu W mezi různými druhy zavíječů (Vítková et al., 2007) a také mezi chromozomy W u skvrnopásníka angreštového (*Abraxas grossulariata*) a skvrnopásníka jilmového (*Abraxas sylvata*) (Zrzavá et al., 2018).

Další příčinou rychlého vývoje chromozomu W je samičí meióza, která je specifická, protože probíhá achiasmaticky, tj. bez crossing-overu (Traut, 1977). Díky tomu může degenerace chromozomu W začít ihned po jeho vzniku. U mnoha druhů lze v pachytene bivalent WZ velmi dobře rozpoznat, pokud je označen pomocí GISH, která slouží k vizualizaci chromozomu W, nebo CGH, která je používána k zobrazení a hrubé analýze chromozomu W, protože poskytuje informace o tom, zda je chromozom W tvořen sekvencemi společnými pro obě pohlaví či sekvencemi unikátními/obohacenými na W (Traut a Marec, 1997).

O sekvencích na chromozomech W se zatím moc neví, protože jsou ze sekvenování často vynechávány díky vysokému obsahu repetitivních sekvencí, které následné skládání genomu značně komplikují. Konkrétně jsou známy dlouhé terminální sekvence (LTR), non-LTR a DNA retrotranspozony u bource morušového (*Bombyx mori*) (Abe et al., 2005), LTR a non-LTR retrotranspozony u obaleče jablečného (*Cydia pomonella*) (Fuková et al., 2007) a různé třídy transpozónů, mikrosatelity a stopy mitochondriální DNA u zavíječe moučného (*Ephesia kuehniella*) (Traut et al., 2013). Žádná z těchto analýz však neukázala přítomnost satelitů. Naopak retrotranspozony mohou tvořit dokonce i hlavní složku chromozomu W, jako je tomu u bource morušového (*Bombyx mori*) (Abe et al., 2005) a *Bombyx mandarina* (Abe et al., 2002). Dosud získané údaje o kumulaci a sekvencním složení podporují teorii, že právě retrotranspozony jsou významným hráčem při degeneraci chromozomu W (Sahara et al., 2003). Právě repetitivní sekvence podléhají rychlé evoluci díky absenci crossing-overu (Marec, 1996).

1.3. Satelitní sekvence

Satelitní DNA (satDNA) je tandemově se opakující sekvence, která je uspořádána do dlouhých pásů, lokalizovaných především v konstitutivním heterochromatinu. Ten je velmi důležitým prvkem pro stavbu a správnou funkci centromerických, telomerických a subtelomerických oblastí. Satelity mohou fungovat také jako místa pro vazbu proteinu, strukturální domény nebo jako místa pro epigenetické modifikace (Palomeque, Lorite, 2008).

V počtu a typech tandemových repetic v genomu druhu je velmi široká variabilita, stejně tak jako ve velikostech a sekvencích jednotlivých repetic. Konkrétně se mezi druhy mohou lišit celkovou délkou, délkou monomeru, pořadí bází, konkrétní oblastí výskytu a sekundární nebo terciární strukturou (Plohl et al., 2012). Lišit se mohou i mírou distribuce, mohou být specifické pro jeden druh nebo rozšířené mezi příbuznými druhy s větší či menší intenzitou. V rámci jedince se pak satelity rozlišují na specifické pro určitý chromozom a satelity vyskytující se na více či všech chromozomech jedince (Palomeque, Lorite, 2008).

Důležitou roli hrají v buňce přepisy satelitní DNA, které pomocí RNA interference rozpoznávají DNA repetice a podle jejich rozmístění určují prostor s preferencí pro shromažďování heterochromatinu (Ugarkovic, 2005). Uvažuje se také nad tím, že na tvorbě heterochromatinu či genové expresi v něm se podílejí transkripty transpozonů vyskytující se v centromerách (Dimitri et al., 2005). Transpozony totiž bývají nejčastějším základním stavebním kamenem satelitních sekvencí (Palomeque, Lorite, 2008).

Jak už bylo zmíněno výše, satelity se nejčastěji nacházejí v heterochromatinu, proto se při jejich hledání nejčastěji zkoumá právě on. Výskyt heterochromatinu v genomu motýlů je však zcela ojedinělý a možná právě proto je situace ohledně výskytu satelitních sekvencí u tohoto řádu zcela jiná než u ostatních zástupců hmyzu. Dosud jsou u motýlů známé pouze dva autosomální satelity, a to repetice *TaqI* v genomu *Antheraea mylitta* (Mahendran et al., 2006) a satelitní sekvence Cp-SAT1 u obaleče jablečného (Věchtová et al., 2016).

Díky malému výskytu heterochromatinu v genomu je tedy nejlepším místem pro vyhledávání repetic u motýlů největší heterochromatinový blok v genomu, nacházející se zpravidla na chromozomu W. Satelitních sekvencí spojených s tímto pohlavním chromozomem je ale známo také velmi málo, pouze 234 bází dlouhý MBSAT1 v DNA mýř zelné (*Mamestra brassicae*) (Mandrioli et al., 2003), 189 bp dlouhý FR satelit vyskytující se u blýskavky kukuřičné (*Spodoptera frugiperda*) (Lu et al., 1994), PiSAT1 nalezený na chromozomu W zavíječe paprikového (*Plodia interpunctella*) (Dalíková et al., 2017b),

mikrosatelitní lokus BA–CA16 v genomu motýla *Bicyclus anynana* (van't Hof et al., 2005) a satelitní sekvence předivky brslenové (*Yponomeuta cagnagella*) (Píliková, 2019).

1.4. Bělásci (*Pierinae*)

Počet pohlavních chromosomů se u většiny druhů motýlů pohybuje mezi $n = 29–31$ (Robinson, 1971), avšak nejčastější je počet $n = 31$, který se objevuje od bazálních až po ty nejodvozenější druhy (Lukhanov, 2000). Chromozomy motýlů jsou holokinetické (Wolf, 1996) a jejich karyotypy jsou relativně stabilní, což umožnilo zachovat cytogenetické podobnosti jak mezi jednotlivými druhy, tak i se sesterskými chrostíky (Wolf et al., 1997). Existuje však několik skupin jejichž počty chromosomů jsou radikálně odlišné v důsledku fúzních a štěpných událostí, například bělásci.

Dnes je známo několik proteinů vyskytujících se u této skupiny zodpovědných za adaptaci na hhoštitelskou rostlinu a sloužící jako obrana proti parazoitům s potenciálním využitím pro lidskou medicínu. Jsou to jmenovitě “nitrile – specifier proteins“, které umí přeměnit ochranné chemické látky rostlin na netoxické molekuly (Wittstock et al., 2004) a proteiny pro bělásky unikátní, zvané pierisiny. Tyto proteiny jsou schopné vyvolat apoptózu, a tak sloužit k ochraně proti parazitickým vosám (Watanabe et al., 1999) nebo být cytotoxické pro rakovinné buňky několika linií (Kono et al., 1999).

1.4.1. Bělásek zelný (*Pieris brassicae*)

Bělásek zelný je velký bělokřídý motýl známý především jako škůdce brukvovitých rostlin. Je původním druhem v Evropě, Asii a severní Africe (Hill et al., 1987), odkud se kolem roku 1995 rozšířili na sever Japonska (ostrov Hokkaido) a do jižní Afriky (Tanaka et al., 2007), později se jeho populace objevila i v Severní Americe a v roce 2010 i na Novém Zélandu. V haploidním stavu je jeho počet chromosomů $n = 15$ (Doncaster, 1912; Beliajeff, 1930; Lorković, 1941, Bigger, 1960). O tomto druhu běláška je známo, že jeho DNA tvoří velké heterochromatinové bloky (Nguyen et al., 2009), což bylo jedním z důvodů, proč byl vybrán jako zkoumaný druh této práce.

1.4.2. Bělásek řepkový (*Pieris napi*)

Tento bělokřídlý motýl je široce rozšířen, Vyskytuje se od západní Evropy, přes palearktickou oblast až do východní Asie a Japonska (Eitschberger, 1984). Velikost jeho genomu je asi 299 Mbp (Nallu et al., 2018) a v haploidním stavu je jeho počet chromozomů $n = 25$ (Federley, 1938; Lorković, 1941; Bigger, 1960)

1.4.3. Bělásek řepový (*Pieris rapae*)

Bělásek řepový je malý původně euroasijský motýl, který byl posléze rozšířen do Severní Ameriky, Austrálie a na Nový Zéland (Scudder, 1887). S genomem o velikosti 246 Mbp (Shen et al., 2016) nebo 272 Mbp (Nallu et al., 2018) patří mezi zástupce s nejmenším genomem v celém řádu motýlů. Počet jeho chromozomů v haploidním stavu je $n = 25$ (Beliajeff, 1930; Lorković, 1941, Maeki a Remington, 1960; Bigger, 1960). Na rozdíl od běláška zelného u tohoto druhu nebyly heterochromatinové bloky pozorovány (Nguyen et al., 2009). Podle osekvenování je odhadováno, že 22,7 % genomu tvoří repetice, což je při porovnání s jinými druhy motýlů velmi málo, např. genom bource morušového (*B. mori*) je tvořen až z 44,1 % repeticemi.

Rozdíly v počtech chromozomů mezi druhy a výskyt heterochromatinových bloků poukazují na skutečnost, že bělásci mají dynamicky se měnící genom, což motivovalo tuto práci ke zkoumání repetitivní DNA, konkrétně satelitních sekvencí. Nejčastějším místem kumulace těchto sekvencí je heterochromatin chromozomu W, proto byla zkoumána i role těchto sekvencí v degeneraci chromozomu W.

2. Cíl práce

Cílem této práce bylo analyzovat přítomnost chromozomu W u tří druhů bělásků rodu *Pieris*: běláška zelného (*P. brassicae*), běláška řepkového (*P. napi*) a běláška řepového (*P. rapae*), porovnat jeho podobu u jednotlivých druhů a zjistit, zda se na něm vyskytují satelitní sekvence.

3. Materiály a metody

3.1. Použitý hmyz

Dospělé samice všech tří druhů byly nachytány v České republice, v okolí Českých Budějovic a u obce Benešov nad Černou – Kuří (Novohradské hory). Samice kladly vajíčka do plastové krabičky při pokojové teplotě. Živnou rostlinou housenek byla převážně barborka obecná (*Barbarea vulgaris*).

3.2. Příprava chromozomálních preparátů

Chromozomální preparáty byly připraveny z ovarií larev posledního instaru. Ovaria housenek byla vypitvána ve fyziologickém roztoku a přemístěny do čerstvě připraveného fixačního roztoku Carnoy (6:3:1 = ethanol – 99 %: chloroform: kyselina octová – 99,5 %) Materiál byl fixován po dobu 15 minut. Podložní sklo (Superfrost, Menzel – Gläser, Německo) bylo umístěno do kyselého ethanolu (roztok 1% HCl v 96% ethanolu) a následně osušeno papírem. Po fixaci byly orgány přesunuty na takto připravené podložní sklo do kapky 60% kyseliny octové (10–20 µl) a macerovány za pomoci wolframových jehel až do rozpuštění tkáně. Podložní sklo bylo poté přeneseno na plotýnku vyhřátou na 40–45 °C. Rozpuštěný materiál byl rozprostřen na skle rovnoměrným posouváním kapky po skle téměř do úplného odpaření. Zbytek kapky (1/3 až ¼ původní velikosti kapky) byl sklepnut. Všechny takto vytvořené preparáty byly postupně odvodněny v ethanolové řadě (70 %, 80 % a 100 %) a uskladněny v mrazáku při -20°C. Zbytky těl byly zmrazeny tekutým dusíkem a dále uchovávány pro izolaci DNA. (Traut et al., 1999; Sahara, Marec, Traut, 1999)

3.3. Izolace DNA

Pro izolaci byla vybrána metoda celogenomové izolace DNA za pomoci hexydecyltrimethylammonium bromidu (CTAB). (Winnepenninck, Backeljau, Wachter 1993). Extrakční pufr byl připraven smícháním všech složek (viz Tabulka 1). Polovina či třetina těla jednoho jedince (záleží na velikosti larvy) byla rozmělněna tloučkem v 800 µl extrakčního pufru v 1,5ml zkumavce a nechána inkubovat v thermobloku při teplotě 60 °C a 300 rpm do druhého dne.

