

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Analýza pohlavních chromosomů vybraných druhů
primitivních motýlů z čeledi hrotnokřídlecovití
(Lepidoptera: Hepialoidea)**

Diplomová práce

Anna Voleníková

Školitel: RNDr. Petr Nguyen, Ph.D.
Školitel specialista: Dr. Leonela Z. Carabajal Paladino

České Budějovice 2015

Voleníková A (2015) Analýza pohlavních chromosomů vybraných druhů bazálních motýlů z čeledi hrotnokřídlecovití (Lepidoptera: Hepialidae). [Karyotype and sex chromosomes analysis of two species from basal lepidopteran family Hepialidae (Lepidoptera: Hepialidae), Mgr. Thesis, in Czech.] 58 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Tato práce se zabývá evolucí karyotypu a pohlavních chromosomů motýlů (Lepidoptera), se zaměřením na vybrané druhy z primitivní skupiny hrotnokřídlecovití (Hepialidae). Prostřednictvím molekulárně-cytogenetických metod byla detailně prostudována genomová organizace dvou zástupců z této čeledě, hrotnokřídlece chmelového *Hepialus humuli* a amerického druhu hrotnokřídlece *Phymatopus californicus*. Získaná data přináší nový pohled na otázku evolučního vzniku pohlavního chromosomu W u celého řádu Lepidoptera.

Finanční podpora:

Tato práce byla financována z grantu Grantové agentury České republiky reg. č. 14-22765S.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené 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.

V Českých Budějovicích dne 14.12.2015

.....

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému multifunkčnímu školiteli Petru Nguyenovi za zadání mimořádně zajímavého tématu, které mě s každým dalším experimentem (který zpravidla končil výsledky které jsme opravdu neočekávali) bavilo víc a víc. Obrovský dík dále patří prof. Františku Marecovi, v jehož laboratoři mi bylo a stále je potěšením pracovat a celému bobřímu kolektivu – Martě, Mirce, Irenci, Leo, Jindře, Atsuovi, Magdě, Marušce, Honzíkovi, Ivanovi, malé Mirce, Ivušce a Sanderovi. Poděkovat bych chtěla také prof. Giorgio Valle z univerzity v Padově za nadšení pro bioinformatiku a genomiku, které předává svým studentům a díky němuž mé první krůčky v tomto oboru byly mnohem příjemnější, než jsem původně očekávala. Největší dík však patří mé rodině a přátelům, nejen za jejich neskutečnou pomoc a podporu, které si upřímně vážím, ale především za to jací jsou a že zůstávají mou největší inspirací.

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1 Karyotyp motýlů a jeho specifika	1
1.1.1 Chromosomy motýlů.....	1
1.1.2 Počet chromosomů	2
1.1.3 Evoluce karyotypu.....	3
1.2 Určení pohlaví u motýlů.....	5
1.2.1 Chromosomální určení typu <i>Abraaxas</i>	5
1.2.2 Pohlavní chromosom Z	6
1.2.3 Pohlavní chromosom W	7
2. Cíle práce	12
3. Materiál a metody	13
3.1 Použitý hmyz.....	13
3.2 Příprava preparátů	13
3.2.1 Příprava preparátů pohlavně specifického chromatinu	13
3.2.2 Příprava preparátů pro karyotypovou analýzu	14
3.3 Izolace nukleových kyselin	14
3.3.1 Izolace genomové DNA	14
3.3.2 Izolace RNA a syntéza cDNA.....	15
3.4 Hybridizace <i>in situ</i>	16
3.4.1 Genomová <i>in situ</i> hybridizace a komparativní genomová hybridizace.....	16
3.4.2 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace s telomerickou sondou.....	17
3.5 Izolace sekvencí pohlavně vázaných genů hrotnokřídlece chmelového <i>Hepialus humuli</i>	18
3.5.1 Polymerázová řetězová reakce	18
3.5.2 Klonování	19
3.5.3 Sekvencování a zpracování sekvencí	19
3.6 Práce s transkriptem hrotnokřídlece <i>Phymatopus californicus</i>	19

3.6.1 Filtrování a úprava dat.....	19
3.6.2 <i>De novo</i> složení transkriptomu.....	20
3.6.3 Příprava databáze a vyhledání genů.....	20
3.7 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (RT-PCR).....	21
3.7.1 Navrhování primerů	21
3.7.2 Kvantitativní PCR (qPCR).....	22
4. Výsledky	24
4.1 Stanovení přítomnosti pohlavně specifického chromatinu a základní karyotypová analýza	24
4.2 Detekce chromosomu W pomocí hybridizace <i>in situ</i>	25
4.3 Izolace sekvencí genů ortologních k Z-vázaným genům u <i>B. mori</i>	26
4.4 Ověření vazby genů na chromosom Z hrotnokřídleců metodou kvantitativní PCR.....	27
5. Diskuze.....	29
5.1. Pohlavně specifický heterochromatin jako marker chromosomu W.....	29
5.2 Karyotyp a pohlavní chromosomy čeledi hrotnokřídlecovití (Hepialidae).....	30
5.4 Chromosom W a evoluce systému WZ.....	33
5.5 Perspektiva dalšího výzkumu.....	34
6. Literatura.....	36
7. Příloha	48

1. Úvod

Motýli (Lepidoptera) jsou, s více než 157 000 popsánymi druhy a dle odhadů až 350 000 dalších druhů, které stále ještě na popsání čekají, největší skupinou fytofágního hmyzu na Zemi (Kristensen a kol. 2007, Chapman 2009, van Nieukerken a kol. 2011). Spolu se svým sesterským řádem, chrostíky (Trichoptera), zároveň představují největší skupinu živočichů s chromosomálním určením pohlaví typu *Abaxas*, tedy heterogametickými samicemi (ZO nebo ZW) a homogametickými samci (ZZ) (Ellegren 2011). Ačkoliv je tento typ determinace pohlaví kromě motýlů přítomný také u ptáků, hadů, ryb a dalších druhů živočichů (Graves a Shetty 2001), jeho znalost je v porovnání s opačným typem určení pohlaví označovaným jako *Drosophila* (heterogametičtí samci (X0 nebo XY), homogametické samice (XX)) značně limitovaná. Motýli tak představují ideální modelovou skupinu pro výzkum pohlavních chromosomů, který může významně přispět k pochopení obecných principů jejich evoluce.

1.1 Karyotyp motýlů a jeho specifika

1.1.1 Chromosomy motýlů

Chromosomy motýlů jsou protikladem jejich druhové i morfologické rozmanitosti. Mitotický komplement se typicky skládá z velkého počtu malých chromosomů uniformního tvaru, které postrádají jakékoliv identifikační prvky, a tudíž se od sebe nedají rozlišit (De Prins a Saitoh 2003, Mediouni a kol. 2004). Identifikaci jednotlivých chromosomů dále ztěžuje fakt, že chromosomy motýlů jsou holokinetické, tj. postrádají centromeru (Wolf a kol. 1997), jejíž umístění v rámci chromosomu se standardně využívá jako jeden z hlavních určovacích markerů při sestavování karyogramu (Levan a kol. 1964, O'Connor 2008). Nevhodné pro motýlí chromosomy se ukázalo být i použití klasických proužkovacích technik, které na mitotických chromosomech neposkytují žádné rozlišení. Na meiotických bivalentech je sice možné rozeznat tzv. chromomerový vzor, ten lze ale použít k identifikaci pouze několika málo chromosomů (Bedo 1983, Traut 1976, Makee a kol. 2008). Cytogenetická analýza tak u motýlů po dlouhou dobu umožňovala pouze počítání chromosomů, identifikaci heterochromatinových oblastí pohlavních chromosomů a lokalizaci transkripčně aktivních organizátoru jadrka ("NOR") (Traut a Marec 1997, Fuková a kol. 2005).

Zlomovým okamžikem ve studiu motýlích chromosomů bylo bezesporu zavedení metody fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), která umožnila lokalizaci cílových sekvencí pomocí značených sond. Jako jedni z prvních ji u této skupiny použili Okazaki a kol. (1993) a Traut a kol. (1999) a, kteří pomocí fluorescenčně značených celogenomových sond na pachytenních jádrech identifikovali bivalent pohlavních chromosomů. Takzvaná komparativní genomová hybridizace (CGH), využívající kompetice sond připravených ze samčí a samičí genomové DNA a její jednodušší verze genomová *in situ* hybridizace (GISH), během níž je samičí sonda hybridizována v přítomnosti samčí kompetitorové DNA, se stala široce využívaným nástrojem pro studium molekulárně diferencovaných pohlavních chromosomů (Sahara a kol. 2003a, Yoshido 2006, Vítková a kol. 2007). Kromě toho umožnila takzvaná fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) i lokalizaci telomerických opakování v genomu motýlů (Sahara a kol. 1999, Frydrychová a kol. 2004), hybridizaci malovacích sond připravených laserovou mikrodisekcí z pohlavního chromosomu W nebo nadbytečných chromosomů B (Fuková a kol. 2007, Vítková a kol. 2007, Voleníková 2012), detekci genových klastrů ribosomální DNA a histonových genů ve výzkumu karyotypové dynamiky (Nguyen a kol. 2010, Šichová a kol. 2013) a v neposlední řadě hybridizaci sond připravených z fosmidů a bakteriálních umělých chromosomů (např. Sahara a kol. 2013), klíčovou pro studium syntenie a kolinearit motýlích genů. V současné době jsou již u motýlů zavedeny i modifikace této molekulárně cytogenetické metody, umožňující detekci unikátních sekvencí o délce kolem 1000 bp (Carabajal Paladino a kol. 2014).

1.1.2 Počet chromosomů

Počet chromosomů se u většiny druhů motýlů pohybuje v rozpětí 29-31 chromosomů na haploidní genom, nicméně může se výrazně lišit oběma směry (Robinson 1971, Kandul a kol. 2007, Saura a kol. 2013). Nejnižší počet chromosomů byly zatím popsány u neotropického motýla *Hypothesis thea* a amerického soumráčníka *Agathymus aryxna* ($n=5$) (De Prins a Saitoh 2003, Brown a kol. 2004), nejvyšší u modráška *Polyommatus atlantica* ($n=223-226$), který je rekordním nejen v rámci čeledi motýli, ale mezi živočichy celkově (de Lesse 1970, Lukhtanov 2015). Za ancestrální počet je u motýlů považován $n=31$ chromosomů, který byl původně odvozen z modálního karyotypu a srovnání se sesterskou skupinou chrostíci (Trichoptera), jejichž modální počet chromosomů je $n=30$ (Suomalainen 1966). Tuto hypotézu podporují také karyologické studie u primitivních druhů motýlů (Lukhtanov 2000) a nově i genetické a fyzické mapy a analýzy genomových dat, dle kterých

je tento karyotyp u motýlů starý minimálně 140 milionů let (Baxter a kol. 2011, Sahara a kol. 2013, Van't Hof a kol. 2013, You a kol. 2013, Ahola a kol. 2014).

Ačkoliv je genom motýlů evolučně vysoce konzervovaný, v některých odvozených skupinách může počet chromosomů značně kolísat jak mezi blízce příbuznými druhy, tak dokonce i uvnitř druhu. Tento fenomén byl popsán například u běláška hrachorového *Leptidea sinapis* (Pieridae), u něhož se počet chromosomů pohybuje od $n=28$ do $n=53$ v různých geografických populacích nebo dokonce celé čeledi pestrobárcovití (Riodinidae), kde u 117 zkoumaných poddruhů počet chromosomů kolísá v rozpětí mezi $n=9$ až $n=110$ (Lukhtanov 2000, Brown a kol. 2012). U bělásků rodu *Leptidea* byl také pozorován extrémní případ karyotypové variability, kdy byl počet chromosomů a lokalizace genomových markerů rozdílný dokonce mezi potomky jednotlivých samic (Šíchová a kol. 2015). Brown a kol. (2012) připisuje možný vznik této variability struktuře populací. Pokud jsou populace příliš malé, fragmentované a s omezenou migrací, může v nich docházet ke zvýšené míře příbuzenského křížení ("inbreeding") a tudíž rychlé fixaci nových chromosomálních variant. Ty poté mohou vést k reprodukční izolaci a speciaci těchto motýlů.

1.1.3 Evoluce karyotypu

Za klíčový mechanismus evoluce karyotypu u motýlů jsou považovány fúze a rozpady chromosomů, které mají za následek početní změny v karyotypu a jsou podpořeny holokinetickou povahou motýlích chromosomů. Ačkoliv motýli nemají chromosomy čistě holokinetického typu a kinetochor pokrývá pouze část jejich povrchu, funkčně se jako holokinetické chovají a během mitózy se sesterské chromatidy rozchází paralelní disjunkcí (Gasner a Klemetson 1974, Murakami a Imai 1974, Wolf a kol. 1997). Pokud dojde ke zlomu nebo fúzi v genomu s monocentrickými chromosomy, vznikají acentrické či polycentrické útvary, které nemohou správně segregovat a během dělení buňky jsou ztraceny, což má ve většině případů letální následky (McKlintock 1939). U chromosomů holokinetického typu však ke vzniku takových útvarů téměř nedochází a fragmenty jsou děděny stabilně (Nordenskiöld H 1963, LaChance a Degrugillier 1969, Marec a kol. 2001). Zlomy nebo fúze tedy nemají na buňku detrimentální vliv jako je tomu v případě monocentrických chromosomů, ale naopak umožňují rychlou evoluci karyotypu (shrnutí v Jankowska a kol. 2015).

Předpoklad, že karyotypová evoluce u motýlů probíhá ve velké míře prostřednictvím chromosomálních fúzí a rozpadů, podporují už rané cytogenetické studie. Jak bylo zmíněno

v Kap. 1.1.1, chromosomy motýlů postrádají výrazné morfologické znaky, které by umožňovaly identifikaci jednotlivých chromosomů. Následkem toho byl výzkum cytogenetiky u motýlů dlouhou dobu omezen na pouhé počítání chromosomů a jejich měření, detailní záznamy však napomohly k odhalení negativní korelace mezi počtem chromosomů v karyotypu a jejich velikostí (shrnuto v Lorković 1990). Suomalainen publikoval v letech 1963 a 1965 karyotypy celkem čtyřiceti druhů motýlů rodu *Cidaria* (Geometridae) s různými počty chromosomů, na nichž byl tento jev jasně prokázán. Měření a fotometrická analýza chromosomů dále naznačila, že nezávisle na počtu chromosomů, celkový objem DNA zůstává mezi příbuznými druhy srovnatelný, což zároveň snižuje pravděpodobnost alternativní teorie, že rozdíly v počtech chromosomů jsou důsledkem polyploidie (Suomalainen 1963, Suomalainen 1965, White 1973).

Nejzásadnější důkaz opakovaných chromosomálních rozpadů a fúzí v evoluci motýlích chromosomů však přinesly rozsáhlé studie syntenie genů. Osekvenování genomu a sestavení fyzické mapy modelového druhu bource morušového *Bombyx mori* (Bombycidae) otevřelo dveře do éry komparativní genomiky, která umožňuje detailní výzkum karyotypové evoluce. Vazebná analýza 72 ortologních lokusů tropické babočky *Heliconius melpomene* (Nymphalidae) jako první prokázala při srovnání s referenčním genomem *B. mori* vysokou míru zachované syntenie na všech zkoumaných chromosomech. Tato práce také umožnila identifikaci šesti chromosomálních fúzí, predikovaných na základě srovnání počtu chromosomů *B. mori* ($n=28$) a *H. melpomene* ($n=21$), ačkoliv k předpokládanému oddělení vývojových linií těchto dvou druhů došlo před více než 130 miliony let (Jiggins a kol. 2005, Yasukochi a kol. 2006, Pringle a kol. 2007). Zachovaná syntenie genů v rámci motýlích genomů byla následně potvrzena nezávislými experimenty i u dalších motýlů, například mapováním 462 párů ortologních markerů u okáče *Bicyclus anynana* (Nymphalidae) (Beldade a kol. 2009), sekvenováním genomové DNA u západníka polního *Plutella xylostella* (Plutellidae) (Baxter a kol. 2011), konstrukcí rozsáhlé vazebné mapy u drsnokřídlece březového *Biston betularia* (Geometridae) (Van't Hof a kol. 2013), hybridizací 100 fosmidových sond u můry zelené *Mamestra barassicae* (Noctuidae) a 146 sond připravených z bakteriálních umělých chromosomů u černopásky bavlníkové *Helicoverpa armigera* (Noctuidae) (Sahara a kol. 2013) nebo analýzou genomových dat u hnědásky kostkovaného *Melitaea cinxia* (Noctuidae) (Ahola a kol. 2014).

d'Alençon a kol. na základě dat získaných mapováním bakteriálních umělých chromosomů (BACs) v 15 homologních regionech u černopásky bavlníkové *Helicoverpa*

armigera (Noctuidae) a blýskavky kukuřičné *Spodoptera frugiperda* (Noctuidae) a porovnáním s genomem modelového druhu *Bombyx mori* provedla také odhad rychlosti evoluce genomu motýlů, která dle zjištěných dat odpovídá přibližně 2 přestavbám na milion bazí na milion let ("breakages/Mb/Mya", d'Alençon a kol. 2010). Tato hodnota je mnohem vyšší než například u octomilek rodu *Drosophila* (0,05-0,09 breakages/Mb/Mya) nebo háďátek rodu *Caenorhabditis* (0,4-1, resp. 0,5-0,7 breakages/Mb/Mya dle recentních dat), jejichž rychlost chromosomálních přestaveb byla až dosud považována za nejvyšší mezi eukaryoty (Ranz a kol. 2001, Coghlan a Wolfe 2002, Stein a kol. 2003, Wadsworth a kol. 2015). Rozpor mezi prokázanou konzervovaností motýlího genomu a uvedenou extrémně vysokou rychlostí genomové evoluce je pravděpodobně způsoben specifickými vlastnostmi motýlích chromosomů. Velká část přestaveb na holokinetických chromosomech totiž nemusí nutně vést ke změně syntenie, a proto je skutečná rychlost evoluce pravděpodobně nižší.

1.2 Určení pohlaví u motýlů

1.2.1 Chromosomální určení typu Abraxas

Jak již bylo zmíněno v úvodu, motýli mají pohlaví určené geneticky, s heterogametickými samicemi a homogametickými samci (Traut a Marec 1996). Tento systém determinace pohlaví v rámci hmyzu (Insecta) s motýly sdílí pouze jejich sesterská skupina chrostíci (Trichoptera), na základě čehož se předpokládá, že se vyvinul u jejich společného předka a jeho vznik je datován na dobu před více než 180 miliony let (Kristensen a Skalski 1999, Grimaldi a Engel 2005, Kaiser a Bachtrog 2010, Sahara a kol. 2012, Misov a kol. 2014).

Samčí pohlaví je u motýlů určeno typicky přítomností dvou pohlavních chromosomů Z, samičí chromosomální konstitucí Z0 nebo ZW a jejich numerickými variantami. Výskyt chromosomu W je charakteristický pro pokročilý taxon Ditrysia, který zahrnuje asi 98% všech žijících druhů motýlů, zatímco konstituce ZZ/Z0 byla popsána převážně u bazálních motýlích skupin a u všech dosud studovaných chrostíků a je považována za ancestrální stav (Traut a Marec 1996, Marec a Novák 1998, Lukhtanov 2000, Traut a kol. 2007). Navzdory tomuto předpokladu ji však můžeme nalézt i u některých druhů náležejícím k odvozeným skupinám, například u jarnice hladké *Orthosia gracilis* z čeledi Noctuidae nebo u jednoho poddruhu martináče pajasanového, *Samia cynthia ricini* z čeledi Saturnidae. V těchto případech však konstituce ZZ/Z0 vznikla evidentně *de novo*, a to druhotnou ztrátou zmíněného chromosomu W (Traut a Mosbacher 1968, Yoshido a kol. 2005).

Martináč pajasanový je zároveň příkladem druhu, u něhož byl popsán extrémně diverzifikovaný systém pohlavních chromosomů dokonce v rámci různých geografických populací. Yoshido a kol. (2011, 2013) studovali evoluční mechanismy vzniku těchto pohlavních chromosomů u čtyř poddruhů *S. cynthia*, konkrétně *S. cynthia ricini* (Vietnam), *S. cynthia walkeri* (Hokkaido, Japonsko), *S. cynthia subsp. indet.* (Honshu, Japonsko) a *S. cynthia prieri* (Honshu, Kyushu, Shikoku; Japonsko). Pomocí fyzického mapování genů a hybridizace celogenomových sond a W-specifické malovací sondy zjistili, že každý poddruh nese unikátní konstituci pohlavních chromosomů od ancestrálního stavu WZ/ZZ (*S. cynthia prieri*) přes nezávisle vzniklý Z/ZZ (*S. cynthia ricini*) až k neopohlavním systémům neo-Wneo-Z/neo-Zneo-Z (*S. cynthia walkeri*) a neo-WZ₁Z₂/Z₁Z₁Z₂Z₂ (*S. cynthia subsp. indet.*) vzniklým mnohonásobnými fúzemi. Podobné výsledky přinesla i práce Šíchová a kol. (2015), zaměřená na tři druhy bělásků rodu *Leptidea*, u nichž byl odhalen neobvyklý systém chromosomálního určení pohlaví W₁₋₃Z₁₋₄/Z₁₋₄Z₁₋₄ u druhu *L. juvernica*, W₁₋₃Z₁₋₃/Z₁₋₃Z₁₋₃ u druhu *L. sinapis* a W₁₋₄Z₁₋₄/Z₁₋₄Z₁₋₄ u *L. reali*. Autoři v obou případech připisují vznik těchto alternativních forem konstituce pohlavních chromosomů procesu speciace probíhajícího prostřednictvím chromosomálních přestaveb v souladu s mechanismy popsanými v Kap. 1.1.3.

1.2.2 Pohlavní chromosom Z

Tak jako autosomy je chromosom Z motýlů tvořen euchromatinem a obsahuje značné množství genů. Fyzické mapování a sestavení vazebných map u různých druhů motýlů odhalilo přítomnost konzervovaných syntenních bloků, ale zároveň i neočekávanou dynamiku přestaveb na tomto chromosomu, včetně prokázaných fúzí s autosomy (Yamamoto a kol. 2008, Yasukochi a kol. 2006, Nguyen 2013, Nguyen a kol. 2013, Van't Hof a kol. 2013 a další). Transpozice či translokace genů byly během evoluce chromosomu Z popsány například u okáče *Bicyclus anynana* (Nymphalidae), u něhož byla srovnáním s referenčním genomem *B. mori* odhalena lokalizace ortologu genu *peptidylprolylisomerázy* na chromosomu 4 místo chromosomu Z bource nebo u obaleče jablečného *Cydia pomonella* (Tortricidae), kde byla translokace z chromosomu Z na autosom prokázána u chromosomálního regionu s geny *mago* a *RpL10* (Beldade a kol. 2009, Nguyen a kol. 2013).

Analýzy Z-vázaných genů převážně na modelovém organismu *Bombyx mori* prokázaly jejich roli například v larválním vývoji, sexuálním chování, adaptaci na prostředí nebo vzniku reprodukční izolace (Sperling 1994, Presgraves 2002, Kroemer a kol. 2011,

Sahara a kol. 2012). Dle recentních studií je na chromosomu Z také lokalizovaný gen maskulinizér (*Masc*), který je jedním z klíčových genů v kaskádě určující vývoj pohlaví u *B. mori*. Pokud je v genomu přítomen chromosom W (pro detaily viz Kap. 1.2.3), messengerová RNA (mRNA) přepisovaná z genu *Masc* podléhá degradaci indukované z tohoto chromosomu a dochází k vývoji jedince samičího pohlaví. Pokud se v genomu chromosom W nevyskytuje, *Masc*-mRNA je translatována do proteinu, který spouští kaskádu vývoje v samce (Kiuchi a kol. 2014, shrnuto v Marec 2014). Ačkoliv byl tento mechanismus určení pohlaví prokázán i u sesterského druhu *Trilocha varians* (Bombycidae) (Lee et al. 2015), nejnovější výzkum u martináče pajasanového *Samia cynthia* ssp. z příbuzné čeledi Saturniidae naznačuje, nemusí být konzervován u všech motýlů s přítomným chromosomem W (Yoshido a kol. 2016).

Vzhledem k přítomnosti značného množství genů na chromosomu Z, který se v samčím genomu objevuje ve dvou kopiích, ale v samičím jen v jedné, je předmětem intenzivního studia u motýlů také otázka kompenzace genové dávky. Donedávna převažoval názor, že kompletní kompenzace genové dávky u organismů s chromosomálním určením pohlaví typu WZ/ZZ chybí (Mank 2013). Ačkoliv první práce zabývající se kompenzací genové dávky u motýlů tuto hypotézu podporovaly (Zha a kol. 2009, Harrison a kol. 2012), Walters a Hardcastle (2011) potvrdili existenci kompletního kompenzačního mechanismu u bource morušového, *B. mori* (Bombycoidea). Ke stejnému závěru vedly i výsledky práce Smith a kol. (2014) u blízce příbuzného lišaje tabákového, *Manduca sexta* (Bombycoidea). Zajímavé je, že v rozporu s těmito závěry následující práce u obaleče jablečného *C. pomonella* (Tortricioidea) (Gu 2015) a motýlů rodu *Heliconius* (Nymphalidae) (Walters a kol. 2015) přinesly důkaz pro pouze částečnou kompenzaci dávky genů. Dle Walters a kol. (2015) mají rozporuplné výsledky dvě možná vysvětlení. Buď je obecně u motýlů genová dávka kompenzována pouze částečně a u *P. interpunctella* byla ztracena, zatímco u zástupců nadčeledi Bombycoidea, *B. mori* a *M. sexta*, dovedena k úplnosti, nebo se mechanismus kompenzace vyvinul u motýlů opakovaně, jednou u společného předka a podruhé u motýlů čeledi Bombycoidea. Testování těchto hypotéz vyžaduje další výzkum reprezentativního vzorku motýlů, zahrnujícího i zástupce bazálních skupin.

1.2.3 Pohlavní chromosom W

Na rozdíl od chromosomu Z nenese chromosom W téměř žádné geny a u většiny motýlů je tvořen heterochromatinem (Marec a kol. 2010). Dle klasického modelu vznikají

diferencované pohlavní chromosomy z páru autosomů poté, co jeden z partneru získá faktor určující pohlaví. Postupně na tomto chromosomu dochází k akumulaci dalších sexuálně antagonistických genů, což vede k zablokování rekombinace s jeho původním partnerem, které se z původního lokusu šíří na zbytek chromosomu. Absence rekombinace pak vede na pohlavně specifickém chromosomu (Y nebo W) ke hromadění mutací a postupné degeneraci jeho genetického obsahu. Kromě fixace negativních mutací v této degeneraci hraje významnou roli i například proces evolučního svezení ("genetic hitchhiking"), kdy dochází k fixaci nevýhodných alel následkem jejich těsné vazby s alelou výhodnou, mechanismus zvaný Müllerova rohatka spočívající v náhodné ztrátě chromosomu s nejnižším množstvím mutací nebo selekce na pozadí, umožňující fixaci alely pouze v případě, že se nenachází ve vazbě s alelou více nevýhodnou než je ona sama výhodná (Charlesworth 1996, Charlesworth a Charlesworth 2000, Charlesworth a kol. 2005). Výsledkem je v konečném důsledku vznik diferencovaného chromosomu, složením velmi vzdáleného svému původnímu partnerovi.