Tabulka 1: Složení extrakčního pufru

Chemikálie	Množství na 10 ml	Koncentrace
CTAB	0,2 g	2 %
1 M Tris	1 ml	100 mM
5 M NaCl	2,8 ml	1,4 M
0,5 M EDTA, pH = 8	0,8 ml	40 mM
β – mercapthoethanol	20 μl	0,2 %
Proteináza K (Macherey – Nagel, Německo)	50 μl	0,1 mg/ml
H ₂ O	5,33 ml	

Druhý den byl obsah zkumavky přemístěn do 2ml zkumavky a bylo přidáno stejné množství (800 μl) chloroformu. Vzorky byly 2 minuty míchány a poté centrifugovány po dobu 10 min (4 °C, 14 000 rpm). Horní fáze (obsahující DNA) byla přepipetována do nové 2ml zkumavky a předchozí postup byl zopakován. Horní fáze byla opět odebrána a umístěna do nové 1,5ml zkumavky. Následně bylo přidáno 5 μl RNAzy A (10 mg/ml) (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA) a vzorek byl při 37 °C inkubován po dobu 30 minut. Následně bylo přidáno 2/3 objemu isopropanolu a vzorek byl lehce promíchán a nechán 30 minut až 2 hodiny při pokojové teplotě. Za tuto dobu se DNA ve vzorku vysrážela. Vzorek byl následně centrifugován po dobu 15 minut (4 °C, 14 000 rpm). Supernatant byl odstraněn, k peletu bylo přidáno 500 μl 70% ethanolu a centrifugace byla zopakována za stejných podmínek. Tento promývací krok byl poté ještě jednou zopakován. Supernatant byl poté důkladně odstraněn a pelet rozpuštěn v 30–50 μl sterilní vody (v závislosti na velikosti peletu). Koncentrace DNA byla měřena pomocí spektrofotometru Nanodrop 2000 a fluorometru Qbit (oba ThermoScientific, Waltham, USA) a pomocí elektroforetické separace bylo ověřeno, zda není DNA fragmentovaná.

3.4. Příprava sond pro CGH

Pro přípravu sond pro CGH bylo zvoleno značení metodou Nick translace (Kato, et al., 2006). Tato metoda spočívá v narušení DNA řetězce DNazou I a následnému opravení řetězce DNA Polymerázou I za přítomnosti značených nukleotidů: červené (Cy3-dUTP) pro samčí

genomovou DNA a zelené (fluorescein-12-dUTP) pro samičí genomovou DNA (oba Jena Bioscience, Jena, Německo).

Byla připravena reakční směs (viz Tabulka 2), která byla následně inkubována v thermocyleru po dobu 3,5 hodiny při 15 °C. Aby došlo k inaktivaci ve směsi přítomných enzymů, byla směs po dobu 10 minut inkubována při teplotě 70 °C a byl přidán nanášecí pufr. Pomocí elektroforetické separace 2 µl sondy v 1% agarózovém gelu byla zkontrolována její velikost, která by se ideálně měla pohybovat okolo 500 bp. Sondy byly následně uskladněny v mrazáku při -20 °C

Tabulka 2: Složení reakční směsi pro Nick translaci

Chemikálie	Množství	Koncentrace
10x NT pufr (0,5 M Tris-HCl, pH 7,5; 50 mM MgCl ₂ ; 0,05 % BSA	2 µl	0,05 M Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM MgCl ₂ ; 0,005 % BSA
0,1 M mercaptoethanol (β-ME)	2 µl	0,01 M
dNTP (0,5 mM dATP, dCTP, dGTP; 0,1 mM dTTP)	2 µl	0,05 mM dATP, dCTP, dGTP; 0,01mM dTTP
1 mM dUTP	0,4 µl	0,02 mM
DNA polymeráza I (10 U/µl)	2 µl	1 U/µl
DNAza I (0,01 U/µl) (ThermoScientific, Waltham, USA)	2 µl	0,001 U/µl
DNA	1 µg	
H ₂ O	11,1 – objem DNA µl	
Celkem:	20 µl	

3.5. CGH

Tato metoda se užívá k porovnání dvou různě naznačených genomových sond hybridizovaných na chromozomální preparát. V tomto případě byla CGH použita k detekci chromozomu W u běláška zelného (*P. brassicae*), běláška řepkového (*P. napi*) a běláška

řepového (*P. rapae*) hybridizací celogenomových sond ze samce a samice na samičí chromozomální preparáty.

Smícháním následujících složek byla vytvořena hybridizační směs do 1,5ml zkumavky: 300 ng samčí sondy naznačené červeným fluorochromem (Cy3), 300 ng samičí sondy naznačené zeleným fluorochromem (fluorescein), 25 µg DNA z lososích spermií, 1/10 objemu octanu sodného (3M, pH 8) a 2,5x množství objemu studeného ethanolu (100 %). Následně byla směs nechána 15 min v mrazáku (-20 °C) precipitovat. Po uplynutí doby byla směs centrifugována 15 min (4 °C, 15 000 rpm). Po odstranění supernatantu bylo k peletu přidáno 200 µl chladného 70% ethanolu a zkumavka byla důkladně vortexována a opět centrifugována za stejných podmínek po dobu 5 minut. Supernatant byl pečlivě odstraněn a k peletu bylo přidáno 5 µl deionizovaného formamidu. Zkumavka byla nechána inkubovat 30 minut při 37 °C. Následně bylo přidáno 5 µl 20% dextran sulfátu (ve 4x SSC) a vzorek byl po dobu 5 minut denaturován ve vodní lázni (90 °C). Vzorek byl ihned přenesen na led, aby došlo k prudkému zchlazení a následně prehybridizován při 37 °C po dobu 1,5 hodiny.

Současně byly připravené chromozomové preparáty nejprve odvodněny ethanolovou řadou (70 %, 80 %, 100 %) a po oschnutí bylo na každé sklo přidáno 100 µl roztoku RNAzy A (20 µg v 2x SSC). Preparát byl hodinu inkubován ve vlhké komoře (krabička s utěrkou namočenou ve 2x SSC) při 37 °C. Následně bylo sklo dvakrát promyto v kyvetě s 2x SSC a byla provedena denaturace chromozomů přidáním 100 µl 70% roztoku formamidu ve 2x SSC, který byl překryt krycím sklem (24x50 mm) a nechán denaturovat 3,5 minuty při 68 °C v thermobloku. Ihned po uplynutí doby bylo krycí sklo sklepnuto a preparát přenesen na 1 minutu do chladného 70% ethanolu (-20 °C). Následovalo odvodnění v 80 % a 100 % ethanolu po dobu 30 vteřin.

Na suché preparáty byla na sklo nanесena prehybridizovaná hybridizační směs a ta byla přikryta krycím sklem (24x32 mm). Hrany krycího skla byly zalepeny lepidlem Rubbercement (Marabu, Německo) a preparát byl přenesen do vlhké komory, kde byl 3 dny inkubován při 37 °C.

Po inkubaci bylo z preparátu odstraněno lepidlo a krycí sklo bylo sklepnuto. Následně byl preparát promyt v kyvetě nejprve při pokojové teplotě a poté 5 min promýván při 62 °C v 1% roztoku Tritonu X (Sigma – Aldrich, USA) v 0,1x SSC. Poté byl preparát ihned přenesen na 1 minutu do kyvety s 1% roztokem Kodak PhotoFlo v miliQ vodě. Po oschnutí bylo na preparát nanесeno 25 µl směsi DAPI (500 ng/µl) + DABCO (Sigma – Aldrich, USA) a

preparát byl překryt krycím sklem (24x40 mm). Zbytky DAPI + DABCO byly odstraněny pomocí filtračního papíru a hrany krycího skla byly zalakovány lakem na nehty. Preparáty byly následně uskladněny v ledničce při 4 °C až do prohlížení.

3.6. Navržení primerů k satelitním sekvencím

Sekvence satelitní DNA byly poskytnuty školitelkou. Pro jejich získání byly použity sekvence vždy jednoho samce a jedné samice každého druhu sekvenované odděleně na platformě Illumina firmou Novogene (Peking, Čína) (velikost insertu 450 bp, párová čtení, délka sekvencí 150 bp, kontrola kvality provedena pomocí programu fastQC, verze 0.11.5, délka sekvencí sjednocena na 130 b pomocí programu Trimmomatic, verze 0.32). Pro analýzu knihoven sekvencí byl použit program Repeat Explorer (Novák et al. 2013), verze 2.3.7 s implementovaným nástrojem TAREAN na detekci tandemových repetitív umístěný na platformě Galaxy s použitím přednastavených parametrů s výjimkou použití databáze pro anotaci sekvencí (METAZOA3.0) a komparativní analýzy, která byla provedena separátně pro každý druh v podobě samice vs. samec a pak pro všechny druhy a pohlaví najednou. Analýza byla provedena na náhodném vzorku 500 000 sekvencí. Pro odhad procentuálního zastoupení jednotlivých satelitů u samce a samice byly provedeny rovněž analýzy jednotlivých pohlaví u všech druhů, a to s použitím přednastavených parametrů.

Primery byly navrženy v programu Geneious (verze 11.1.2) na dimerech satelitní DNA přes hranici monomeru, aby byly při následující PCR amplifikovány jen skutečné tandemové repetice. Primery byly navrženy do konzervativních míst satelitů s využitím funkce programu Geneious „mapování na referenci“, kde referenční sekvencí byl monomer satelitu, na které byly mapovány jednotlivé sekvence obsahující části tohoto satelitu, které byly identifikovány programem Repeat Explorer. Syntézu primerů provedla firma GENERI BIOTECH s.r.o. (Hradec Králové).

3.7. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR je založená na opakované denaturaci a následné renaturaci rozvolněných molekul DNA za přítomnosti primerů, které jsou kompatibilní k oběma koncům amplifikovaného úseku DNA. Syntézu nových řetězců zajišťuje termostabilní DNA polymeráza. Reakční směs (složení viz Tabulka 3) o objemu 25 µl obsahovala vždy 2 primery (forward a reverse), viz Tabulka 4.

PCR s těmito primery probíhala následovně: iniciační denaturace při 92 °C probíhala 10 minut, následovalo 30 cyklů: denaturace 30 sekund při 92 °C, nasedání primerů (annealing) 45 sekund při ideální teplotě pro daný primer (viz Tabulka 4), a extenze po dobu 1 minuty při 72° C. Následovala finální extenze 10 minut při 72 °C a zchlazení na 4 °C.