Dědičnost několika znaků vázaných na samičí pohlaví naznačuje, že je na pohlavním chromosomu W přítomno několik genů jako například gen *Esd* u *Bombyx mori* (Bombycidae) který ovlivňuje velikost vajíček nebo faktor zabíjející samce u zavíječe moučného *Ephestia kuehniella* (Pyrilidae) (Kawamura 1988, Marec a kol. 2001, Traut a kol. 2007). Výzkum zaměřený na genovou kaskádu určení pohlaví u *B. mori* prokázal, že vývoj samičího pohlaví záleží u tohoto druhu na přítomnosti nebo absenci chromosomu W (Hasimoto 1933). Dominantní role chromosomu W v určení pohlaví je připisována lokalizaci „master genu“ označovaného jako feminizující faktor (*Fem*), který byl recentně identifikován jako zdroj malých molekul piRNA, jejichž cílovým genem je výše zmíněný Z-vázaný *Masc* (viz předchozí Kap. 1.2.2) a jejichž experimentální umlčení vede ke zvratu ve vývoji ze samice na samce (Kawaoka a kol. 2011, Kiuchi et al. 2014, Nagaraju a kol. 2014, shrnuto v Marec 2014). Genetický základ žádného z pohlavně-specifických znaků se však dosud nepodařilo identifikovat (Traut a kol. 2013).

Molekulární složení chromosomu W motýlů je zásadně ovlivněno procesem degenerace popsaným v úvodu této kapitoly. Součástí tohoto procesu je totiž akumulace repetitivních sekvencí a transposibilních elementů, které vedou k heterochromatinizaci a umlčení exprese celého chromosomu, případně jeho částí. Se zavedením metody komparativní genomové hybridizace bylo zjištěno, že na chromosomu W se obecně nachází dva typy sekvencí, W-specifické a W-obohacené, přítomné i v jiných částech genomu (Fuková a kol. 2007). Jejich poměr a složení je druhově specifické a výrazné rozdíly byly

pozorovány i mezi blízkými příbuznými druhy, což potvrzuje rapidní evoluci a diferenciaci tohoto chromosomu (Traut a kol. 1999, Vítková a kol. 2007). Repetitivní povaha chromosomu W bohužel výrazně ztěžuje jeho sekvenční analýzu. Ačkoliv byl genom modelového organismu *B. mori* v roce 2004 osekvenován dvěma nezávislými laboratořemi, právě z důvodu repetitivních prvků na chromosomu W a jejich negativnímu vlivu na kvalitu zpracování výsledných dat obě zvolily k sekvenování materiál samčího pohlaví, takže sekvence z chromosomu W nebyly dostupné (Mita a kol. 2004, Xia a kol. 2004). První prací, která napomohla představě o sekvenčním složení tohoto chromosomu, byla až studie Abe a kol. (2005), která přinesla sekvence získané ze 14 bakteriálních umělých chromosomů, pocházejících z chromosomu W bource. Jejich analýza odhalila přítomnost LTR-retrotranspononů, non-LTR retrotranspononů, retroposonů, DNA transpononů a jejich derivátů. Díky dřívější práci Sahara a kol. (2003b), kde autoři využili W-specifické klony jako sondy pro FISH a zjistili, že barví celý chromosom, bylo možné tyto výsledky generalizovat. Repetitivní složení chromosomu W potvrdili recentně také Traut a kol. (2013), kteří sekvencovali chromosom W zavíječe moučného, *Ephestia kuehniella* (Pyralidae) získaný laserovou mikrodisekcí. Složením více než 360 000 krátkých čtení získaných sekvenováním amplifikované DNA mnoha kopií tohoto chromosomu bylo získáno přes 21 000 kontigů s průměrnou délkou 420 bazí, prokazujících kromě různých rodin transposibilních elementů také přítomnost mikrosatelitů a sekvencí mitochondriálního původu (Traut a kol. 2013).

Výrazná diferenciaci a heterochromatinová struktura naopak usnadňuje identifikaci chromosomu W v chromosomálním komplementu na různých typech preparátů, kde ho lze jasně odlišit od ostatních chromosomů (Traut a Marec 1997, Fuková a kol. 2005, Vítková a kol. 2007). V interfázních jádrech polyploidních buněk, jako jsou například Malpighiho trubice nebo snovací žlázy, tvoří mnohonásobné kopie chromosomu W pohlavně specifický chromatin ("sex-chromatin"), tj. výrazné a lehce barvitelné tělíčko kulatého tvaru, jehož velikost roste s polyploidizací buňky (např. Marec a kol. 2010, Šichová 2011). Díky jednoduché přípravě preparátů a jeho přímé souvislosti s výskytem chromosomu W se pohlavně specifický chromatin stal široce používaným indikátorem přítomnosti nebo absence W chromosomu jak u bazálních a pokročilých druhů motýlů, tak i u sesterské skupiny chrostíků (Ennis 1976, Traut a Marec 1996, Traut a Marec 1997, Marec a Novák 1998, Lukhtanov 2000).

Právě rozsáhlé studie přítomnosti sex-chromatinu v kombinaci s karyotypovými daty byly podkladem pro formulaci hypotéz o evolučním původu chromosomu W, který navzdory intenzivnímu výzkumu stále zůstává neobjasněn. Absence pohlavně specifického chromatinu u zástupců všech hlavních skupin bazálních motýlů naznačuje, že chromosom W ve všech případech chybí. Konstituce pohlavních chromosomů ZZ/Z0 byla u chrostíkovníka blatouchového *Micropterix calthella* (Micropterigidae) prokázána i analýzou karyotypu (Traut a Marec 1997, Marec a Novák 1998). Sex-chromatin a chromosom W se podařilo nalézt až u minovníčka dubového *Tischeria ekebladella* z čeledi Tischeriidae, která je sesterskou skupinou pokročilých ditrysijských motýlů, u nichž byla přítomnost pohlavně specifického chromatinu a/nebo chromosomu W prokázána u téměř všech zkoumaných druhů (Traut a Marec 1997, Lukhtanov 2000). Současný stav poznání tak navrhuje tři možné scénáře vzniku pohlavního chromosomu W motýlů (fylogenetické vztahy viz Obr. 1):

(i) *WZ/ZZ systém určení pohlaví se vyvinul u společného předka skupin Tischeriina a Ditrysia fúzí ancestrálního chromosomu Z systému Z0/ZZ s autosomem za vzniku systému neo-W/neo-Z.* Ačkoliv se tato hypotéza zdá na první pohled jako logická a pravděpodobná, podrobnější analýza odhalila její závažný nedostatek. Fúze chromosomu Z s autosomem by totiž logicky vedla ke snížení počtu chromosomů v karyotypu, což ale neodpovídá pozorovaným modálním počtům chromosomů u bazálních a pokročilých motýlů, které jsou dle dostupných informací u obou skupin stejné, a to $n=31$. Nelze však vyloučit, že u společného předka Tischeriina a Ditrysia kromě diskutované fúze došlo i ke chromosomálnímu rozpadu, který počet 31 chromosomů v karyotypu obnovil (Lukhtanov a Pupliesiene 1996, Traut a Marec 1997, Lukhtanov 2000).

(ii) *Ke vzniku WZ/ZZ systému došlo u společného předka skupin Nepticulina, Incurvariina, Tischeriina a Ditrysia, opět fúzí ancestrálního chromosomu Z s autosomem, za vzniku nového systému neo-W/neo-Z.* V tomto případě se předpokládá, že ancestrální počet chromosomů $n=31$ se musel u skupin Dacnonypha a Exoporia díky chromosomálnímu rozpadu změnit na $n=32$, z něhož se u společného předka skupiny Heteroneura poté chromosomální fúzí opět vyvinul karyotyp s počtem $n=31$ chromosomů a systémem pohlavních chromosomů WZ/ZZ. Této teorii však neodpovídá absence sex-chromatinu, prokázána u zástupců skupin Nepticulina a Incurvariina (Ennis 1976, Lukhtanov 2000).

(iii) *W chromosom systému WZ/ZZ se vyvinul de novo z nadbytečného chromosomu, nikoliv fúzí ancestrálního Z s autosomem.* Tato hypotéza poskytuje alternativní scénář k fúznímu původu chromosomu W a byla navržena poměrně nedávno (Lukhtanov 2000).

Přítomnost nadbytečných chromosomů neboli B-chromosomů byla u motýlů opakovaně popsána (např. Bigger 1976, Putturaju a Nagaraju 1985, Voleníková 2012 a další, shrnutí v Camacho 2005), stejně jako bylo popsáno párování chromosom B s univalentem pohlavního chromosomu (Kuznetsova a kol. 1997) i vznik pohlavního chromosomu z B-chromosomu jako takového u jiných druhů organismů, například u mery přelétavé *Cacopsylla peregrina* nebo octomilky *Drosophila pseudoobscura* (Nokkala a kol. 2000, Nokkala a kol. 2003, Carvalho a Clark 2005).

2. Cíle práce

Základním předpokladem všech hypotéz, zabývajících se problematikou evolučního vzniku chromosomu W motýlů je jeho absence u bazálních druhů, určená u většiny skupin na základě nepřítomnosti pohlavně specifického chromatinu v jádrech buněk polyploidních tkání. Tento pohled však značně komplikuje opomíjená práce Kawazoe (1987), v níž byl publikován karyotyp hrotnokřídlece *Endoclita sinensis*, náležícího k jedné z nejbazálnějších motýlích linií, čeledi hrotnokřídlecovití (Hepialoidea). Ačkoliv údaje o sex-chromatinu v této práci chybí, na samičím karyogramu je jasně patrných 64 chromosomů s výrazným párem pohlavních chromosomů, tvořených mimořádně velkým chromosomem Z a průměrně velkým chromosomem W. O rok později byla navíc publikována studie Fayao a kol. (1988), v níž autoři uvádí přítomnost sex-chromatinu a heteromorfních pohlavních chromosomů i u dalších dvou druhů hrotnokřídleců, *Hepialus zhayuensis* a blíže neurčeného *Hepialus sp.*, potvrzující zásadní rozkol s původními hypotézami. Traut a Marec (1996) však prokázali absenci pohlavně specifického heterochromatinu u hrotnokřídlece *Triodia sylvina*, což naopak teorii že bazální motýli chromosom W nemají podporuje.

Navzdory závažnosti a znepokojujícímu charakteru svého obsahu však tyto dvě práce zůstávají jediným zdrojem informací o chromosomální konstituci zástupců hrotnokřídlecovitých. Jednou z příčin je bezesporu náročnost studia primitivních druhů, které jsou fylogeneticky značně vzdálené od dobře prozkoumaných odvozených skupin motýlů. Ta spočívá jak v nedostatku relevantních dat, tak v často komplikovaném životním cyklu a náročném sběru vzorků. Cílem mé diplomové práce bylo ověřit přítomnost nebo absenci chromosomu W u vybraných zástupců čeledi Hepialoidea a provést molekulárně-cytogenetickou analýzu jejich karyotypů. Dílčími cíli práce bylo:

1. Ověření výskytu pohlavně specifického chromatinu v jádrech polyploidních buněk a potvrzení výsledku přímou detekcí chromosomu W na chromosomálních preparátech.
2. Stanovení počtu chromosomů v karyotypu a základní cytogenetická analýza chromosomů.
3. Izolace částečných sekvencí genů ortologních ke genům vázaným na pohlavní chromosom Z modelového organismu bource morušového *Bombyx mori*.
4. Ověření vazby těchto genů na pohlavní chromosom Z u cílových druhů pomocí metody kvantitativní Real-time PCR (qPCR; Nguyen a kol. 2013).

3. Materiál a metody

3.1 Použitý hmyz

Tato práce byla provedena na dvou druzích motýlů z čeledi hrotnokřídlecovití (Hepialidae), hrotnokřídleci chmelovém *Hepialus humuli* a americkém druhu hrotnokřídlece *Phymatopus californicus*. Jedinci obou druhů byli získáni z přírodních populací v České republice, Rakousku a USA. V případě *H. humuli* byl sběr proveden celkem na třech lokalitách, konkrétně v Bochově (ČR), Českém Krumlově (ČR) a Obergurglu (Rakousko). Většinou se jednalo o odchyt dospělých jedinců. Larvy vylíhlé z vajíček nakladených chycenými samicemi byly odchovávány na mrkvi (*Daucus carota*) pěstované v kontejneru ve venkovních podmínkách (Edwards 1964). Larvální stádia vhodná k výzkumu se u tohoto hrotnokřídlece tímto způsobem podařilo získat pouze z materiálu z lokality Bochov. Larvy hrotnokřídlece *P. californicus* pochází z rezervace Bodega Marine Reserve (Bodega Bay, Kalifornie, USA) a byly poskytnuty Patrickem Grof-Tiszou z University of California.

3.2 Příprava preparátů

3.2.1 Příprava preparátů pohlavně specifického chromatinu

Preparáty pro ověření přítomnosti pohlavně specifického chromatinu byly připraveny z polyploidních buněk Malpighiho trubice larev a dospělců podle postupu z práce Traut a kol. (1986). Malpighiho trubice byly vypitvány ve fyziologickém roztoku (0,9% NaCl, 0,042% KCl, 0,025% CaCl₂, 0,02% NaOH₃, připravený podle Glaser 1917, citováno v Lockwood 1961) a přeneseny na podložní sklo očištěné 96% etanolem, kde byly fixovány 2 min čerstvě připravenou fixází dle Carnoye (etanol, chloroform a kyselina octová v poměru 6:3:1, Sharma a Sharma 1980). Přebytečná fixáž byla následně odsáta filtračním papírem, fixovaná tkáň byla barvena lakto-aceto-orceinem (1,5% orcein v 30% kyselině octové a 30% kyselině mléčné) 3-5 min a preparát přikryt krycím sklem o velikosti 22 x 22 mm. Přítomnost či nepřítomnost sex-chromatinu v jádrech byla vyhodnocena ve světelném mikroskopu a výsledky byly zdokumentovány CCD kamerou F-View připojenou k mikroskopu Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Jena, Německo) s využitím programu Analysis Software 3.2 (Soft Imaging System GmbH, Münster, Německo). Snímky byly dále zpracovány v programu Adobe Photoshop CS 5 (Adobe Systems, San Jose, USA).