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro PCR

Chemikálie	Množství v 25 μ l reakce	Koncentrace
5x OneTaq pufr	5 μ l	1x
dNTP (2,5 mM dATP, dTTP, dCTP a dGTP)	2 μ l	0,2 mM
forward primer (10 μ M)	2,5 μ l	1 μ M
reverse primer (10 μ M)	2,5 μ l	1 μ M
OneTaq DNA polymeráza I (5U/ μ l) (New England BioLabs, USA)	0,2 μ l	0,04 U
H ₂ O	12,8 μ l – objem DNA	
DNA	100 ng	

Tabulka 4: Primery

Název primeru	Sekvence	Melting temperature
CL04 HC F	AAACGCATTTATTAACAGTATTTTCGT	57,4 °C
CL04 HC R	ACTGTTATTGGCTTTGGATTAGTG	57,5 °C
CL21 HC F	CTTGTC AACGTC CGAGCAAC	59,8 °C
CL21 HC R	ACAAGTGGTTGGTGTCGAGG	60,2 °C
CL26 HC F	ACGCTCATATCTCAGTCAAATGT	58,0 °C
CL26 HC R	TGTTGGAACGTTTACATCGATTCT	59,5 °C
CL183 HC F	CAAGGAGCTATCGACGCATG	58,9 °C
CL183 HC R	GCTTCTGCTGTCCTGGTACA	59,7 °C
CL118 LC F	AAGCCAAACACAGTTGTCCT	57,9 °C
CL118 LC R	GAGTAACTGTAAACAAATAGCCACT	57,3 °C
CL187 LC F	TTCTCTCAGCAGAGCATACTC	59,3 °C
CL187 LC R	GCGAAGAGTTCTGGCATAGGA	59,9 °C

Produkty PCR byly následně překontrolovány elektroforézou a produkty správné délky z gelu vyřezány. Vyřezané produkty byly přečištěny pomocí vymačkání z parafilmu následovně: Vyříznutý proužek genu byl vložen do čistého čtverce parafilmu a zmáčknut, aby došlo k uvolnění produktů z gelu. Tato kapalina byla odsáta a 3 μ l byly použity jako templát pro druhou PCR reakci, která probíhala za stejných podmínek. Produkty byly opět přečištěny tentokrát pomocí sady Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, Wisconsin, USA) následovně: Ke každému produktu PCR reakce bylo přidáno stejné množství roztoku "Membrane Binding Solution" a celý objem byl přepipetován na kolonku vloženou do sběrné zkumavky. Roztok byl 1 minutu inkubován při pokojové teplotě a následně centrifugován 1 minutu při pokojové teplotě (16 000 rpm). Na kolonku s navázanými produkty PCR bylo poté přidáno 700 μ l roztoku "Membrane Washing Solution", kolonka byla umístěna do nové sběrné zkumavky a centrifugována 1 minutu za stejných podmínek. Tento krok byl opakován, ale s přidáním pouze 500 μ l roztoku a následnou centrifugací po dobu 5 min za stejných podmínek. Sběrná zkumavka byla vyprázdněna a kolonka 1 min centrifugována. Nakonec byla kolonka přemístěna do 1,5ml zkumavky a po přidání 50 μ l "Nuclease-Free Water" inkubována po dobu 1 minuty. Následně byla 1 minutu centrifugována za stejných podmínek. Po odstranění kolonky byly přečištěné produkty připraveny k osekvenování pomocí Sangerova sekvenování společností SEQme (Dobříš, Česká republika), aby se ověřilo, že se při PCR reakci naamplifikovaly opravdu zkoumané satelity. V ideálním případě by se satelity nejprve zaklonovaly a k sekvenování byl použit plazmid. Tento krok musel být bohužel z nedostatku času vynechán.

3.8. Značení satelitních sond pro FISH pomocí PCR

Značení sond pro FISH bylo provedeno pomocí PCR reakce za přítomnosti vysoce koncentrovaných dNTPs (složení viz Tabulka 5). Byla namíchána reakční směs (viz Tabulka 6) a PCR reakce proběhla za stejných podmínek, pouze s prodlouženou dobou extenze na 2 minuty při 72 °C. Templátem byly přečištěné produkty předchozích PCR reakcí.

Tabulka 5: Složení vysoce koncentrovaných dNTP

Chemikálie	Množství	Koncentrace
2,5 mM dATP	4 μ l	0,25 mM
2,5 mM dCTP	4 μ l	0,25 mM
2,5 mM dGTP	4 μ l	0,25 mM
2,5 mM dTTP	1,5 μ l	0,09 mM
1 mM Cy3	6,4 μ l	0,16 mM
H ₂ O	20,16 μ l	
Celkem	40 μ l	

Tabulka 6: Složení reakční směsi pro PCR značení

Chemikálie	Množství ve 25 μ l reakce	Koncentrace
10x ExTaq pufr	2,5 μ l	1x
High dNTP's	4 μ l	0,04 mM dATP, dCTP, dGTP a 0,014 mM dTTP
Forward primer (10 μ M)	2,5 μ l	1 μ M
Reverse primer (10 μ M)	2,5 μ l	1 μ M
ExTaq polymeráza (5U/ μ l)	0,125 μ l	0,625 U
DNA	10 ng	
H ₂ O	13,4 μ l – objem DNA	

3.9. FISH

FISH je metoda, která umožňuje lokalizovat určitou sekvenci přímo na chromosomech pomocí značené DNA nebo RNA sondy. Tato hybridizace umožnila zjistit umístění satelitů v genomu. Do 1,5ml zkumavky byla připravena hybridizační směs, která obsahovala 300 ng červeně naznačených produktů PCR značení, 25 μ g DNA z lososích spermií, 1/10 objemu octanu sodného (3M, pH 8) a 2,5x množství objemu studeného ethanolu (100 %). Další kroky včetně přípravy chromosomálních preparátů a předpůsobení RNAzou probíhaly stejně jako u CGH, kromě 1,5hodinové prehybridizace, která byla vynechána.

3.10. Prohlížení preparátů

Preparáty byly prohlíženy a foceny pod objektivy 63x a 100x na mikroskopu Zeiss Axioplan 2 za použití 3 barevných filtrů: zelený pro prohlédnutí samičí sondy, červený pro prohlédnutí samčí sondy a sond pro jednotlivé satelitní sekvence a modrý pro prohlédnutí chromozomů obarvených pomocí DAPI. Pro focení byl použit fotoaparát Olympus CCD XM10 a počítačový program cellSens 1.9. Obrázky byly následně upravovány a skládány v programu Adobe Photoshop CS4 (verze 11.0).

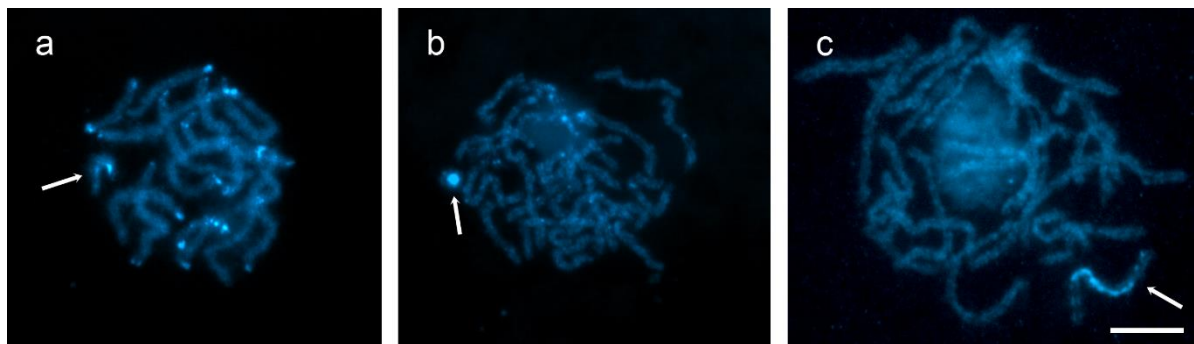
4. Výsledky

4.1. DAPI

Genom běláška zelného (*P. brassicae*) obsahuje velké množství terminálních heterochromatinových bloků, a to nejen na chromozomu W, ale i na autozomech. Bivalent WZ tohoto druhu patří mezi menší bivalenty, kde chromozom W je tvořen heterochromatinem po celé své délce, přičemž terminální bloky jsou výraznější.

U běláška řepkového (*P. napi*) lze nalézt drobné heterochromatinové bloky na autozomech. Chromozom W je malý, a naopak tvořen masivním heterochromatinovým blokem, který v pachytene tvoří kuličku, kolem které se obtáčí chromozom Z.

V genomu běláška řepového (*P. rapae*) můžeme nalézt heterochromatin vyskytující se na přibližně polovině chromozomu W.



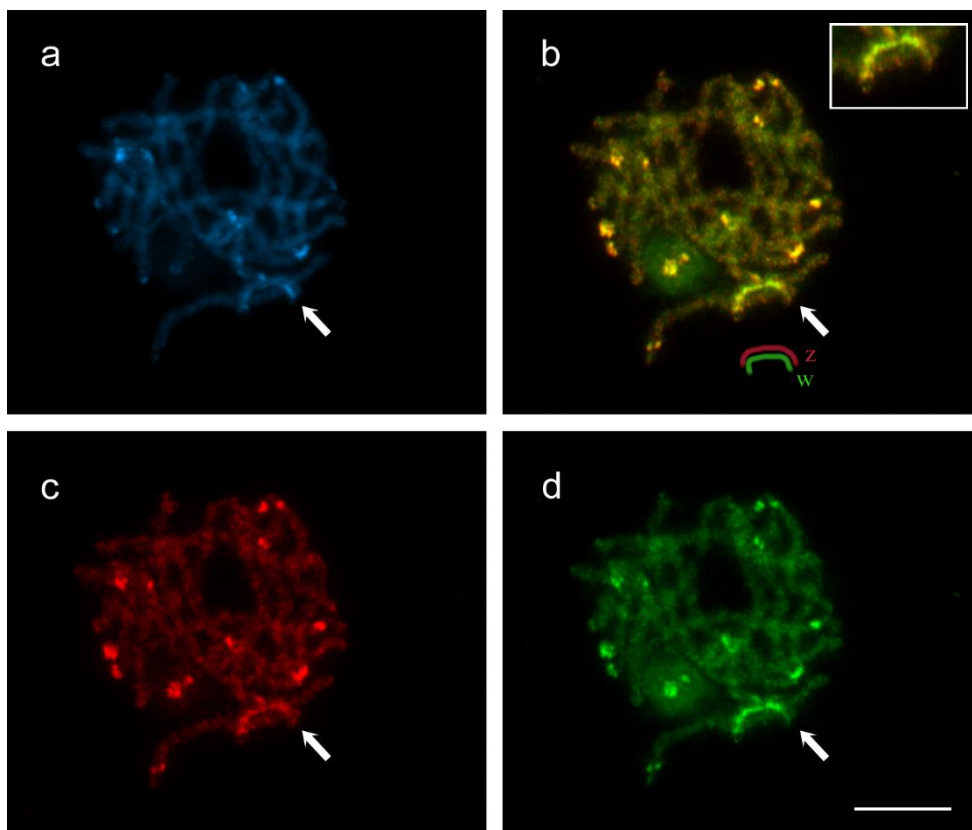
Obrázek 2: Podbarvení DAPI na pachytenních jádrech ♀ (a-d). Jádru běláška zelného (*P. brassicae*) (a), jádro běláška řepkového (*P. napi*) (b), jádro běláška řepového (*P. rapae*) (c). Šipky ukazují chromozom W. Měřítko = 10 μm .