3.2.2 Příprava preparátů pro karyotypovou analýzu

Chromosomální preparáty byly připraveny tzv. „spreading“ technikou dle postupu v práci Mediouni a kol. (2004) z gonád a mozků larev hrotnokřídleců. Tkáně byly stejně jako v případě Malpighiho trubic vypitvány ve fyziologickém roztoku a fixovány čerstvou fixací Carnoy (viz Kap. 3.2.1), v tomto případě však 15 minut. V případě testes byl materiál před fixací ještě hypotonizován 10 minut v 0,075 M KCl. Fixovaná tkáň byla přenesena na podložní sklo očištěné kyselým etanolem (1% HCl v 96% etanolu) do kapky 60% kyseliny octové a homogenizována wolframovými jehlami. Sklo s homogenizovaným materiálem bylo umístěno na histologickou plotýnku vyhřátou na teplotu 45°C a kapka posouvána po skle až do úplného odpaření kyseliny.

Hotové chromosomální preparáty byly odvodněny standardní alkoholovou řadou (po 30 vteřinách v 70%, 80% a 100% etanolu) a skladovány při -20°C nebo -80°C podle předpokládané doby do jejich dalšího použití. Část preparátů obou typů byla bezprostředně po přípravě obarvena směsí DAPI (2-(4-amidinophenyl)-1H-indole-6-carboxamidin) v DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan) o koncentraci 500 ng/ml a použita pro stanovení počtu chromosomů, zbytek byl uskladněn pro pozdější použití pro hybridizace *in situ*.

3.3 Izolace nukleových kyselin

3.3.1 Izolace genomové DNA

Genomová DNA potřebná pro hybridizační metody a kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci (qPCR) byla izolována dvěma různými způsoby, a to fenol-chloroform-izoamylalkoholovou extrakcí a komerční soupravou. Jedinci hrotnokřídleců byli rozděleni dle pohlaví a DNA každého z nich byla izolována zvlášť. V případě dospělců byla před izolací u obou pohlaví odstraněna křídla a hlava, aby se předešlo kontaminaci preparátu DNA pigmenty ze šupinek a očí. U samic byl také odstraněn abdomen, který v případě oplodněných samic obsahuje spermie, a tudíž by způsobil kontaminaci samčí DNA.

Fenol-chloroform-izoamylalkoholová izolace byla provedena standardním způsobem dle protokolu podrobně popsaném např. v práci Dalíková 2006. Tkáň z každého jedince byla homogenizována samostatně v tekutém dusíku a inkubována s extrakčním pufrem (0,1 g tkáň/3 ml extrakčního pufru: 100 mM NaCl, 50 mM EDTA, 100 µg/ml proteináza K, 0,5% Sarkosyl, 10 mM Tris-HCl, pH 8) při teplotě 37°C po dobu 12-16 hodin. Ke směsi byla následně přidána RNáza A v takovém objemu, aby konečná koncentrace byla 10 µg/ml. Po jedné hodině inkubace s RNázou A byl každý vzorek 30 minut třepán se stejným objemem fenolu a následně stočen na centrifuze 15 min při 5000 g. Horní vodná fáze vydělená centrifugací byla přenesena do čisté zkumavky a celý postup byl ještě čtyřikrát opakován, dvakrát znovu s fenolem, poté s čerstvě připraveným fenol-chloroform-

izoamylalkoholem (poměr 25:24:1) a na závěr pouze s chloroform-izoamylalkoholem (24:1). DNA byla následně z roztoku vysrážena přidáním 1/10 objemu 3 M octanu sodného a 7/10 objemu isopropanolu. Precipitovaná DNA byla dvakrát promyta od solí 70% etanolem a rozpuštěna v 50 μ l sterilní vody.

V případě *P. californicus* byla DNA izolována také soupravou NucleoSpin® Tissue (MACHEREY-NAGEL, Düren, Německo). Postup vycházel z protokolu výrobce, ale byl optimalizován pro maximální výtěžnost. Doba inkubace s T1 pufrem a roztokem proteinázy K byla oproti původnímu protokolu prodloužena na 16 hodin za stálého třepání a vymytí vzorků bylo provedeno ve třech krocích: (1) na membránu kolonky bylo nejprve nanášeno 25 μ l vymývacího pufru, kolonka byla poté inkubována 5 min při pokojové teplotě a centrifugována dle doporučení výrobce, (2) získaný eluát byl nanášen zpět na kolonku a inkubován a centrifugován za stejných podmínek a (3) na kolonku bylo nanášeno 10 μ l čerstvého vymývacího pufru, inkubace a centrifugace byla stejná jako v předchozích krocích.

Kvalita izolované DNA byla ověřena spektrofotometricky na přístroji NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, USA), případně též štěpením s restričním enzymem *Hind* III (Takara Bio, Kusatsu, Japonsko). Složení štěpící reakce o celkovém objemu 10 μ l bylo ~500 ng DNA a 8 U enzymu v 1x koncentrovaném pufru M. Reakce byla inkubována 1 h při teplotě 37 °C a vzniklé fragmenty byly vyhodnoceny gelovou elektroforézou.

3.3.2 Izolace RNA a syntéza cDNA

Pro izolaci pohlavně vázaných genů hrotnokřídlece druhu *Hepialus humuli* bylo nezbytné extrahovat také RNA. Ta byla izolována z larev pomocí reagentie RNA blue (Top-Bio, Praha, ČR) dle doporučení výrobce a poté zbavena zbytkové DNA inkubací s DNázou I (USB, Cleveland, USA) 15 min při 37°C (reakce o objemu 10 μ l obsahovala cca 2,5 μ g RNA 2 U DNázy I a 5 U inhibitoru RNáz SUPERase In (Thermo Scientific) v 1x koncentrovaném pufru. RNA byla poté přečištěna pomocí fenol-chloroformové extrakce s kyselým fenolem (pH 4,7, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) a čistá RNA použita jako templát pro syntézu cDNA.

Příprava prvního vlákna cDNA byla provedena reakcí s reverzní transkriptázou SuperScript® III Reverse Transcriptase (Thermo Scientific) dle protokolu výrobce. Zbytková RNA byla poté odstraněna inkubací s 5 U RNázy H (Takara Bio) 20 min při 37°C. Enzym byl inaktivován zahřátím na 70°C po dobu 20 min a cDNA byla do dalšího použití skladována v -20°C.

3.4 Hybridizace *in situ*

3.4.1 Genomová *in situ* hybridizace a komparativní genomová hybridizace

Pro ověření přítomnosti W chromosomu v karyotypu hrotnokřídleců byla provedena genomová *in situ* hybridizace (GISH) a komparativní genomová hybridizace (CGH), které využívají hybridizace fluorescenčně značených celogenomových sond. Genomová DNA jednotlivých pohlaví izolovaná fenol-chloroform-izoamylalkoholovou metodou byla značena metodou tzv. „nick-translace“ pomocí soupravy Nick Translation Kit (Abbott Molecular, Des Plaines, USA). Značící reakce o objemu 25 µl obsahovala 1 µg DNA, 40 µM dATP, 40 µM dCTP, 40 µM dGTP, 9 µM dTTP, 16 µM Cy3-dUTP/FITC-dUTP/Green-dUTP a 1x koncentrovanou směs enzymu v 1x koncentrovaném pufru. Optimální doba značení byla empiricky stanovena na 7 hodin při teplotě 15°C s následnou inhibicí desetiminutovým zahřátím na 70°C.

V případě hrotnokřídlece *H. humuli* byla samičí genomová DNA značena zeleně svítícím fluorochromem FITC (Jena Bioscience, Jena, Německo) pro GISH a červeně svítícím Cy3 (Jena Bioscience) pro CGH. Samčí DNA byla pro GISH fragmentována povařením 10 minut při 100 °C a použita jako kompetitor, pro CGH značena zeleně opět fluorochromem FITC. Podobný postup byl použit i u druhu *P. californicus*, pouze samičí sonda pro GISH byla značena červeně fluorochromem Cy3 (Jena Bioscience) a samčí sonda pro CGH byla značena jiným zeleným fluorochromem, Spectrum Green (Abbott Molecular). Všechny hybridizace byly provedeny na samičích preparátech připravených z ovárií nebo mozků hrotnokřídleců technikami popsány v kapitole 3.2.2. Přehled jednotlivých metod a použitých sond je shrnut v Tab. 1.

Tabulka 1. Přehled sond použitých pro genomovou *in situ* hybridizaci (GISH) a komparativní genomovou hybridizaci (CGH) a jejich značení.

	Metoda	Sonda	Značení	Specifický kompetitor
<i>Hepialus humuli</i>	GISH	samičí gDNA	FITC (zeleně)	ano, samčí fragmentovaná gDNA
	CGH	samičí gDNA	Cy3 (červeně)	ne
		samčí gDNA	FITC (zeleně)	
<i>Phymatopus californicus</i>	GISH	samičí gDNA	Cy3 (červeně)	ano, samčí fragmentovaná gDNA
	CGH	samičí gDNA	Cy3 (červeně)	ne
		samčí gDNA	Green (zeleně)	

Proces samotné hybridizace *in situ* je podrobně popsán v bakalářské práci Voleníková (2012) a vychází z protokolu Fuková a kol. (2007). Hybridizační směs pro GISH v objemu na jeden preparát se skládala z 250 ng značené samičí sondy, 3 µg samčího specifického kompetitora a 25 µg sonikované DNA z lososích spermií (Sigma-Aldrich), rozpuštěných v 10 µl 50% formamidu a 10% dextran sulfátu ve 2x SSC. Složení směsi pro CGH bylo obdobné, pouze místo specifického kompetitora byla použita značená samčí DNA ve stejném množství jako samičí, tj. 250 ng na každý preparát a denaturovaná hybridizační směs byla před nanesením na skla inkubována 2 hodiny ve 37°C (Kallioniemi a kol. 1992). Preparáty pro CGH byly před denaturací dále vystaveny působení RNázy A a blokovány v Denhardtově reagens (viz Voleníková 2012).

3.4.2 Fluorescenční *in situ* hybridizace s telomerickou sondou

Aby bylo možné s jistotou určit počet chromosomů v karyotypu a zároveň konstituci pohlavních chromosomů, byla u obou druhů hrotnokřídleců provedena také fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) s telomerickou sondou. Amplifikovaná DNA pro telomerickou sondu byla získána od Ireny Hladové (Přírodovědecká fakulta, Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích) a byla připraven beztemplátovou polymerázovou řetězovou reakcí, postupem popsáným např. v práci Šíchová a kol. (2015). Sonda byla opět značena soupravou Nick Translation Kit (Abbott Molecular), pouze doba značení byla zkrácena na 75 min. Pro značení telomerické sondy byl u obou druhů hrotnokřídleců použit červeně svítící fluorochrom Cy3 (Jena Bioscience).

Postup hybridizace sondy na preparáty byl totožný jako u genomové *in situ* hybridizace. Pro jasnou identifikaci pohlavního chromosomu W byla na samičích preparátech telomerická FISH kombinována s výše zmíněnou GISH (Yoshido a kol. 2005). Výsledná hybridizační směs na jeden samčí preparát se tedy sestávala ze 160 ng značené telomerické sondy a 25 µg sonikované DNA z lososích spermií (Sigma-Aldrich) v 10 µl 50% formamidu a 10% dextran sulfátu ve 2xSSC. Směs na samičí preparáty obsahovala navíc ještě 250 ng značené samičí sondy a 3 µg samčího specifického kompetitora.

Výsledky všech typů hybridizací byly následně vyhodnoceny ve fluorescenčním mikroskopu Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss) a Zeiss Axio Imager Z2 (Carl Zeiss) a dokumentovány v prvním případě CCD monochromatickou kamerou Olympus CCD XM10 pomocí programu cellSens Standard (Olympus Europa Holding, Hamburg, Německo), ve druhém kamerou AxioCam 506 mono (Carl Zeiss) a software ZEN pro 2012 (Carl Zeiss). Pořízené snímky byly zpracovány v programu Adobe Photoshop CS 5 (Adobe Systems).

3.5 Izolace sekvencí pohlavně vázaných genů hrotnokřídlece chmelového *Hepialus humuli*

3.5.1 Polymerázová řetězová reakce

Kandidátní geny pro ověření syntenie genů vázaných na pohlavní chromosom Z hrotnokřídleců byly vybrány na základě dostupné literatury a výsledků předchozího výzkumu v naší laboratoři (Provazník 2008, Nguyen a kol. 2013, Van't Hof a kol. 2013). Ortologní sekvence byly amplifikovány pomocí degenerovaných primerů navržených dle srovnání aminokyselinových sekvencí (Nguyen a kol. 2013).

Standardní polymerázová řetězová reakce o objemu 10 µl obsahovala 75 ng cDNA, 0,1 mM dNTP mix, 0,5 µM primery a 0,25 U *ExTaq* Hot Start polymerázy (Takara Bio) v 1x koncentrovaném *ExTaq* pufru. Teplotní profil reakce se skládal z úvodní denaturace při 95°C dlouhé 5 min, poté následovalo celkem třicet cyklů tvořených 30 s denurací při stejné teplotě, 30 s intervalem nasedání primerů a 60 s extenzí při 72 °C. Po posledním cyklu byla provedena závěrečná extenze trvající 5 min při 72°C a poté byla reakce zchlazena na teplotu 4°C. Teplota nasedání primerů byla optimalizována pro jednotlivé geny a pohybovala se v intervalu 55-60°C.

Výsledné produkty byly analyzovány pomocí gelové elektroforézy v 1% agarosovém gelu. Použité primery, empiricky zjištěná teplota jejich nasedání a délka získaných produktů jsou uvedeny v Tab. 2.

Tabulka 2. Přehled použitých primerů, empiricky zjištěných teplot jejich nasedání a délek PCR produktů amplifikovaných genů hrotnokřídlece *Hepialus humuli*.

	Lokus	Sekvence primerů 5'-3'	T _A (°C)	Produkt (nt)
<i>Hepialus humuli</i>	<i>6PGD</i>	GTN ATG GGN CAR AAY CTN AT TGN CCN GTC CAR TTN GTR TG	55	~ 1500
	<i>ABC-f2</i>	CAR TGY GTN ATG GAR GTN GAY GA GCR TCD ATN GTY TCC ATR TC	60	~ 1150
	<i>Rdl</i>	GAY TTY TAY TTY AGR CAR TT YTG G ATC CAR TAC ATN AGR TTR AAR CA	60	~ 1100 ~ 1300
	<i>Para</i>	GCN ACN TTY AAR GGN TGG AT TGC CAD ATY TCR TAR TAC AT	58	~ 1300

3.5.2 Klonování

Produkty získané PCR byly buď přímo přečištěny a použity pro sekvenaci, nebo po gelové elektroforéze vyřezány z gelu a extrahovány pomocí soupravy Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (Promega) dle protokolu dodaného k soupravě. Produkty genů, které byly extrahovány z gelu, byly následně podle doporučení výrobce vloženy do plazmidu Promega pGEM T Easy Vector (Promega) a použity k transformaci chemicky kompetentních bakterií kmene DH5 α . Plazmidová DNA byla z bakterií izolována soupravou NucleoSpin® Plasmid (NoLid) (Macherey-Nagel), opět dle dodaného protokolu.

3.5.3 Sekvencování a zpracování sekvencí

Sekvence PCR produktů a plazmidů probíhala buď na přístroji ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) v Laboratoři genomiky Biologického centra Akademie věd ČR v Českých Budějovicích nebo ABI Prism 3100 (Applied Biosystems) v rámci servisu společnosti SEQme (SEQme s.r.o., Dobříš, ČR). Vzorky určené k sekvenaci byly v obou případech připraveny dle požadavků příslušné laboratoře. Všechny získané sekvence byly zpracovány v programu BioEdit 7.2. (Ibis Biosciences, Carlsbad, USA).

3.6 Práce s transkriptomem hrotnokřídlece *Phymatopus californicus*

3.6.1 Filtrování a úprava dat

Sekvenační data transkriptomu druhu *P. californicus* v neupravené podobě byla získána z databáze GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, přístupový kód SRX371350), kde byla zveřejněna jako součást práce Bazinet a kol. (2013). Knihovna pro sekvenování byla autory připravena z cDNA dospělého jedince *P. californicus* a sekvenována na platformě Illumina HiSeq 1000 (Illumina, San Diego, USA) metodou sekvencování párových konců („paired end“).

Aby bylo možné data použít pro další zpracování, bylo nutné nejprve odstranit kontaminaci sekvencemi adaptorů použitých při sekvencování, vyřadit čtení s nízkou kvalitou a odstranit nekvalitní počáteční a koncové báze každého čtení. K tomu byl využit software Trimmomatic (verze 0.30, Bolger a kol. 2014) vyvinutý přímo pro zpracování dat sekvencovaných na platformě Illuminy. Odstraněny byly počáteční a koncové báze čtení s kvalitou vyjádřenou v tzv. logaritmicím „phred“ skóre nižším než 5, které odpovídá pravděpodobnosti špatně určené báze > 31 %. Dále byly odstraněny báze s phred skóre zprůměrovaným přes klouzavé okénko čtyř bází nižším než 30, tedy s pravděpodobností nesprávného určení báze > 0,01 %. Výstupy z programu byly poté vizualizovány pomocí programu FastQC (verze 0.11.2, Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, UK, dostupný z <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

3.6.2 *De novo* složení transkriptomu

Čtení, která prošla výše zmíněným filtrováním, byla poté použita pro složení transkriptomu. K tomuto účelu byly použity dva různé softwarové balíčky, Trinity (Grabherr a kol. 2011, Haas a kol. 2013) a SOAPdenovo-Trans (Xie a kol. 2014).

Softwarový balíček Trinity pracuje se třemi na sebe navazujícími algoritmy a vyžadoval pouze minimální specifikaci parametrů, konkrétně vstupní a výstupní soubory, jejich typ a přidělený objem výpočetní paměti. Většina procesu skládání tedy vycházela ze základního nastavení nadefinovaného autory. Navzdory této vlastnosti je Trinity hodnocen jako jeden z nejlepších programů, které jsou pro skládání transkriptomu *de novo*, tj. bez dostupné referenční sekvence, k dispozici (např. Chopra a kol. 2014).

Alternativou k platformě Trinity byl zvolen program SOAPdenovo-Trans. Na rozdíl od výše popsané Trinity SOAPdenovo-Trans ke skládání využívá maximum dostupných informací o zvoleném transkriptomu. Před spuštěním samotného programu bylo tedy nutné vytvořit konfigurační soubor, který obsahoval detailní informace o datech, ze kterých bude skládání transkriptomu probíhat. Výsledný konfigurační soubor specifikoval maximální délku čtení, průměrnou velikost fragmentů DNA použitých pro přípravu knihovny, vstupní data, výstupy a dále nastavitelnou minimální délku překryvu pro složení dvou čtení. Všechny tyto informace s výjimkou průměrné velikosti inzertů knihovny byly dostupné buď v databázi GenBank nebo publikovány v původní práci Bazinet a kol. (2013). Průměrná velikost inzertů knihovny byla doplněna na základě e-mailové korespondence s autorem zmíněné publikace Adamem L. Bazinetem (Marylandská univerzita, Maryland, USA) a byla 300 bazí. V rámci samotného příkazu ke spuštění bylo dále možné nadefinovat velikost úseků (k-merů), se kterými bude sestavovatel transkriptomu pracovat. Pro dosažení co nejlepších výsledků bylo sestavení transkriptomu opakováno s k-mery dlouhými 21, 25, 31, 35, 41, 45, 51, 55, 61, 65, 71, 75 a 81 bazí.

3.6.3 Příprava databáze a vyhledání genů

Výstupy obou programů byly poté sloučeny do jediného souboru pomocí skriptu, který je součástí softwarového balíku EvidentialGene (Gilbert 2013, Nakasugi a kol. 2014).

Ze získaných sekvencí byla vytvořena databáze pro vyhledání sekvencí cílových genů prostřednictvím nástroje BLAST+ pro příkazovou řádku. Takto získaná databáze transkriptů hrotnokřídlece *Phymatopus californicus* byla prohledána s již zadanými známými sekvencemi druhu *Hepialus humuli* pomocí programu tblastx, který s nukleotidovou sekvencí přeloženou do všech šesti čtecích rámců prohledává nukleotidovou databázi, která je také přeložena do všech čtecích rámců (Altschul a kol. 1990, Camacho a kol. 2009).

3.7 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (RT-PCR)

3.7.1 Navrhování primerů

Sekvence genů klonované u hrotnokřídlece *H. humuli* a vyhledané v transkriptomu druhu *P. californicus* byly následně použity k ověření syntenie genů na chromosomu Z srovnáním počtu jejich kopií v genomu samců a samic pomocí tzv. kvantitativní PCR (qPCR) (Nguyen a kol. 2013).

Každá sekvence byla nejprve porovnána s referenčním genomem bource morušového dostupným v databázi KAIKObase (<http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/>) a byly vymezeny exonové oblasti. Poté byly sekvence izolované z obou druhů hrotnokřídleců porovnány mezi sebou v programu Geneious 7.1 (Biomatters, Auckland, Nový Zéland) a primery byly přednostně navrhovány do stejných úseků. Pro navrhování primerů byl použit program Universal ProbeLibrary Assay Design Center (Roche Diagnostics, Basilej, Švýcarsko). Seznam použitých primerů, teplota jejich nasedání (T_A) a délka ampliconů pro jednotlivé geny jsou shrnuty v Tab. 3.

Tabulka 3. Přehled primerů použitých pro RT-PCR.

	Lokus	Sekvence primerů 5'-3'	T_A (°C)	Amplicon (nt)
<i>Hepialus humuli</i>	<i>6PGD</i>	ACC GTG CTG TGA CTG GGT A	60	61
		ATT GTG CAC CAT CTT GAC GA	60	
	<i>ABC-f2</i>	GCA GCA AGC TAC CAA GGA CT	59	67
		ATA CAA GGC ACG GGC TAA TG	59	
<i>Rdl</i>	TGC CAT AAA CCT TTG CTT CC	60	67	
	ATT AGA GTA CGC CAC AGT TTG AT	59		
<i>Para</i>	ATT CCC TTG GCT CCC TTA AC	59	74	
	CCC ACA TTG CTG AGA GTG G	60		
<i>Phymatopus californicus</i>	<i>6PGD</i>	GGT GAA CCT TGC TGT GAT TG	59	68
		CCA TTG TGC ACC ATC TTG AC	59	
	<i>ABC-f2</i>	GCA GCA AGC TAC CAA GGA CT	59	68
		CAT ACA AGG CAC GGG CTA AC	60	
	<i>Rdl</i>	CGT GCT CTA CAG CAT CAG GA	60	76
CTG CCT ATC GAG TGG GTA CAG		59		
TCG CCT ACT GGT CCA CCT AC		60		
<i>Para</i>	CCA CCA TAA GCA CGA TTC AG	59	66	
	GAA CTC TGC TGT TTG CAT TGG	60	69	
CCA GGA ACA AAA GTA GGC AAA	59			

3.7.2 Kvantitativní PCR (qPCR)

Kvantitativní PCR nebo také PCR v reálném čase („Real-time PCR“) je metodou, pomocí které lze jednoduše otestovat vazbu vybraných genů na chromosom Z. Její princip je založen na rozdílech v amplifikaci produktu během PCR způsobených odlišnou výchozí koncentrací templátu. Rozdíl v množství templátu se promítá do množství vznikajícího PCR produktu, které můžeme zaznamenávat pomocí interkalačního fluorescenčního barviva. Z počtu cyklů, ve kterých dojde během exponenciální fáze k překročení prahové hodnoty, tzv. hodnoty C_t („threshold cycle“) můžeme odvodit relativní rozdíl mezi templáty. Pokud je cílový gen vázaný na chromosom Z, v genomové DNA samic (WZ nebo Z0) by měl být přítomen v polovičním množství kopií ve srovnání se samci (ZZ). Relativní kvantifikaci lze přitom provádět srovnáním s unikátním autosomálním genem (AA) sloužícím jako standard, jehož počet kopií se mezi samci a samicemi neliší (Nguyen a kol. 2013).

V rámci každého experimentu byla kvantifikace provedena na třech nezávisle izolovaných vzorcích samičí a samčí genomové DNA. V případě vzorků izolovaných fenol-chloroform-isoamylalkoholovou metodou byla DNA nejprve inkubována 90 s při 99°C, aby došlo k fragmentaci dlouhých molekul a ředění vzorků bylo co nejpřesnější. Účinnost reakce pro referenční a testovaný gen byla stanovena na směsném vzorku samičí a samčí DNA ředěném 0x, 10x, 100x a 1000x. Každá reakce o celkovém objemu 25 μ l obsahovala 250 ng DNA, 1x koncentrovaný premix SYBR Premix *ExTaq* (Tli RNase H Plus) (Takara Bio) a 0,5 μ M primery a byla provedena ve třech technických replikách pro zajištění maximální objektivitu při vyhodnocování výsledků. Samotný experiment probíhal na přístroji C1000 Thermo Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) s nástavcem CFX96 Real-Time System (Bio-Rad). Teplotní profil reakce se skládal z počáteční denaturace dlouhé 3 min při 95°C, 45 cyklů složených z 30 s denaturace při 94°C, 30 s intervalu nasedání primerů při 60°C a 30 s elongace při 72°C a závěrečné syntézy začínající při teplotě 65°C a zvyšující se o půl stupně Celsia každých pět sekund až na teplotu 95°C.

Získaná data pro každý experiment byla nejprve zpracována v programu Bio-Rad CFX Manager (verze 3.0, Bio-Rad). Hodnoty C_t směsných vzorků byly graficky vyneseny proti stupni jejich ředění do standardní křivky, z níž byla vypočtena účinnost reakce (E) pro referenční i testovaný gen. U obou genů byla také provedena kontrola křivky tání, aby bylo možné vyloučit amplifikaci nespecifických produktů. Hodnoty C_t vzorků kontrolního i testovaného genu byly poté exportovány do programu Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA), kde byl pro každý vzorek vypočítán poměr mezi relativním počtem kopií referenčního a testovaného genu (R) dle následujícího vzorce

$$R = \frac{(1+E_{ref})^{Ct_{ref}}}{(1+E_{test})^{Ct_{test}}}$$

kde E_{ref} a E_{test} představují účinnosti reakce pro referenční a testovaný gen a \overline{Ct}_{ref} a \overline{Ct}_{test} průměr Ct hodnot technických replik každé reakce. Nulová hypotéza, že hodnoty R pro referenční a testovaný gen se od sebe neliší, byla poté otestována párovým t -testem.