4.2. CGH

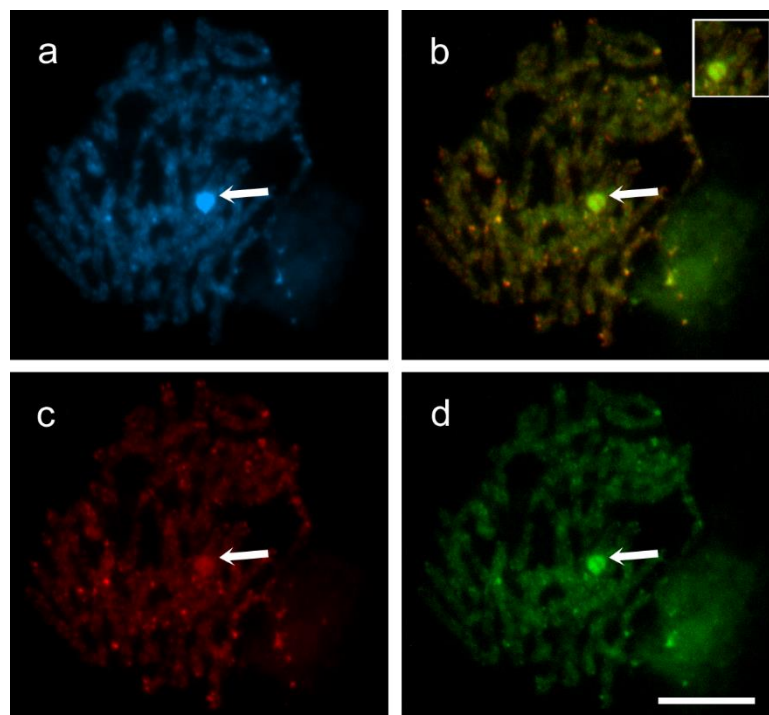
Přítomnost chromozomu W byla ověřena metodou CGH. Obě sondy na preparát hybridizovaly, přičemž zelená samičí sonda zvýraznila u všech tří zkoumaných druhů unikátní nebo obohacené sekvence na chromozomu W, a proto byl chromozom W u většiny jader velmi dobře rozpoznatelný. Tato metoda byla prováděna osmkrát, z důvodu špatného signálu zeleného fluorochromu na samičí sondě.

Na obrázcích 2, 3 a 4 jsou vyobrazeny hybridizace všech tří druhů bělášků. Bivalent WZ je od autozomů velmi dobře odlišitelný, protože díky přítomnosti heterochromatinu, na něj sonda velmi dobře hybridizovala. U běláška zelného (Obrázek 3) hybridizovala samčí

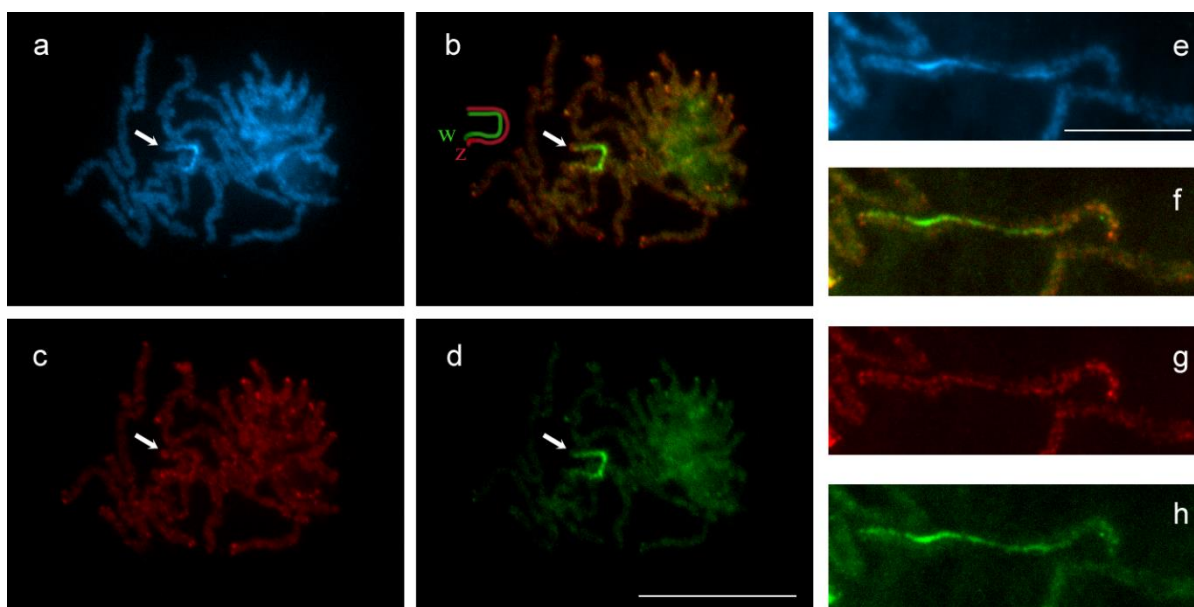
i samičí sonda po celé délce chromozomu W, přičemž střed chromozomu byl značen výrazněji sondou samičí. Na chromozomu W lze navíc pozorovat shluky heterochromatinu, které jsou často místy výskytu tandemových repetitiv. Naopak u chromozomu W běláška řepkového (Obrázek 4) můžeme pozorovat výrazně silnější hybridizaci samičí sondy v heterochromatinovém bloku. U běláška řepového (Obrázek 5) lze pozorovat hybridizaci samčí i samičí sondy po celé délce chromozomu W, přičemž samičí sonda vyzařuje silnější signál než sonda samčí uprostřed chromozomu a na jeho koncích je intenzita nižší.



Obrázek 3: Komparativní genomová hybridizace na pachytenním jádře ♀ běláška zelného (*P. brassicae*) (a–d). Podbarvení DAPI (a), překryv samičí a samčí sondy (b), samčí sonda značená červeně (c), samičí sonda značená zeleně (d). Šipky ukazují bivalent WZ. Schéma v obrázku b znázorňuje bivalent WZ. Měřítko = 10 µm.



Obrázek 4: Komparativní genomová hybridizace na pachytenním jádře ♀ běláška řepkového (*P. napi*) (a–d). Podbarvení DAPI (a), překryv samičí a samčí sondy (b), samčí sonda značená červeně (c), samičí sonda značená zeleně (d). Šipky ukazují bivalent WZ. Schéma v obrázku b znázorňuje bivalent WZ. Měřítko = 10 μ m.



Obrázek 5: Komparativní genomová hybridizace na pachytenním jádře ♀ běláška řepového (*P. rapae*) (a–h). Podbarvení DAPI (a), překryv samičí a samčí sondy (b), samčí sonda značená červeně (c), samičí sonda značená zeleně (d). Šipky ukazují bivalent WZ. Detail bivalentu WZ podbarvený DAPI (e), překryv samičí a samčí sondy (f), samčí sonda obarvená červeně (g), samičí sonda obarvená zeleně (h). Schéma v obrázku b znázorňuje bivalent WZ. Měřítka v obrázku d = 20 μm , platí pro obrázky a–d, měřítko v obrázku e = 10 μm , platí pro obrázky e–h.

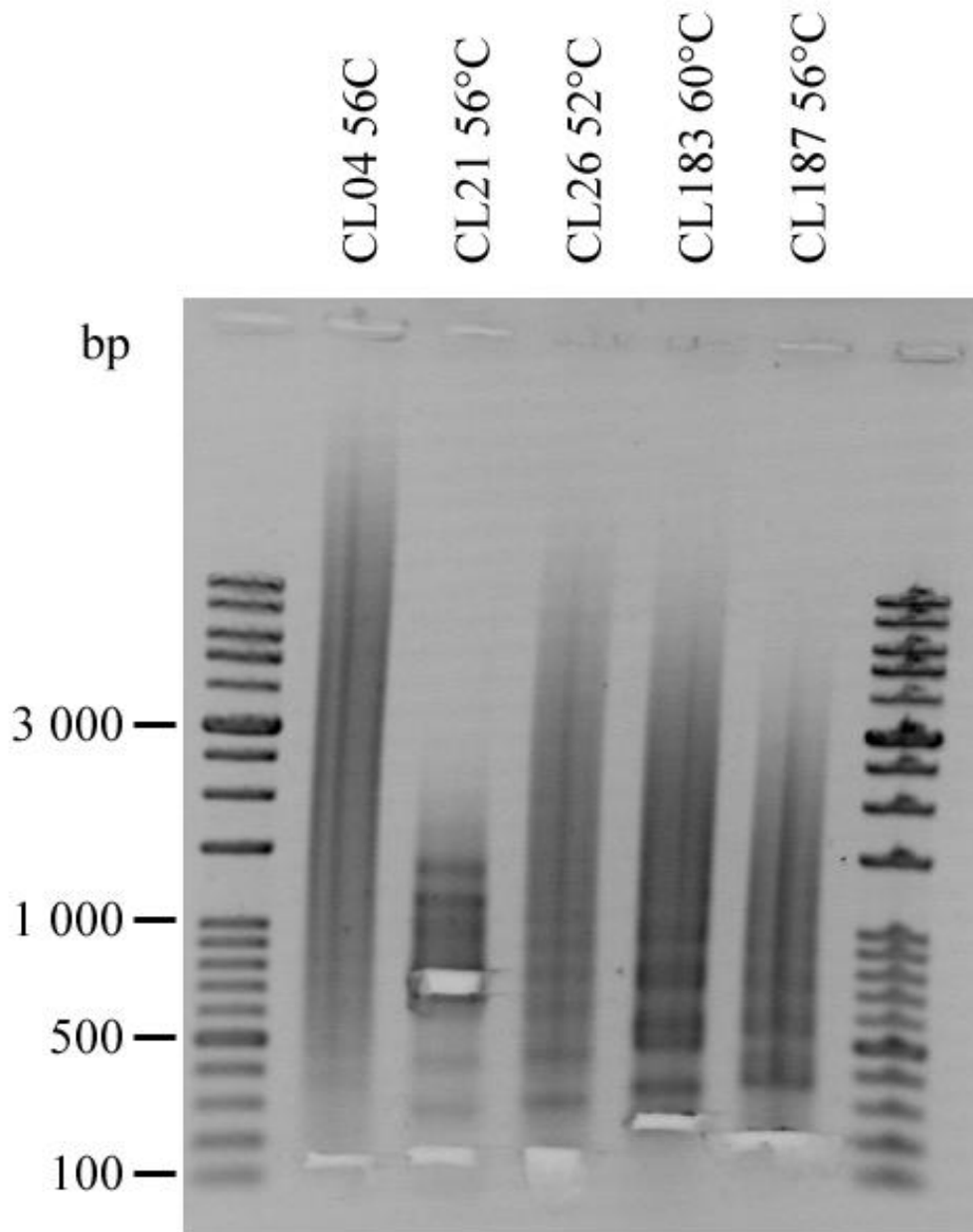
4.3. PCR

PCR byla prováděna na všech druzích běláška, ale následná FISH byla z důvodu nedostatku času prováděna vždy pouze na druhu běláška s nejpravděpodobnějším či nejvyšším teoretickým výskytem satelitu (viz Tabulka 7) PCR byla prováděna u všech primerů za různých teplot annealingu, aby bylo možno zjistit ideální teplotu pro každou dvojici primerů. Při tomto kroku musel být vyřazen satelit s názvem CL118, protože i po opakované reakci za různých teplot nebylo možné identifikovat ideální teplotu. U ostatních satelitů byla ideální teplota annealingu zjištěna (viz Tabulka 7).