4. Výsledky

4.1 Stanovení přítomnosti pohlavně specifického chromatinu a základní karyotypová analýza

Přítomnost pohlavně specifického chromatinu jsem u obou druhů hrotnokřídleců stanovovala na preparátech připravených z Malpighiho trubic. Aby bylo dosaženo maximální průkaznosti výsledků, Malpighiho trubice jsem vždy vypitvala v celé délce a analyzovala všechna jádra na preparátu. U hrotnokřídlece *Hepialus humuli* jsem z důvodu malého počtu jedinců v larválním stádiu, které je pro přípravu preparátů nejvhodnější, použila i dospělé, a to jak živé, tak zmražené a skladované v -80°C . Struktura tkání u zmražených jedinců odpovídala nativnímu stavu a bylo tedy možné je zahrnout do analýzy. Mikroskopické vyhodnocení hotových preparátů shodně ukázalo jednoznačnou absenci pohlavně specifického chromatinu u samců i samic obou druhů hrotnokřídleců (Příloha Obr. 1-2). Detailní rozbor struktury jader pod velkým zvětšením sice odhalil v některých jádrech *H. humuli* i *P. californicus* výskyt malých heterochromatinových zrn, jejich frekvence však byla stejná u obou pohlaví a velikostí ani morfologií pohlavně specifickému chromatinu neodpovídala (Příloha Obr. 4). Tato heterochromatinová zrna tak patrně naznačují spíše přítomnost heterochromatinových bloků v genomu než sex chromatinu.

Tento předpoklad byl následně na chromosomálních preparátech potvrzen. Heterochromatinové bločky byly na pachytenních bivalentech obou druhů hrotnokřídleců jasně pozorovatelné už pod fázovým kontrastem během předběžného vyhodnocování kvality preparátů a zůstaly viditelné i po obarvení DAPI (Příloha Obr. 9). U druhu *H. humuli* byla heterochromatinem tvořena dokonce celá polovina jednoho páru autosomů, formující na mitotických chromosomech jasně identifikovatelné bloky (Příloha Obr. 7). Počet chromosomů byl u hrotnokřídlece *P. californicus* stanoven na $2n=64$ pro samce a $2n=63$ pro samice, přičemž v samičím karyotypu byl přítomný mimořádně velký chromosom, který u samce chyběl (Příloha Obr. 8). U hrotnokřídlece *H. humuli* bylo možné chromosomy spočítat pouze na samčích preparátech, kde počet odpovídal stejně jako u předchozího druhu $2n=64$ (Příloha Obr. 6). U samic se z důvodu nevhodného vývojového stádia larev bohužel nepodařilo získat žádný preparát, na kterém by byly chromosomální figury vhodné k vyhodnocení. Překvapivým zjištěním byla morfologie chromosomů obou druhů, naprosto se vymykající obvyklé struktuře u motýlích chromosomů (Příloha Obr. 8). Chromosomy hrotnokřídleců vykazovaly v některých jádrech jasné konstriktce a výrazně tak připomínaly

chromosomy monocentrické. Tento jev byl nezávisle pozorován jak na preparátech připravených z gonád, tak i z mozků různých jedinců obou druhů.

4.2 Detekce chromosomu W pomocí hybridizace *in situ*

Přítomnost chromosomu W bylo z výše uvedených důvodů možné ověřit pouze v karyotypu samic druhu *Phymatopus californicus*. K tomuto účelu byla na preparátech provedena genomová *in situ* hybridizace (GISH) a komparativní genomová hybridizace (CGH) s celogenomovými sondami, umožňující případný W chromosom v genomu identifikovat. Obě metody poskytly na všech preparátech použitých pro hybridizaci shodný výsledek a zvýraznily nezvykle velký chromosom, popsáný v předchozí kapitole (Příloha Obr. 10-11). Signál však nebyl lokalizovaný po celé délce tohoto chromosomu, ale pouze na jeho části, která odpovídala přibližně polovině jeho délky a byla tvořena heterochromatinem (Příloha Obr. 11). Poté na chromosomu následovalo zúžení a pokračovala euchromatinová část, která byla značena stejně jako autosomy pouze v malé míře, s jedním izolovaným blokem výraznějšího signálu (Příloha Obr. 10). Rozdíly v intenzitě hybridizačních signálů samičí a samčí genomové DNA během CGH naznačily na chromosomu W přítomnost jak W-specifických a W-obohacených repetit, tak i repetit společných pro autosomy (Příloha Obr. 12-13). Fluorescenčně značená samičí celogenomová DNA při GISH i CGH kromě chromosomu W ve zvýšené míře hybridizovala také k heterochromatinovým bločkům, koncovým oblastem některých chromosomů a poskytla izolovaný signál v euchromatinové části jednoho autosomu, což může být blok repetitivní DNA, která se translokovala na W chromosom a zde se došlo k jejímu rozšíření (Příloha Obr. 11-13). Heterochromatinové bloky mimo chromosom W a koncové části vybraných bivalentů byly při CGH výrazněji značeny i samčí DNA (Příloha Obr. 12-13).

Pro podrobnější analýzu párování pohlavních chromosomů byla metoda GISH v dalším experimentu zkombinována s fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH) s telomerickou sondou. Doplněním o telomerický signál bylo možné jasně určit konce jednotlivých chromosomů a tudíž stanovit jejich přesný počet a pozici během párování. Lokalizace telomerického signálu odhalila přítomnost trivalentu pohlavních chromosomů tvořeného chromosomem W a dvěma chromosomy Z (Příloha Obr. 11), případně bivalentu WZ a univalentu Z (Příloha Obr. 13). Studium těchto figur na různých preparátech bylo zjištěno, že k heterochromatinové části chromosomu W, označené GISH a CGH, se během pachytene váže jeden z chromosomů Z (Z_1), zatímco druhý přisedá k části tvořené euchromatinem (Z_2). Heterochromatinová část chromosomu W se však v některých

případech párovala sama se sebou, poté byl vytvořen bivalent WZ_2 a chromosom Z_1 zůstal ve formě univalentu. Charakteristické zúžení na chromosomu W pozorované při GISH a CGH přesně odpovídalo místu mezi oběma chromosomy Z, kde se s chromosomem W nepároval ani jeden z nich.

4.3 Izolace sekvencí genů ortologních k Z-vázaným genům u *B. mori*

Aby bylo možné zjistit, zda chromosom Z odvozených motýlů tvoří pohlavně vázaný syntenní blok také v genomu hrotnokřídleců, bylo u nich nutné nejprve izolovat částečné sekvence vybraných genů, ortologních ke genům vázaným na chromosom Z modelového organismu bource morušového, *Bombyx mori*. Celkem byly pro tuto analýzu na základě dostupné literatury vybrány čtyři geny, jmenovitě *6-fosfoglukonát dehydrogenáza (6PGD)*, *ABC transportér F2 (ABC-f2)* a *resistance to dieldrin (Rdl)* lokalizované v referenčním genomu *B. mori* i jiných druhů na chromosomu Z a *paralytic (Para)*, který v referenčním genomu bource morušového leží na chromosomu 21 (<http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/>).

V případě hrotnokřídlece chmelového, *Hepiaus humuli*, byly sekvence izolovány amplifikací cílových genů z cDNA. Získané PCR produkty byly osekvenovány. Geny *ABC-f2*, *6PGD* i *Para* poskytovaly během amplifikace stabilně jediný produkt, v případě genu *Rdl* ale docházelo k amplifikaci dvou, lišících se dle odhadu z gelové elektroforézy přibližně délkou 200 bazí. Oba separované produkty byly tedy z gelu následně extrahovány a osekvenovány zvlášť. Porovnání výsledků odhalilo jejich sekvenční shodnost, pouze delší z nich měl navíc 145 bazí, to však vzhledem k amplifikaci z cDNA mohlo být dáno alternativním sestřihem daného genu.

U amerického druhu hrotnokřídlece *Phymatopus californicus* byly sekvence získány prohledáním transkriptomu složeného z volně přístupných dat zveřejněných v databázi GenBank. Aby bylo možné získat sekvence vhodné délky, bylo nutné tato data nejprve bioinformaticky zpracovat a vytvořit databázi umožňující vyhledávání. Výchozí transkriptomická data obsahovala celkem cca. 16,5 Gb krátkých párových čtení o délce 100 bazí. Po odfiltrování adaptorových sekvencí a čtení s nízkou kvalitou zůstalo pro další zpracování cca. 93 % párových čtení. Ty byly použity jako vstupy pro dva různé softwarové balíčky Trinity a SOAPdenovo-Trans. Ty jsou výslovně určeny ke skládání transkriptomu nemodelových druhů *de novo*, tj. bez dostupného referenčního genomu, a byly vybrány na základě jejich předpokládané kvality popsané v nezávislých publikacích. Transkriptom složený pomocí Trinity sestával z celkem 67 773 kontigů, tj. sestavených sekvencí. Počet kontigů získaných skládáním pomocí SOAPdenovo-Trans se v závislosti na délce použitého

K-meru pohyboval od 33155 do 97516 (viz Kap. 3.6.2). Protože vyhodnocení kvality složených transkriptomů stále zůstává značně problematické (O'Neil a Emrich 2013), byla databáze pro vyhledávání nástrojem BLAST+ vytvořena ze všech takto sestavených sekvencí. Sekvence cílových genů hrotnokřídlece *Phymatopus californicus* byly z vytvořené databáze vybrány na základě izolovaných sekvencí druhu *Hepialus humuli*.

4.4 Ověření vazby genů na chromosom Z hrotnokřídleců metodou kvantitativní PCR

Vazba vybraných genů na chromosom Z byla testována metodou qPCR založenou na srovnání počtu cyklů amplifikace, po kterých vzorek dosáhne prahové hodnoty fluorescence. Jako templát pro qPCR byla použita samčí a samičí gDNA hrotnokřídleců. Analýza vychází z předpokladu, že gen vázaný na chromosom Z je v gDNA samic (konstituce pohlavních chromosomů WZ) přítomen v polovičním množství kopií než v genomové DNA samců (ZZ). Jako vnitřní standard umožňující porovnání výsledků z různých reakcí při této analýze slouží autosomální unikátní sekvence, jejíž počet kopií se mezi pohlavími neliší. Amplikon genů *6PGD*, *Rdl* a *Para* odpovídal očekávání a pohyboval se tedy ve všech případech pod 100 párů bazí. U genu *ABC-f2* však u obou druhů hrotnokřídleců docházelo k amplifikaci sekvence dlouhé přibližně 4500 bp způsobené pravděpodobně přítomností intronické sekvence. Gen *ABC-f2* byl proto z další analýzy vyřazen.

Vazba genů *6PGD* a *Rdl* na chromosom Z byla poté testována qPCR s použitím autosomálního genu *Para* jako vnitřního standardu. V případě genu *6PGD* se u obou druhů hrotnokřídleců podařilo vyvrátit vazbu tohoto genu na autosom, tj. počet kopií *6PGD* se mezi samčími a samičími vzorky signifikantně lišil (t -test, $P < 0,05$). Zároveň se nepodařilo vyvrátit nulovou hypotézu o dvojnásobné počtu kopií mezi samci a samicemi (t -test, $P > 0,05$). Výsledky tak naznačují vazbu tohoto genu na pohlavní chromosom Z. Výsledky pro gen *Rdl* neodpovídaly ani vazbě na pohlavní chromosom Z ani na autosom. Výsledky qPCR experimentů jsou uvedeny v Tab. 4.

Tabulka 4 Výsledky qPCR experimentů

Druh	Gen	Pohlaví*	Počet kopií cílového genu vztažený k referenci						H_0 (1:1) §	H_0 (2:1) §
			vz. I †	vz. II †	vz. III †	$E_{\text{gen}} ‡$	$E_{\text{ref}} ‡$	průměr±SD ‡	p	p
<i>P. californicus</i>	6PGD	♂	2,24	2,03	2,21	0,96	1,01	2,16±0,12	0,04	0,53
		♀	1,06	0,97	0,73	0,96	1,01	0,92±0,17		
<i>H. humuli</i>	6PGD	♂	1,44	1,42	1,35	0,95	0,99	1,40±0,05	0,01	0,12
		♀	0,62	0,57	0,63	0,95	0,99	0,61±0,04		

* ♂ – samec, ♀ – samice; † Průměrná hodnota ($n = 3$) tří nezávislých opakování (I-III); ‡ E – účinnost PCR vypočítaná ze standardní křivky, E_{gen} – účinnost testovného genu, E_{ref} – účinnost referenčního genu; § Nulová hypotéza (H_0): (i) žádný rozdíl (1:1) nebo (ii) dvojnásobný rozdíl (2:1) mezi samci a samicemi v průměrných hodnotách ze tří nezávislých opakování byla testována t -testem (při $p > 0.05$ se průměrné hodnoty signifikantně neliší od poměru 1:1, resp. 2:1)

5. Diskuze

Cílem této práce bylo ověřit konstituci pohlavních chromosomů vybraných zástupců motýlů z bazální čeledi hrotnokřídlecovití (Hepialoidea), u níž výsledky předchozího výzkumu naznačily rozpor s obecně uznávanou představou o evolučním původu chromosomu W. Za tímto účelem byly metodami molekulární cytogenetiky prozkoumány dva druhy hrotnokřídleců, hrotnokřídlec chmelový *Hepialus humuli* a americký druh hrotnokřídlece *Phymatopus californicus*. U obou druhů byla prokázána absence pohlavně specifického heterochromatinu v polyploidních tkáních, naznačující určení pohlaví typu Z0/ZZ. Tento předpoklad však byl následně u druhu *Phymatopus californicus* vyvrácen sérií *in situ* hybridizací, které prokázaly nejen přítomnost částečně diferencovaného chromosomu W, ale také dvou chromosomů Z, které se s tímto chromosomem párovaly. Pohlavní chromosomy samic hrotnokřídlece *Hepialus humuli* bohužel nebylo možné na preparátech vyhodnotit. U obou druhů se ale podařilo stanovit počet chromosomů v karyotypu, který byl $2n(\text{♂})=64$. Analýza chromosomálních preparátů dále odhalila velké množství heterochromatinových bločků a neobvyklou morfologii chromosomů, která vykazovala znaky monocentrického uspořádání. U obou druhů hrotnokřídleců byly následně izolovány částečné sekvence genů ortologních k Z-vázaným genům *6PGD*, *ABC-f2* a *Rdl* modelového organismu *Bombyx mori* a jeden autosomální ortolog *Para*. V případě hrotnokřídlece *H. humuli* byly cílové sekvence získány amplifikací z cDNA, u druhu *P. californicus* vyhledány v sekvenci *de novo* složeného transkriptomu. Prostřednictvím metody kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR) byla následně u obou testovaných druhů prokázána vazba ortologu genu *6PGD* na pohlaví, naznačující společný původ pohlavního chromosomu Z hrotnokřídleců a pohlavního chromosomu Z pokročilých motýlů.

5.1. Pohlavně specifický heterochromatin jako marker chromosomu W

Ačkoliv analýza jader polyploidních buněk Malpighiho trubic prokázala absenci pohlavně specifického heterochromatinového tělíska u obou zkoumaných druhů hrotnokřídleců, chromosom W byl v genomu druhu *Phymatopus californicus* přítomný a dokonce byl největším chromosomem z celého komplementu. Zřejmý rozpor mezi těmito výsledky lze vysvětlit evoluční podstatou pohlavně specifického heterochromatinu motýlů, který na rozdíl od podobného heterochromatinu u savců není mechanismem kompenzace genové dávky řízeně umlčující transkripčně aktivní chromosom, ale důsledkem degeneračních procesů, které na chromosomu W probíhají (Traut a Marec 1996). Heterochromatinizace

chromosomu W totiž přímo souvisí s jeho repetitivním složením (Henikoff 2000), takže výskyt případných euchromatinových oblastí může jeho integritu narušovat a heterochromatinové tělísko se poté rozpadá do menších fragmentů, které v jádře není snadné identifikovat (Traut a Marec 1996, Šíchová a kol. 2015). Tento jev byl také popsán například u mutantních linií zavíječe moučného *Ephestia kuehniella* (Pyraliade), kde byly na chromosom W translokovány části chromosomu Z nebo autosomů (Traut a kol. 1986, Marec a Traut 1994) a je připisován transkripci z traslokovanych částí, která okolní heterochromatin rozvolňuje a brání jeho shlukování (Marec a Traut 1994).

Možný rozpad heterochromatinového tělíska u samic hrotnokřídlece *Phymatopus californicus* podporuje i neobvyklá struktura pohlavního chromosomu W, která byla u toho druhu pozorována. Ačkoliv je chromosom W u většiny motýlů dobře diferencovaný, v případě *P. californicus* diferencovaná část tvoří pouze cca polovinu tohoto chromosomu a zbytek je s výjimkou malého heterochromatinového bloku tvořen euchromatinem. Na preparátech z Malpighiho trubic nebylo sice u samic patrné žádné heterochromatinové tělísko typického tvaru a velikosti, pod velkým zvětšením byla však u obou pohlaví zaznamenána přítomnost heterochromatinových zrn. Analýza chromosomálních preparátů poté prokázala výskyt velkého množství heterochromatinových bločků na autosomech, které přítomnost těchto zrn u obou pohlaví vysvětlují. Fragmenty pohlavně specifického heterochromatinu a zrna původem odvozená od autosomálních heterochromatinových bločků však není možné na tomto typu preparátů vzájemně odlišit.

5.2 Karyotyp a pohlavní chromosomy čeledi hrotnokřídlecovití (Hepialidae)

Kromě druhů *H. humuli* a *P. californicus* studovaných v rámci této práce jsou známy informace o karyotypu nebo alespoň přítomnosti pohlavně specifického heterochromatinu ještě u další pěti motýlů z čeledi Hepialidae, konkrétně druhů *Endoclita sinensis* (Kawazoe 1987), *Endoclita excrescens* (Ken Sahara, Univerzita Iwate, Japonsko, nepublikované výsledky), *Triodia sylvina* (Traut a Marec 1996) a *Ahamus* (syn. *Hepialus*) *zhuyensis* a blíže neurčeného druhu *Hepialus* sp. (Fayao a kol. 1988). Známé karyotypové charakteristiky těchto druhů jsou shrnuty v Tab. 5.

Tabulka 5. Přehled dostupných informací o chromosomech motýlů z čeledi hrotnokřídlecovití (Hepialidae).

Druh	PSH	Chr. W	2n (♀)	2n (♂)	Zdroj
<i>Hepialus humuli</i>	–	?	?	64	tato práce, Lukhtanov (2000)
<i>Hepialus spp.</i>	+*	+ [#]	64	64	Fayao a kol. (1988)
<i>Ahamus zhayuensis</i>	+*	+ [#]	64	64	Fayao a kol. (1988)
<i>Endoclita sinensis</i>	?	+	64	64	Kawazoe (1987)
<i>Endoclita excrescens</i>	?	+	64	64	K. Sahara, ústní sdělení
<i>Triodia sylvina</i>	–	?	?	?	Traut a Marec (1996), Lukhtanov (2000)
<i>Phymatopus californicus</i>	–	+	63	64	tato práce

PSH, pohlavně specifický heterochromatin; Chr. W, chromosom W; 2n(♀), diploidní počet chromosomů samice; 2n(♂), diploidní počet chromosomů samců; –, absence; +, přítomnost; ?, stav neznámý.

*Přítomnost pohlavně specifického heterochromatinu byla doložena nekvalitním obrazovým materiálem a tudíž nemohla být ověřena; [#]autoři identifikované heteromorfní pohlavní chromosomy interpretují jako chromosomy XY.

U všech druhů se známým karyotypem byl počet chromosomů $2n=64$, který je patrně ancestrálním a evolučně značně konzervovaným karyotypem všech dosud zkoumaných druhů hrotnokřídleců. S výjimkou *P. californicus* se dostupné počty chromosomů hrotnokřídleců neliší mezi pohlavími, což spolu s prokazatelnou přítomností heteromorfního chromosomálního páru naznačuje, že ancestrální karyotyp hrotnokřídleců obsahoval pár pohlavních chromosomů WZ (Kawazoe 1987, Fayao a kol. 1988, Sahara, nepublikované výsledky).

Neobvyklá heterogenní struktura chromosomu W *P. californicus* může být vysvětlena následkem recentní fúze, během níž došlo ke spojení diferencovaného ancestrálního chromosomu W s autosomem, který tvoří jeho novou, euchromatinovou část. Tomu odpovídá snížený počet chromosomů u samic $2n(♀)=63$, přibližně dvojnásobná velikost chromosomu W v porovnání s ostatními elementy v komplementu a především jeho párování se dvěma chromosomy Z, z nichž každý se váže k jedné ze zmíněných částí chromosomu W. Kromě těchto trivalentů byly na preparátech pozorovány také bivalenty WZ_2 , ve kterých ancestrální část chromosomu W vytvořila kompaktní strukturu sama se sebou a k párování došlo pouze mezi chromosomem Z_2 a euchromatinovou částí chromosomu W. V takových případech byl ancestrální chromosom Z_1 , párující se patrně v trivalentu

k ancestrální heterochromatinové části chromosomu W v jádře přítomen ve formě samostatného univalentu (Příloha Obr. 13).

Vznik neo-pohlavních chromosomů je fenoménem, který byl u motýlů opakovaně popsán a je v souladu s mechanismy karyotypové evoluce jejich genomu, popsanými v Kap. 1.1.3. Dobře zdokumentovaný případ vzniku neo-pohlavních chromosomů byl publikován například v práci Nguyen a kol. (2013), která studií syntenie genů a vazby genetických znaků na pohlaví přinesla důkaz o fúzním původu chromosomu Z obaleče jablečného *Cydia pomonella* (Tortricidae), který vzniknul spojením ancestrálního chromosomu Z s autosomem odpovídajícím chromosomu 15 modelového organismu *Bombyx mori*. Výzkum na příbuzných druzích motýlů navíc prokázal, že k této fúzi došlo už u společného předka hlavních vývojových linií čeledi Tortricidae, podčeledí Olethreutinae a Tortricinae. Šíchová a kol. (2013) analyzovala diferenciaci pohlavních chromosomů W u několika obalečů a ukázala, že se jejich diferenciace podstatně liší patrně v důsledku stochasticity procesu degenerace autosomální části neo-W chromosomu. Dalším popsáním příkladem takové fúze jsou evolučně mladší mnohočetné pohlavní chromosomy předivek rodu *Yponomeuta* (Yponomeutidae) (Nilsson a kol. 1988), u nichž byl během meiotické profáze pozorován trivalent WZ_1Z_2 . Tato konstituce dle autorů vznikla translokací autosomu na chromosom W, který se poté pároval jak s homologním autosomem (Z_2), tak s původním chromosomem Z_1 . Autoři prokázali přítomnost sex-chromatinu v polyploidních tkáních a heterochromatinovou povahu celého chromosomu neo-W indikovanou výraznější barvitelností. Veselá (2012) však pomocí komparativní genomové hybridizace zjistila, že se míra diferenciace chromosomu neo-W u jednotlivých druhů předivek značně liší. Nicméně u všech zmíněných druhů obalečů a předivek byla přes různý stupeň diferenciace a stáří chromosomu (neo-)W potvrzena přítomnost pohlavně specifického heterochromatinu v jádrech polyploidních buněk. Dobře zdokumentovaný rozpad pohlavně specifického heterochromatinu byl recentně popsán u kryptických druhů bělásků rodu *Leptidea*, které mají patrně velmi mladé a také značně odvozené mnohočetné pohlavní chromosomy $W_{1-4}Z_{1-4}$ (Šíchová a kol. 2015). Zda je absence pohlavně specifického heterochromatinu univerzálním znakem chromosomu W hrotnokřídleců nebo se týká jen evolučně mladého neo-W chromosomu pozorovaného v karyotypu *P. californicus* není možné na základě dostupných informací rozhodnout.

5.4 Chromosom W a evoluce systému WZ

Motýli jsou coby největší skupina organismů s chromosomálním určením pohlaví WZ/ZZ ideálním modelovým systémem pro ověření obecné platnosti nejrůznějších aspektů evoluce pohlavních chromosomů, studovaných převážně u taxonů se systémem XX/XY. Otázka jejich původu je tak klíčová pro pochopení vzniku pohlavních chromosomů i jejich evolučního významu.

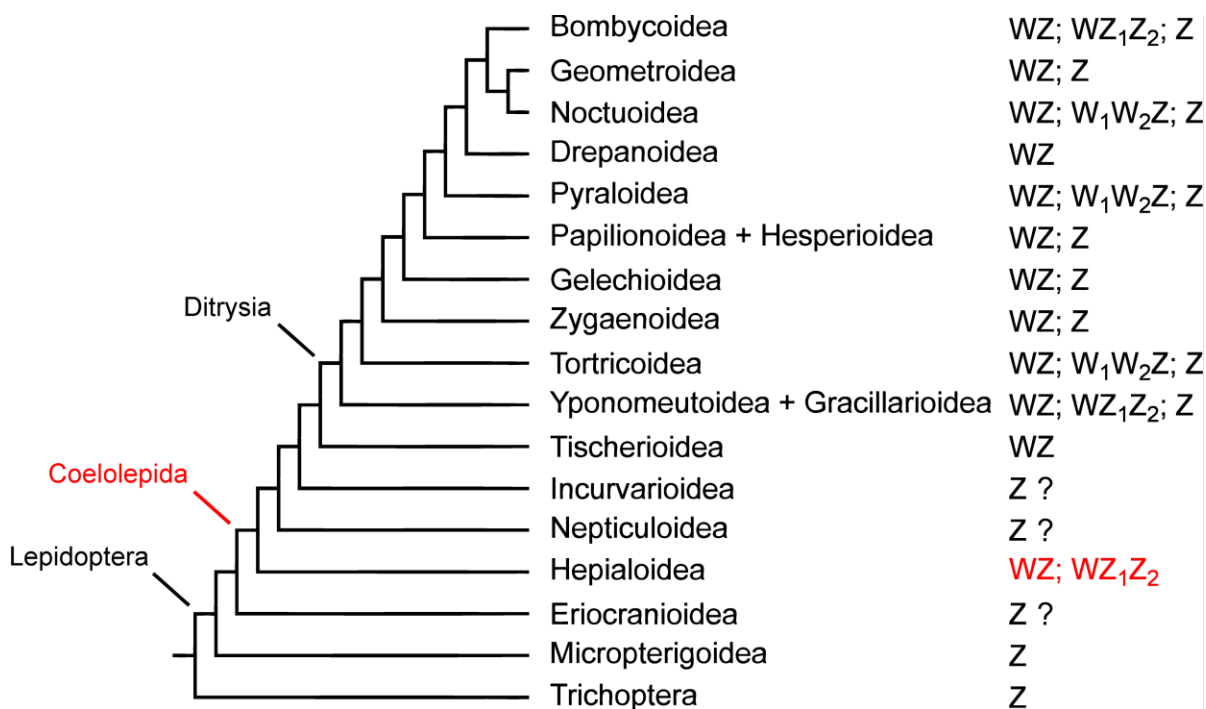
Dosavadní hypotézy postavené na distribuci pohlavně specifického karyotypu a modálních karyotypech bazálních skupin motýlů předpokládaly, že chromosom W vznikl u společného předka skupin Tischeriina a Ditrysia v důsledku chromosomální fúze nebo z B chromosomu. Chromosomální určení pohlaví typu ZZ/Z0 u bazálních motýlů bylo však v drtivé většině případů stanoveno pouze na základě absence pohlavně specifického chromatinu, což nelze považovat za jednoznačný důkaz absence chromosomu W. Nejen že výsledky této práce a dalších studií prokázaly, že k tvorbě heterochromatinového tělíska v polyploidních tkáních samic motýlů nemusí v přítomnosti chromosomu W vůbec docházet (Šíchová 2013), ale tělíska s téměř totožnou morfologií mohou u motýlů tvořit například i B-chromosomy (Voleníková 2011). Absenci pohlavně specifického chromatinu tedy není možné jednoznačně interpretovat jako absenci pohlavního chromosomu W, což zpochybňuje data, na kterých byly hypotézy o původu chromosomu W postaveny. Tato práce naopak potvrzuje dlouho opomíjenou přítomnost chromosomu W u zástupců nadčeledi Hepialoidea (cf. Traut a kol. 2007, Sahara a kol. 2012). Výsledky qPCR potvrdily vazbu genu *6PGD* na pohlavní chromosom Z u druhů *H. humuli* a *P. californicus*. Stejně tak je tento gen přítomen na chromosomu Z u všech dosud testovaných ditrysijských motýlů (viz např. Putnam a kol. 2007, Nguyen a kol. 2013, Van't Hof a kol. 2013 a další). To naznačuje že chromosomu Z hrotnokřídleců a odvozených motýlů obsahuje společný syntenní blok a tudíž má společný evoluční původ.