Tabulka 7: Satelity na zkoumaných druzích bělásků a zjištěná ideální teplota annealingu

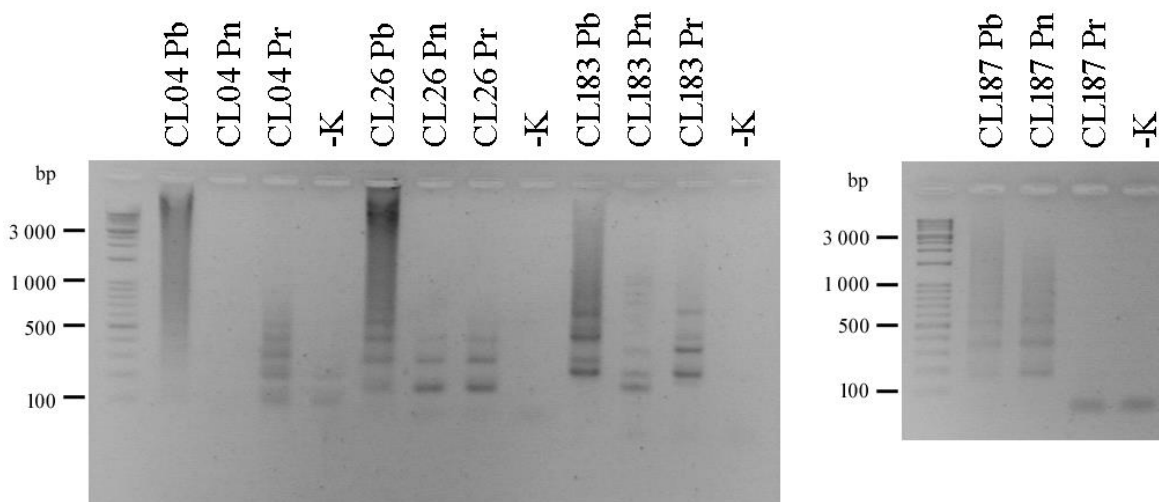
Satelit	Druh běláška	Teplota annealingu	Očekávaná délka produktu
CL04	bělásek zelný (<i>Pieris brassicae</i>)	56°C	102 bp
CL 21	bělásek řepkový (<i>Pieris napi</i>)	56°C	657 bp
CL 26	bělásek zelný (<i>Pieris brassicae</i>)	52°C	141 bp
CL183	bělásek zelný (<i>Pieris brassicae</i>)	60°C	233 bp
CL187	bělásek řepkový (<i>Pieris napi</i>)	56°C	171 bp

Produkty této PCR reakce byly vyřezány z gelu (viz Obrázek 6) a po přečištění poslány na sekvenování, které prokázalo, že se skutečně jedná o požadované sekvence. Produkty tedy mohly být použity jako templát pro druhou PCR reakci, která proběhla ve stejném složení za stejných podmínek. Při tomto kroku byl vyřazen satelit CL21, jehož produkty byly různé délky. Ostatní produkty byly použity jako templát pro PCR značení za přítomnosti značených nukleotidů. Tyto sondy (viz Obrázek 9) byly následně použity pro fluorescenční in situ hybridizaci.



Obrázek 6: Gel po vyřezání proužků produktů PCR. -K = negativní kontrola.

Pro porovnání výskytu satelitů byla provedena PCR na všech třech druzích běláška (Obrázek 7). V negativní kontrole CL04 lze vidět kontaminaci, ke které bohužel docházelo opakovaně i při použití nových chemikálií. Teoreticky by se mohlo jednat o kontaminaci zásobních primerů, ale proti tomu svědčí jamka s CL04 Pn. V negativní kontrole CL187 a CL 187 Pr lze pozorovat dimery primerů.

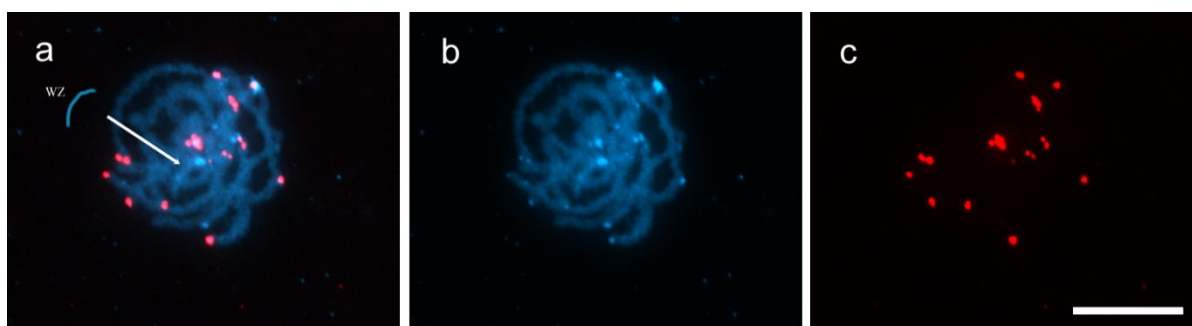


Obrázek 7: Polymerázová řetězová reakce na všech třech druzích bělásků. -K = negativní kontrola.

4.4. Analýza a lokalizace satelitních sekvencí

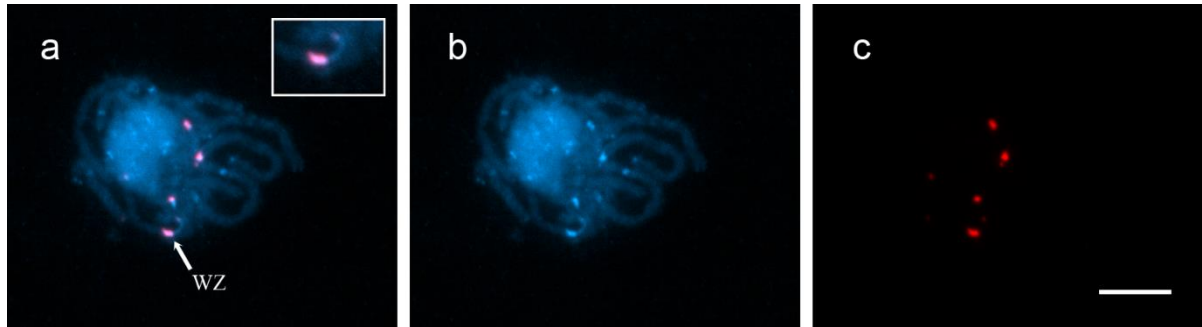
Pomocí metody FISH byla zjišťována přítomnost a místo výskytu satelitů na chromozomech jednotlivých druhů bělásků. Tato metoda byla prováděna se sondami čtyř satelitů, vždy druhu běláška s teoreticky nejvyšším výskytem, viz Tabulka 7 výše.

Satelit CL04 byl u obou pohlaví běláška zelného detekován jako nejpočetnější repetitivní sekvence. U obou pohlaví zaujímá stejné procento genomu (1,1 %), což naznačovalo, že se jedná o autosomální satelit. Tato domněnka byla potvrzena, když satelit hojně hybridizoval do heterochromatinových bloků, nikoli však na pohlavní chromozomy (Obrázek 8).



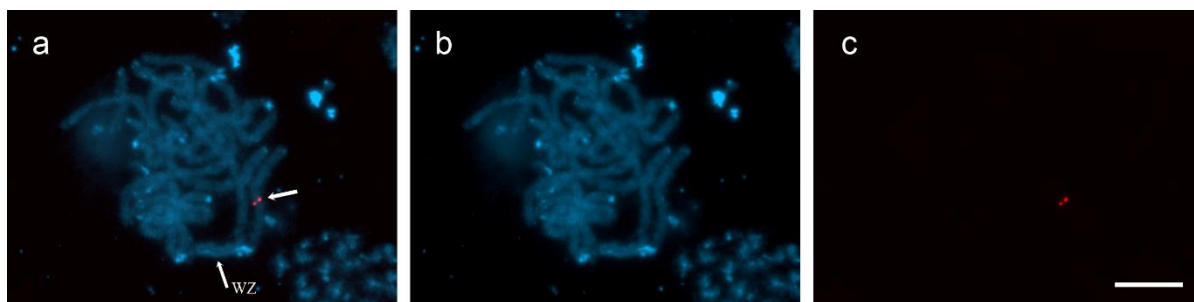
Obrázek 8: Fluorescenční in situ hybridizace sondy CL04 na pachytenním jádře ♀ běláška zelného (*P. brassicae*). Satelitní sonda na DAPI pozadí (a), podbarvení DAPI (b), satelitní sonda značená červeně (c). Měřítko = 10 μ m.

Programem Repeat Explorer byl CL26 detekován u samice v 0,51 % a u samce v 0,35 % genomu. Tyto rozdíly v zastoupení mezi pohlavími indikovaly výskyt tohoto satelitu jak na autozomech, tak také na chromozomu W. FISH prokázala, že se tento satelit vyskytuje nejen v autosomálním heterochromatinu ale i v heterochromatinu chromozomu W (Obrázek 9).



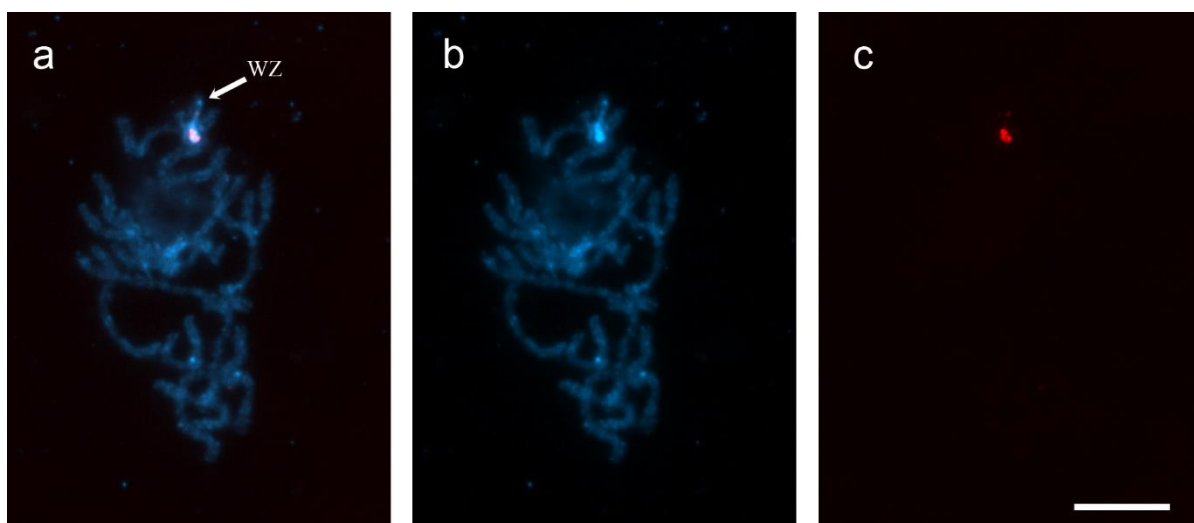
Obrázek 9: Fluorescenční in situ hybridizace sondy CL26 na pachytenním jádře ♀ běláška zelného (*P. brassicae*). Satelitní sonda na DAPI pozadí (a), podbarvení DAPI (b), satelitní sonda značená červeně (c). Měřítko = 10F μm .

Satelit CL183 byl detekován v genomu samice v 0,30 % a v genomu samce v 0,34 %. Toto uspořádání se by indikovalo přítomnost satelitu na chromozomu Z, což výsledky FISH nepotvrdili. Sonda hybridizovala pouze do malého heterochromatinového bloku autosomálního bivalentu, čímž vytvořila dvojtečku (viz Obrázek 10). Tento rozdíl v procentuálním zastoupení satelitu mohl být způsoben náhodným výběrem sekvencí pro analýzu, protože u takto vzácného satelitu se projeví i nepatrné vychýlení, nebo pouze faktem, že přímá FISH nedokázala satelit na chromozomu Z detekovat.



Obrázek 10: Fluorescenční in situ hybridizace sondy CL183 na pachytenním jádře ♀ běláška zelného (*P. brassicae*). Satelitní sonda na DAPI pozadí (a), podbarvení DAPI (b), satelitní sonda značená červeně (c). Měřítko = 10 μ m

Analýza detekovala satelit CL187 pouze v genomu samice, ve kterém zaujímal 0,040 %. Bylo tedy předpokládáno, že se jedná o satelit unikátní pro samičí genom, což bylo potvrzeno, hybridizací sondy do heterochromatinového bloku chromozomu W (viz Obrázek 11).



Obrázek 11: Fluorescenční in situ hybridizace sondy CL187 na pachytenním jádře ♀ běláška řepkového (*P. napi*). Satelitní sonda na DAPI pozadí (a), podbarvení DAPI (b), satelitní sonda značená červeně (c). Měřítko = 10 μ m.

Tabulka 8: Souhrnná tabulka satelitů. Odhad byl převzat z výstupu analýz jednotlivých pohlaví příslušného druhu provedených v programu Repeat Explorer 2. Analýzy byly provedeny na 500 000 sekvencí.

Název	Druh	Odhad % zastoupení v genomu	Výskyt u zbývajících druhů		Místo FISH hybridizace	Délka monomeru
			Podle RE	Podle PCR		
CL04	Bělásek zelný	1,1 % u obou pohlaví	U běláška řepkového	U běláška řepového	Více míst v heterochromatinu na autozomech	109 bp
CL26	Bělásek zelný	0,51 % u samice a 0,35 % u samce	Ne	U běláška řepkového i běláška řepového	Chromozom W	147 bp
CL183	Bělásek zelný	0,030 % u samice a 0,034 % u samce	U běláška řepkového	U běláška řepkového i běláška řepového	Jeden lokus v heterochromatinu autozomu	235 bp
CL187	Bělásek řepkový	0,043 % u samice, u samce nedetekováno	U běláška zelného	U běláška zelného	Chromozom W	172 bp

5. Diskuze

5.1. Chromozom W je u zkoumaných bělásků snadno identifikovatelný a mezi druhy se výrazně liší

Chromozomy W často degenerují a neobsahují téměř žádné geny, což způsobilo, že se mohou libovolně vyvíjet a u mnoha druhů se liší na první pohled jak velikostí, tak i množstvím heterochromatinu (Traut et al., 2013; Sahara, Yoshido, Traut, 2012). Toto platí i u mnou zkoumaných bělásků, jejichž chromozomy W jsou díky množství heterochromatinu dobře odlišitelné od autozomů již po obarvení DAPI. U každého ze zkoumaných druhů je chromozom W jinak velký a liší se mezi sebou i množstvím heterochromatinu. Pro získání dalších informací o složení chromozomů W jsem použila CGH, která ukázala, že se na zkoumaných pohlavních chromozomech vyskytují jak sekvence společné pro obě pohlaví, tak unikátní či obohacené W sekvence.

Podbarvení DAPI i CGH ukázala, že chromozomy W se mezi druhy liší velikostí, tvarem, ale i množstvím W – unikátních/obohacených sekvencí. U běláška zelného se tyto sekvence vyskytují především ve středu chromozomu W, kde samičí sonda hybridizovala s větší intenzitou než samčí. Stejně tak s velkou intenzitou označila samičí sonda heterochromatinový blok na chromozomu W běláška řepového. U běláška řepkového na chromozom W hybridizovala hlavně sonda samičí, tudíž se u tohoto druhu W – unikátní/obohacené sekvence vyskytují ve velkém množství. Podobné hybridizace byly pozorovány např. u minovníčka dubového (*Tischeria ekebladella*), skvrnopásníka angreštového (*Abraxas grossulariata*) a skvrnopásníka jilmového (*A. sylvata*), u kterých samičí sonda při CGH silně označila chromozom W, zatímco sonda samčí hybridizovala velmi slabě (Dalíková et al., 2017a; Zrzavá et al., 2018).

Rozdíly v distribuci unikátních/obohacených sekvencí na W lze nalézt ale i u jiných příbuzných druhů. V práci z roku 2007 bylo zjištěno rozdíly v rozložení sekvencí na chromozomu W mezi zavíječi. Pomocí CGH bylo zjištěno, že zavíječ čokoládový (*Cadra cautella*) má chromozom W tvořen výhradně repeticemi univerzálními pro obě pohlaví, zatímco zavíječ moučný (*Ephesia kuehniella*) má sekvence univerzální a unikátní/obohacené na W rozprostřeny rovnoměrně po celé délce chromozomu. Zavíječ paprikový (*Plodia interpunctella*) a zavíječ voskový (*Galleria mellonella*) mají chromozom W rozdělený na části, složené ze sekvencí univerzálních a částí se sekvencí unikátních/obohacených na W.

Výjimečnost této práce spočívá v kombinaci přístupu CGH s analýzou genomů jednotlivých druhů. Dosud byly závěry ze CGH pouhými domněnkami o tom, jaké sekvence se na chromozomu W nacházejí, ale nyní lze data ze CGH propojit s výsledky hybridizací konkrétních satelitních sekvencí. Tak se např. ukázalo, že u běláška řepkového je chromozom W, který samičí sonda značila výrazně silněji, což indikuje přítomnost sekvencí unikátních nebo obohacených na W, značen velmi silně satelitní DNA CL187, která se jinde v genomu buď nevyskytuje, nebo její přítomnost nebyla jinde pomocí FISH s přímo značenou sondou detekována. Satelit CL26, který hybridizuje do terminálního bloku heterochromatinu chromozomu W běláška zelného, se naopak vyskytuje i jinde v genomu, což je v souladu s hybridizací celogenomových sond při CGH, které toto místo značí s podobnou intenzitou, což je znakem pro přítomnost sekvencí společných pro obě pohlaví.

5.2. Satelitní sekvence na chromozomu W

Jak už bylo zmíněno výše, chromozom W je u většiny druhů místem s největším výskytem heterochromatinu. Právě heterochromatinové bloky jsou často místem výskytu tandemových repetit (Verma, 1988). U motýlů je přítomnost velkých heterochromatinových bloků nezvyklá a často jediným místem výskytu těchto bloků je chromozom W. Dosud byly tyto bloky pozorovány pouze u skvrnopásníka angreštového (*A. grossulariata*) (Zrzavá et al., 2018), *Leptidea amurensis* (Šíchová et al., 2016), běláška lučního (*Leptidea juvernica*), běláška hrachorového (*Leptidea sinapis*), běláška Realova (*Leptidea reali*) (Šíchová et al., 2016) u zkoumaného běláška zelného (*P. brassicae*) (Nguyen et al., 2009) a jeden blok byl nalezen na chromozomu 24 u bource morušového (*Bombyx mori*) (Yoshido et al., 2005). Tato vzácnost heterochromatinových bloků v genomu by mohla částečně vysvětlovat, proč bylo dosud nalezeno tak málo satelitních sekvencí. Dalším důvodem může být to, že získávání sekvencí satelitů bylo dříve (bez použití sekvenování) velmi náročné (Palomeque, Lorite, 2008). V dnešní době je situace jednodušší, protože sekvenování nové generace je finančně dostupnější a je k dispozici program Repeat Explorer pro vyhledávání a analýzu repetit, takže se dá v dohledné době očekávat popis nových satelitních sekvencí u dalších druhů motýlů.

Přestože satelitní sekvence a mobilní elementy jsou hlavními komponenty heterochromatinu, jsou pouze pět satelitů (MBSAT1, FR, PiSAT1, BA-CA16 a satelit předivky brslenové) vyskytujících se na chromozomu W u denních či nočních motýlů (Mandrioli et al., 2003; Lu et al., 1994; Dalíková et al., 2017b; van't Hof et al., 2005; Pilíková,

2019). U některých řádů hmyzu byly také nalezeny satelity na pohlavních chromozomech. Například ucvrčka *Eneoptera surinamensis* bylo nalezeno 45 satelitních rodin, které dohromady zabíraly přibližně 14 % samčího genomu, kde byl počet satelitních sekvencí až 10x větší než u samice. FISH na tomto druhu ukázala 39 satelitů lokalizovaných na chromozomu neo-Y, což je zatím nejvyšší uvedená diverzita satDNA na pohlavních chromozomech (Palacios-Gimenéz et al., 2017). V genomu sarančete *Ronderosia bergii*, patřícího také mezi rovnokřídlé bylo nalezeno deset satelitních rodin, přičemž čtyři z nalezených satelitů byly lokalizovány na chromozomu neo-Y, z nichž dva jsou pro tento chromozom unikátní (Palacios-Gimenéz et al., 2018).

To, že se zástupci jednoho rodu bělásků mezi sebou zásadně liší obsahem satelitní DNA, ale není nic zvláštního, protože i jedinci různých populací stejného druhu se mohou v tomto ohledu dramaticky lišit. Například u *Triatoma infestans* bylo zjištěno, že 33 % genomu zabírají satelity u andské populace, ale jen 25 % u neandské populace (Pita et al., 2017). U tohoto druhu jsou tedy satelitní sekvence významnou součástí genomu, ale různé procentuální zastoupení ukazuje, jak dynamický vývoj heterochromatinu může být. Další ukázkou dynamiky satelitních sekvencí je blýskavka kukuřičná (*S. frugiperda*), která se vyskytuje ve dvou rasách. Zatímco rasa konzumující rýži nese ve svém genomu satelit FR, rase živící se kukuřicí tento satelit chybí (Lu et al., 1994).

V této práci byly na chromozomech lokalizované čtyři nové satelitní sekvence, přičemž dvě z nich se nachází na chromozomu W. Jsou to CL26 u běláška zelného (*P. brassicae*), který se kromě velkého heterochromatinového bloku nachází i v několika autosomálních blocích, a CL187 u běláška řepkového (*P. napi*), který tvoří zásadní složku chromozomu W u tohoto druhu a jinde v genomu se patrně nenachází. Narozdíl od dříve publikovaných dat ze sekvenování chromozomu W, ve kterých byly nalezeny převážně mobilní elementy, se u běláška zelného a běláška řepkového nacházejí ve velké míře satelitní sekvence. Výskyt mobilních elementů je taktéž pravděpodobný, ale zatím nebyl předmětem zkoumání. FISH se satelitními sondami rovněž potvrdila známý fakt, že heterochromatin obsahuje repetitivní DNA, protože ve všech případech sonda hybridizovala do heterochromatinových bloků.

5.3. Výskyt satelitních sekvencí napříč zkoumanými druhy

Satelit CL26 byl programem Repeat Explorer nalezen jen u jednoho druhu běláška (bělásek zelný), zatímco satelity CL04, CL183 a CL187 byly nalezeny u běláška zelného a běláška řepkového. Metoda PCR však našla satelity CL26 a CL183 u všech zkoumaných druhů. Výsledky Repeat Exploreru a PCR se shodují u satelitu CL187, zatímco satelit CL04 byl PCR metodou nalezen u běláška řepového, ale nepotvrdil jeho přítomnost u běláška řepkového. Tyto rozdíly jsou způsobeny tím, že Repeat Explorer analyzuje pouze omezený vzorek genomu, tudíž metoda PCR je citlivější.

Podle fylogenetického stromu ze studie z roku 2019 na běláscích rodu *Pieris* se z linie nejprve oddělil předek běláška řepového, zatímco bělásek zelný a bělásek řepkový se oddělili až později (Okamura et al., 2019). Pokud tedy vezmeme v úvahu tento fylogenetický strom, lze spekulovat o tom, že satelit CL04 vznikl u společného předka těchto druhů a následně zanikl v genomu běláška řepkového a pravděpodobně expandoval v genomu běláška zelného. Satelit CL26 je přítomný u všech zkoumaných druhů, tudíž nejspíše také vznikl u společného předka, ale v genomu běláška zelného expandoval, či se u ostatních druhů redukoval. U společného předka vznikl nejspíše i satelit CL183, který se u všech zkoumaných druhů také vyskytuje, nicméně i u běláška zelného, u kterého se vyskytuje nejhojněji, zaujímá pouze velmi malé procento genomu. Satelit CL187 se nevyskytuje v genomu běláška řepového, tudíž mohl vzniknout až po oddělení tohoto druhu, je ovšem možné, že se původně v genomu tohoto druhu vyskytoval a postupem času vymizel. Fylogenetický strom, ze kterého vychází předchozí úvahy však není kompletní a neobsahuje data všech zástupců rodu *Pieris*, tudíž můžeme pouze spekulovat o tom, jakými procesy tyto satelity procházely během evoluce.

Další postup:

a) Zaklonování satelitů

Zaklonování satelitů bylo z časových důvodů v této práci vynecháno, ale bude provedeno v budoucnosti, protože zaklonováním přečištěných produktů PCR do vektoru je zaručena práce pouze s jedinou konkrétní sekvencí satelitu. V této práci byla identita PCR produktu ověřena pouze sekvenováním bez klonování.

b) Analýza mikrosatelitní DNA

Mikrosatelity do mé analýzy nebyly zařazeny, protože Repeat Explorer je při analýze záměrně vynechává, ale i přesto mohou tvořit významnou složku heterochromatinu. Pro jejich analýzu bude použit program Tandem Repeats Finder (Nucleic Acids Research, 1999) Navržením primerů na mikrosatelity a následnou PCR a FISH lze zjistit rozmístění dalších repetitivních sekvencí v genomu bělásků, popřípadě odhalit mikrosatelity nacházející se na pohlavním chromozomu W.

c) PCR satelitů získaných analýzou jednotlivých druhů

Analýzami jednotlivých druhů programem Repeat Explorer byly získány i satelity, které v analýze kombinující všechny tři druhy nebyly nalezeny. Bylo nalezeno šest satelitů u běláška zelného, šest satelitů u běláška řepkového a jeden u běláška řepového. O tyto satelity bude rozšířena navazující studie.

d) FISH zkoumaných satelitů na zbylé dva druhy bělásků

Z výsledků PCR a Repeat Exploreru víme, že se některé satelity vyskytují v menší míře i v genomu jednoho či obou zbývajících druhů. Pomocí FISH můžeme zjistit, zda se vyskytují na podobných místech. Toto nás zajímá především u satelitů vyskytujících se na chromozomu W.

e) Mezidruhovú hybridizace malovacích sond získaných mikrodisekcí chromozomu W

Rozdíly ve složení chromozomů W lze odhalit například pomocí mezidruhovú hybridizace, jako to bylo provedeno mezi zavíječi (Vítková et al., 2007) či skvrnopásníky (Zrzavá et al., 2018). Tato metoda přináší snadný způsob, kterým lze zjistit jak moc a zda vůbec jsou si chromozomy W mezi druhy podobné.

6. Závěr

Bělásci jsou vzhledem k variabilnímu počtu chromozomů zajímavou skupinou ke studování, protože se jejich genom dynamicky mění. V této práci jsem se zabývala studiem tří druhů bělásků, konkrétně běláška zelného (*P. brassicae*), běláška řepkového (*P. napi*) a běláška řepového (*P. rapae*). Analyzovala jsem přítomnost chromozomu W u jednotlivých druhů, jeho podobnost mezi jednotlivými druhy a přítomnost satelitních sekvencí.

Přítomnost chromozomu W v genomu všech tří druhů bělásků byla potvrzena, zároveň pozorování pod podbarvením DAPI odhalilo zásadní rozdíly ve velikosti a tvaru těchto chromozomů u jednotlivých druhů. Sekvence unikátní nebo obohacené na W byly pozorovány na chromozomu W u všech druhů bělásků, ale u každého v jiném množství. Díky těmto zásadním rozdílům lze jen podle vzhledu chromozomu W od sebe tyto tři druhy bělásků odlišit.

Heterochromatinové bloky jsou tvořeny především repetitivními sekvencemi, což se i v této práci potvrdilo. V autosomálních blocích heterochromatinu běláška zelného byla zjištěna přítomnost dvou satelitních sekvencí (CL04 a CL183) a v heterochromatinu chromozomu W tohoto druhu běláška byl objeven satelit CL26. Chromozom W běláška řepkového je tvořen masivním blokem heterochromatinu, a i v něm byla nalezena přítomnost satelitu CL187.

Řád Lepidoptera představuje nejpočetnější skupinu živočichů, jejichž samice jsou heterogametické, přesto však informací o složení chromozomu W není mnoho. Tato práce přináší další poznatky k našim dosavadním znalostem o tomto chromozomu. Zároveň jako první zkoumá výskyt satelitních sekvencí nejen na pohlavním chromozomu W, ale i na autozomech u bělásků rodu *Pieris*.

7. Použité zdroje

Abe H., Sugasaki T., Terada T. et al. 2002 “Nested retrotransposons on the W chromosome of the wild silkworm *Bombyx mandarina*.” *Insect Molecular Biology* 11: 307-314

Abe H., Mita K., Yasukochi Y., Oshiki T., Shimada T. 2005 “Retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*.” *Cytogenet Genome Res* 110: 144-151

Abe H., Fujii T., Shimada T. 2010. “Sex chromosomes and sex determination in *Bombyx mori*.” In: Goldsmith MR, Marec F (eds) “Molecular biology and genetics of the Lepidoptera.” CRC, Boca Raton, 65–87

Bachtrog D. 2006. “A Dynamic View of Sex Chromosome Evolution.” *Current Opinion in Genetics and Development* 16 (6): 578–85.

Beliajeff N. K. 1930 “Die Chromosomenkomplexe und ihre Beziehung zur Phylogenie bei den Lepidopteren.” *Z. Ind. Abst. Vererbgs. l.* 54: 369-399

Bigger T. R. L. 1960 “Chromosome numbers of Lepidoptera.” Part I. *Ent. Gaz.* 11: 149-152

Bull J.J. 1983 “Evolution of Sex Determining Mechanisms.” *Benjamin/Cummings: Menlo Park, CA.*

Bush G.L. 1966 “Female heterogamety in the family Tephritidae (Acalyptratae, Diptera).” *The American Naturalist* 100: 119–126

Charlesworth B, Charlesworth D. 1978. “A model for the evolution of dioecy and gynodioecy.” *The American Naturalist* 112: 975–997.

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

Charlesworth D., Charlesworth B., Marais G. 2005. “Steps in the Evolution of Heteromorphic Sex Chromosomes.” *Heredity* 95 (2): 118–28.

Dalíková M., Zrzavá M., Hladová I., Nguyen P., Šonský I., Flegrová, M., Kubíčková S., Voleníková A., Kawahara A. Y., Peters R. S., Marec F. 2017a “New Insights into the Evolution of the W Chromosome in Lepidoptera.” *Journal of Heredity* 108 (7): 709–719

Dalíková M., Zrzavá M., Kubíčková S., Marec F. 2017b “W-enriched satellite sequence in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae).” *Chromosome Research* 25: 241–252

- Devlin R. H., Stone G. W., Smailus D. E. 1998 “Extensive direct tandem organization of a long repeat DNA sequence on the Y chromosome of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*).“ *Journal of Molecular Evolution* 46: 277-287
- Dimitri P., Corradini N., Rossi F., Verni F. 2005 “The paradox of functional heterochromatin.“ *Bioessays* 27: 29–41
- Doncaster, L. 1912 “The chromosomes in the oogenesis and spermatogenesis of *Pieris brassicae*, and in the oogenesis of *Abraxas grossulariata*.“ *Journal of Genetics* 2, 189–200
- Eitschberger U. 1984 “Systematische Untersuchungen am *Pieris napi*-bryoniae Komplex (s.l.) (Lepidoptera, Pieridae).“ *Herbipoliana* 1, 1–504
- Federley H. 2010 “Chromosomenzahlen finnländischer Lepidopteren I. Rhopalocera.“ *Hereditas* 24 397–464
- Fuková I., Traut W., Vítková M., Nguyen P., Kubíčková S., Marec F. et al. 2007 “Probing the W chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin.“ *Chromosoma* 116: m135–145
- Gu L., Walters R. J., Knipple C. D., 2017 “Conserved Patterns of Sex Chromosome Dosage Compensation in the Lepidoptera (WZ/ZZ): Insights from a Moth Neo-Z Chromosome.“ *Genome Biology and Evolution*, Volume 9, Issue 3, March 2017: 802–816
- Kato A., Albert P., Vega J., Birchler J. 2006. “Sensitive fluorescence in situ hybridization signal detection in maize using directly labeled probes produced by high concentration DNA polymerase nick translation.“ *Biotech Histochem* 81: 71-78
- Kaiser V. B., Bachtrog D. 2010 “Evolution of sex chromosomes in insects.“ *Annual Review of Genetics* 44: 91–112
- Kiuchi T., Koga H., Kawamoto M., Shoji K., Sakai H., Arai Y., Ishihara G., et al. 2014. “A Single Female-Specific PiRNA Is the Primary Determiner of Sex in the Silkworm.“ *Nature* 509 (7502): 633–36.
- Kono T., Watanabe M., Koyama K., Kishimoto T., Fukushima S., Sugimura T., Wakabayashi K. 1999 “Cytotoxic activity of pierisin, from the cabbage butterfly, *Pieris rapae*, in various human cancer cell lines.“ *Cancer Lett.* 137(1): 75–81
- Lorkovic Z. 1941 “Die Chromosomenzahlen in der Spermatogenese der Tagfalter.“ *Chromosoma* 2: 155-191
- Lu Y. J., Kochert G. D., Isenhour D.J., Adang M.J. 1994 “Molecular characterization of a strain-specific repeated DNA sequence in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae).“ *Insect Molecular Biology* 3: 123–130

Lukhtanov V. A. 2000. "Sex Chromatin and Sex Chromosome Systems in Nonditrysian Lepidoptera (Insecta)." *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 38 (2): 73–79.

Maeki K., Remington L. C. 1960 "Studies of the chromosomes of North American Rhopalocera. 2. Hesperioide, Megathymidae and Pieridae." *Journal of Lepid. Soc.* 14: 37-57

Mahendran B., Acharya C., Dash R., Ghosh S.K., Kundu S.C. 2006 "Repetitive DNA in tropical tasar silkworm *Antheraea mylitta*." *Gene* 370 :51–57

Mandrioli M., Manicardi G. C., Marec F. 2003 "Cytogenetic and molecular characterization of the MBSAT1 satellite DNA in holokinetic chromosomes of the cabbage moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera)." *Chromosome Research* 11: 51-56

Marec F. 1996 "Synaptonemal complexes in insects." *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 25: 205-233

Marec F., Sahara K., Traut W. 2010. "Rise and fall of the W chromosome in Lepidoptera." In: Goldsmith M.R., Marec F. "Molecular biology and genetics of the Lepidoptera." *Boca Raton* 49–63

Nallu S., Hill J. A., Don K., Sahagun C., Zhang W., Meslin C., Snell-Rood E., Clark N. L., Morehouse N. I., Bergelson J., Wheat C. W., Kronforst M. R., 2018 "The molecular genetic basis of herbivory between butterflies and their host plants." *Nature Ecology and Evolution* 2, 1418–1427

Nanda I., Schlegelmilch K., Haaf T., Schartl M., Schmid M. 2008. "Synteny conservation of the Z chromosome in 14 avian species (11 families) supports a role for Z dosage in avian sex determination." *Cytogenet Genome Research* 122: 150–156

Nguyen P., Sahara K., Yoshido A., Marec F. 2009 "Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera)." *Genetica*, 138(3), 343–354

Novak, P., Neumann, P., Pech, J., Steinhaisl, J., Macas, J. 2013 "RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next generation sequence reads." *Bioinformatics* 29: 792-793.

Nucleic Acids Research 1999 January 15; 27(2): 573-580

Ohno M., Fujimoto T., Naito Y., Jouraku A., Yasukochi Z., Sahara K. 2020 "BAC selection of the large white butterfly, *Pieris brassicae* (Lepidoptera: Pieridae) containing orthologs of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae)." *Applied Entomology and Zoology* 55, 159–174

Okamura Y., Sato A., Tsuzuki N., Murakami M., Heidel-Fischer H., Vogel H. 2019 “Molecular signatures of selection associated with host plant differences in *Pieris* butterflies.“ *Molecular Ecology*

Palacios-Gimenez, O.M., Dias, G.B., de Lima, L.G., Silva Kuhn G. C., Ramos É., Martins C., Cabral-de-Mello D. C. 2017 “High-throughput analysis of the satellitome revealed enormous diversity of satellite DNAs in the neo-Y chromosome of the cricket *Eneoptera surinamensis*.“ *Scientific Reports* 7, 6422

Palacios-Gimenez O. M., Milani D., Lemos B., Castillo E. R., Martí D. A., Ramos E., Martins C., Cabral-de-Mello D. C. 2018 “Uncovering the evolutionary history of neo-XY sex chromosomes in the grasshopper *Ronderosia bergii* (Orthoptera, Melanoplinae) through satellite DNA analysis.“ *BMC evolutionary biology* 18 (1), 2

Palomeque T., Lorite P. 2008 “Satellite DNA in insects-a review. *Heredity* 100, 564–573

Pilíková A. 2019 “Analýza vybraných W obohacených repetíc u předivky brslenové *Yponomeuta cagnagella* (Lepidoptera).“ *Bc. Thesis, in Czech* – 54 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Pita S., Panzera F., Mora P., Vela J., Cuadrado Á., Sánchez A., Palomeque T., Lorite P. 2017 “Comparative repeatome analysis on *Triatoma infestans* Andean and Non-Andean lineages, main vector of Chagas disease.“ *PLOS one* 12 (7)

Plohl M., Meštrović N., Mravinac, B. 2012 “Satellite DNA evolution.“ *Genome Dynamics* 7, 126–152

Rasmussen S.W. 1976. “The meiotic prophase of *Bombyx mori* analyzed by three-dimensional reconstructions of synaptonemal complexes.“ *Chromosoma* 42: 245–293

Rasmussen S.W. 1977. “The transformation of the synaptonemal complex into the ‘elimination chromatin’ in *Bombyx mori* oocytes.“ *Chromosoma* 60: 205–221

Rat Genome Sequencing Project Consortium 2004. “Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution.“ *Nature* 2004(428): 493–521.

Rice W. R. 1984. “Sex chromosomes and the evolution of sexual dimorphism.“ *Evolution: International Journal of Organic Evolution* 1984, 38: 735-742.

Ris H., Kleinfeld R. 1952. “Cytochemical studies on the chromatin elimination in *Solenobia* (Lepidoptera).“ *Chromosoma* 5: 363–371

Robinson R. 1971 “Lepidoptera Genetics.“ *Pergamon Press*, Oxford

Sahara K., Marec F., Traut W. 1999. “TTAGG telomere repeats in chromosomes of some insects and other arthropods.“ *Chromosome Research* 7: 449-460.

- Sahara K., Marec F., Eickhoff U., Traut W. 2003. "Moth sex chromatin probed by comparative genomic hybridization (CGH)." *Genome* 46:339–342
- Sahara K., Yoshido A., Traut W. 2012. "Sex Chromosome Evolution in Moths and Butterflies." *Chromosome Research* 20 (1): 83–94.
- Scudder S. H. 1887 "The introduction and spread of *Pieris rapae* in North America, 1860-1885. Boston, 53–69
- Shen J., Cong Q., Kinch L. N., Borek D., Otwinowski Z., Grishin, N. V. 2016 "Complete genome of *Pieris rapae*, a resilient alien, a cabbage pest, and a source of anti-cancer proteins." *F1000Research*, Vol. 5, 2631
- Skaletsky H., Kuroda-Kawaguchi T., Minx P.J. et al. 2003 "The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes." *Nature* 423: 825-837
- Smith C.A., Roeszler K.N., Ohnesorg T., Cummins D.M., Farlie P.G., Doran T.J., Sinclair A.H. 2009. "The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken." *Nature* 461:267–271
- Šíchová J., Nguyen P., Daliková M., Marec F. 2013 "Chromosomal Evolution in Tortricid Moths: Conserved Karyotypes with Diverged Features." *PLOS ONE* 8 (5): 23–28
- Šíchová J., Voleníková A., Dincă V., Nguyen P., Vila R., Sahara K., Marec F. 2015 "Dynamic karyotype evolution and unique sex determination systems in *Leptidea* wood white butterflies." *BMC Evolutionary Biology*, 15(1)
- Šíchová J., Ohno M., Dincă V., Watanabe M., Sahara K., Marec, F. 2016 "Fissions, fusions, and translocations shaped the karyotype and multiple sex chromosome constitution of the northeast-Asian wood white butterfly, *Leptidea amurensis*." *Biological Journal of the Linnean Society*, 118 (3), 457–471
- Tanaka S., Nishida T., Ohsaki N. 2007 "Sequential rapid adaptation of indigenous parasitoid wasps to the invasive butterfly *Pieris brassicae*." *Evolution* 61: 1791–1802
- Traut W. 1976 "Pachytene mapping in the female silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera)." *Chromosoma* 58:275–284
- Traut W., Marec, F. 1996. "Sex Chromatin in Lepidoptera." *Quarterly Review of Biology* 71 (2): 239–56
- Traut W., Marec F. 1997. "Sex chromosome differentiation in some species of Lepidoptera (Insecta)." *Chromosome Research* 5: 283–291
- Traut W., Sahara K., Otto T.D., Marec F. 1999. "Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization." *Chromosoma* 108: 173-180.

Traut W., Sahara K., a Marec F. 2008. "Sex Chromosomes and Sex Determination in Lepidoptera." *Sexual Development* 1 (6): 332–46.

Traut W, Vogel H, Glöckner G, et al. 2013. "High-throughput sequencing of a single chromosome: a moth W chromosome." *Chromosome Research* 110:491–505.

Ugarkovic D. 2005 "Functional elements residing within satellite DNAs." *EMBO Reports* 6: 1035–1039

van't Hof A. E., Zwaan B. J., Saccheri I. J., Daly D., Bot A. N. M., Brakefield P. M. 2005 "Characterization of 28 microsatellite loci for the butterfly *Bicyclus anynana*." *Molecular Ecology Notes* 5: 169-172

Verma R. S. 1988 "Heterochromatin: Molecular and Structural Aspects." *New York: Cambridge University Press*, 301 s. ISBN 9780521334808

Věchtová P., Dalíková M., Sýkorová M., Žurovcová M., Füssy Z., Zrzavá M. 2016 "CpSAT-1, a transcribed satellite sequence from the codling moth, *Cydia pomonella*." *Genetica* 144: 385–395

Vítková M., Fuková I., Kubičková S., Marec F. 2007 "Molecular divergence of the W chromosomes in pyralid moths (Lepidoptera)." *Chromosome Research* 15:917–930

Voleníková A. 2015 "Analýza pohlavních chromosomů vybraných druhů bazálních motýlů z čeledi hrotnokřídlcovití (Lepidoptera: Hepialidae)." *Mgr. Thesis, in Czech*, 58 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Watanabe M., Kono T., Matsushima-Hibiya Y., Kanazawa T., Nishisaka N., Kishimoto T., Koyama K., Sugimura T., Wakabayashi K. 1999 "Molecular cloning of an apoptosis-inducing protein, pierisin, from cabbage butterfly: possible involvement of ADP-ribosylation in its activity." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(19): 10608–10613

Wittstock U., Agerbirk N., Stauber E.J., Olsen C. E., Hippler M., Mitchell-Olds T., Gershenzon J., Vogel H. 2004 "Successful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(14): 4859–4864

Wolf K. W. 1996. "The structure of condensed chromosomes in mitosis and meiosis of insects." *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 25: 37–62

Wolf K.W., Novák K., Marec F. 1997 "Kinetic organization of metaphase I bivalents in spermatogenesis of Lepidoptera and Trichoptera species with small chromosome numbers." *Heredity* 79:135–143

Wrench D.L., Kethley J.B., Norton R.A. 1994 "Cytogenetics of holokinetic chromosomes and inverted meiosis: keys to the evolutionary success of mites, with

generalization on eukaryotes.“ In: Houck MA (ed) *Mites: “Ecological and Evolutionary Analyses of Life-History Patterns.” Chapman & Hall, New York: 282-343*

Yoshido A., Bando H., Yasukochi Y., Sahara K. 2005 “The *Bombyx mori* karyotype and the assignment of linkage groups.“ *Genetics* 170: 675–685

Yoshido A., Yamada Y., Sahara K. 2006 “The W chromosome detection in several lepidopteran species by genomic in situ hybridization (GISH).“ *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* 75:147–151

Yoshido A, Marec F, Sahara K. 2016. “The fate of W chromosomes in hybrids between wild silkmths, *Samia cynthia* ssp.: no role in sex determination and reproduction.“ *Heredity* 116: 424–433

Zrzavá M., Hladová I., Dalíková M., Šíchová J., Ůunap E., Kubíčková S., Marec F. 2018 “Sex Chromosomes of the Iconic Moth *Abraxas grossulariata* (Lepidoptera, Geometridae) and Its Congener *A. sylvata*.“ *Genes*, 9 (6), 279