Ve světle nových poznatků je třeba přehodnotit stávající pohled na evoluci pohlavních chromosomů motýlů. Přítomnost chromosomu W u zástupců nadčeledi Hepialoidea naznačuje, že chromosom W vznikl už u společného předka skupiny Coelolepida, tj. motýlů skupiny Glossata charakterizovaných sosákem a absencí kusadel s vyloučením čeledi Eriocraniidae (Regier a kol. 2015) (Obr. 1). Shoda modálního karyotypu čeledi Eriocraniidae (Lukhtanov 2000) s ancestrálním karyotypem nadčeledi Hepialoidea však naznačuje, že karyotyp $2n=64$, WZ může představovat ancestrální uspořádání genomu celé skupiny Glossata. Chromosom W prokazatelně není přítomen v karyotypech

studovaných chrostíků (Marec a Novák 1998, Lukhtanov 2000) a zástupce nejbazálnější skupiny motýlů, chrostíkovníka blatouchového, *Micropterix calthella* (Traut a Marec 1997).

5.5 Perspektiva dalšího výzkumu

Výše uvedená hypotéza je testovatelná metodami klasické i molekulární cytogenetiky. Přítomnost chromosomu W v genomu zástupců čeledi Eriocraniidae lze vyvrátit jejich karyotypovou analýzou. Hypotézu o společném původu chromosomu W skupiny Coelolepida lze díky vysoké míře zachování syntenie genů v rámci motýlích genomů testovat prostřednictvím jeho partnera, chromosomu Z. K tomuto účelu bude využita i sekvence transkriptomu hrotnokřídlece *Phymatopus californicus* sestavená v rámci této práce, která umožní návrh DNA mikročipu („DNA microarray“) a následnou identifikaci pohlavně vázaných genů komparativní genovou hybridizací (cf. Baker a Wilkinson 2010). Pokud se celková syntenie genů mezi chromosomem Z hrotnokřídleců a pokročilých motýlů neprokáže, chromosom W motýlů pak s nejvyšší pravděpodobností vznikl v evoluci opakovaně. Nezodpovězenou otázkou zůstává, zda chromosom W vznikl z autosomu nebo B chromosomu. Také tuto hypotézu je možné testovat analýzou genového složení chromosomu Z. Jediným vhodným modelem pro její testování však v současnosti zůstává chrostíkovník blatouchový *Micropterix calthella*, nejprimitivnější motýl prokazatelně postrádající chromosom W.



Obrázek 1 Evoluce pohlavních chromosomů motýlů (Lepidoptera). Kladogram zobrazuje nadčeledi, u kterých byly studovány buď pohlavní chromosomy nebo výskyt pohlavně specifického heterochromatinu, společně se zjištěnými konstitucemi pohlavních chromosomů samic (dle práce Sahara a kol. 2012). Z ? - konstituce pohlavních chromosomů určena na základě pohlavně specifického heterochromatinu a vyžaduje ověření (viz Kap. 5). Červená barva označuje konstituci pohlavních chromosomů nadčeledi Hepialoidea studovanou v této práci a nově navržený původ chromosomu W u společného předka skupiny Coelolepida. Fylogenetické vztahy založeny na práci Mutanen a kol. (2010).

6. Literatura

- Abe H, Mita K, Yasukochi Y, Oshiki T, Shimada T (2005) Retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Cytogenetic Genome Research* **110**: 144-151.
- Ahola V, Lehtonen R, Somervuo P, Salmela L, Koskinen P et al. (2014) The Glanville fritillary genome retains an ancient karyotype and reveals selective chromosomal fusions in Lepidoptera. *Nature Communications* **5**: 4737.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **5**: 403-410.
- Baxter SW, Davey JW, Johnston JS, Shelton AM, Heckel DG et al. (2011) Linkage mapping and comparative genomics using next-generation RAD sequencing of a non-model organism. *PLoS ONE* **6**, e19315.
- Bazinet AL, Cummings MP, Mitter KT, Mitter CW (2013) Can RNA-seq resolve the rapid radiation of advanced moths and butterflies (Hexapoda: Lepidoptera: Apoditrysia)? An exploratory study. *PLoS One* **8**: e82615.
- Bedo DC (1983) Karyotypic and chromosome banding studies of the potato tuber moth, *Phthorimaea opercula* (Zeller) (Lepidoptera, Gelechiidae). *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **26**: 141–145.
- Beldade P, Saenko SV, Pul N, Long DA (2009) A gene-based linkage map for *Bicyclus anynana* butterflies allows for a comprehensive analysis of synteny with the lepidopteran reference genome. *PLoS Genetics* **5**: e1000366.
- Bigger TRL (1976) Karyotypes of three species of Lepidoptera including an investigation of B-chromosomes in *Pieris*. *Cytologia* **41**: 261-282.
- Bolger, AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, **30**: 2114-2120.
- Brown KS, Von Schoultz B, Suomalainen E (2004) Chromosome evolution in Neotropical Danainae and Ithomiinae (Lepidoptera). *Hereditas* **141**: 216-236.
- Brown KS, von Schoultz B, Saura AO, Saura A (2012) Chromosomal evolution in the South American Riodinidae (Lepidoptera: Papilionoidea). *Hereditas* **149**: 128-138.
- Camacho JPM (2005) B-chromosomes. In: Gregory TR (ed.) *The evolution of genome*. Elsevier, San Diego, USA, 223-386.

- Camacho C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J et al. (2009) BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* **10**: 421.
- Carabajal Paladino LZ, Nguyen P, Šichová J, Marec F (2014) Mapping of single-copy genes by TSA-FISH in the codling moth, *Cydia pomonella*. *BMC Genetics* **15**: S15.
- Carvalho AB, Clark AG (2005) Y chromosome of *D. pseudoobscura* is not homologous to the ancestral *Drosophila* Y. *Science* **307**:108-110.
- Chapman RF (2009) Foraging and Food Choice in Phytophagous Insects. In: Hardege JD (ed.) Chemical Ecology. Eolss Publishers, Oxford, UK.
- Charlesworth B (1996) The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Current Biology* **6**: 149-162
- Charlesworth B, Charlesworth D (2000) The degeneration of Y chromosome. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* **355**: 1563-1572
- Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G (2005) Steps in evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity* **95**: 118-128.
- Chopra R, Burrow G, Farmer A, Mudge J, Simpson CE et al. (2014) Comparison of de novo transcriptome assemblers in diploid and polyploid species using peanut (*Arachis* spp.) RNA-Seq data. *PLoS One* **9**: e115055.
- Coghlan A, Wolfe KH (2002) Fourfold faster rate of genome rearrangement in nematodes than in *Drosophila*. *Genome Research* **12**: 857-67.
- Dalíková M (2006) Acetylace histonu H4 na W chromosomu zavíječe moučného, *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta Jihočeské university, České Budějovice.
- d'Alençon E, Sezutsu H, Legeai F, Permal E, Bernard-Samain S et al. (2010) Extensive synteny conservation of holocentric chromosomes in Lepidoptera despite high rates of local genome rearrangements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 7680-7685.
- de Lesse H (1970) Les nombres de chromosomes dans le groupe de *Lysandra argester* et leur incidence sur la taxonomie. *Bulletin de la Société entomologique de France* **75**: 64-68.
- de Prins J, Saitoh K (2003) Karyology and sex determination. In: Kristensen NP (ed.) Lepidoptera, moths and butterflies: Morphology, physiology, and development. Walter de Gruyter, Berlin, Germany, pp. 449– 468.

- Edwards CA (1964) The bionomics of swift moths. 1 – The ghost swift moth, *Hepialus humuli* (L.). *Bulletin of Entomological Research* **55**: 147-160.
- Ellegren H (2011) Emergence of male-biased genes on the chicken Z-chromosome: Sex-chromosome contrasts between male and female heterogametic systems. *Genome Research* **21**: 2082-2086.
- Ennis TE (1976) Sex chromatin and chromosome numbers in Lepidoptera. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **18**: 119-130.
- Fayao L, Farong S, Darong Y, Yongchen L, Yaoxiong Y (1988) Study of mitotic chromosome of ghost moth. *Zoological Research* **9**: 15-20.
- Fuková I, Nguyen P, Marec F (2005) Codling moth cytogenetics: karyotype, chromosomal location of rDNA, and molecular differentiation of sex chromosomes. *Genome* **48**: 1083-1092.
- Fuková I, Traut W, Vítková M et al. (2007) Probing the W chromosome of the codling moth *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin. *Chromosoma* **116**: 135-145.
- Gasner G, Klemetson DJ (1974) A transmission electron microscope examination of Hemipteran and Lepidopteran gonial centromeres. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **16**: 457-464.
- Gilbert D (2013) Gene-omes built from mRNA seq not genome DNA. Poster session presented at: 7th Annual Arthropod Genomics Symposium, 12-15.6. 2013, Notre Dame, France.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA et al. (2011) Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology* **29**: 644-652.
- Graves JAM, Shetty S (2001) Sex from W to Z: evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. *Journal of Experimental Zoology* **290**: 449–462.
- Grimaldi DA, Engel MS (2005) Evolution of the insects. Cambridge University Press, New York, 755 pp.
- Gu L (2015) Analyses of sex chromosome dosage compensation in the codling moth, *Cydia Pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) yield insights into sex chromosome evolution in Lepidoptera. Ph.D. Thesis. Faculty of the Graduate School, Cornell University, New York, USA, 95 pp.

- Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD et al. (2013) De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols* **8**: 1494-1512.
- Harrison PW, Mank JE, Wedell N (2012) Incomplete sex chromosome dosage compensation in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella*, based on de novo transcriptome assembly. *Genome Biology and Evolution* **4**: 1118–1126.
- Hasimoto, H (1933) The role of the W-chromosome in the sex determination of *Bombyx mori*. *Japanese Journal of Genetics* **8**: 245–247.
- Henikoff S (2000) Heterochromatin function in complex genome. *Biochimica et Biophysica Acta* **1470**: O1-O8.
- Jankowska M, Fuchs J, Klocke E, Fojtová M, Polanská P et al. (2015) Holokinetic centromeres and efficient telomere healing enable rapid karyotype evolution. *Chromosoma* **124**: 519-528.
- Jiggins CD, Mavarez J, Beltran M, McMillan WO, Johnston JS, Bermingham E (2005) A genetic linkage map of the mimetic butterfly *Heliconius melpomene*. *Genetics* **171**: 557-570.
- Kaiser VB, Bachtrog D (2010) Evolution of sex chromosomes in insects. *Annual Reviews of Genetics* **44**: 91-112.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW et al. (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* **258**: 818-821.
- Kandul NP, Lukhtanov VA, Pierce NE (2007) Karyotypic diversity and speciation in *Agrodiaetus* butterflies. *Evolution* **61**: 546–559.
- Kawamura, N., 1988. The egg size determining gene, *Esd*, is a unique morphological marker on the W chromosome of *Bombyx mori*. *Genetica* **76**: 195–201.
- Kawaoka S, Kadota K, Arai Y, Suzuki Y, Fujii T et al. (2011) The silkworm W chromosome is a source of female-enriched piRNAs. *RNA* **17**: 2144-2151.
- Kawazoe A (1987) The chromosome in the primitive or microlepidopterous moth groups I. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences* **63**: 25-28.
- Kiuchi T, Koga H, Kawamoto M, Shoji K, Sakai H et al. (2014) A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm. *Nature* **509**: 633-636.

- Kristensen NP, Scoble MJ, Karsholt O (2007) Lepidoptera phylogeny and systematics: the state of inventorying moth and butterfly diversity. *Zootaxa* **1668**: 699–747.
- Kristensen NP, Skalski AW (1999) Phylogeny and palaeontology. In: Kristensen NP (ed) *Handbuch der Zoologie, a natural history of the phyla of the animal kingdom*. Vol. IV, Arthropoda: Insecta, part 35, Lepidoptera, moths and butterflies, Vol. 1: evolution, systematics and biogeography, vol IV. Walter de Gruyter, Berlin, pp 7–25.
- Kuznetsova VG, Nokkala S, Maryanska-Nadachowska A (1997) Karyotypes, sex chromosome systems and male meiosis in Finnish psyllids (Homoptera Psylloidea). *Folia biologica (Krakow)* **45**: 143-152.
- LaChance LE, Degruillier M (1969) Chromosomal fragments transmitted through three generations in *Oncopeltus (Hemiptera)*. *Science* **166**: 235–236.
- Lee J, Kiuchi T, Kawamoto M, Shimada T, Katsuma S (2015) Identification and functional analysis of a *Masculinizer* orthologue in *Trilocho varians* (Lepidoptera: Bombycidae). *Insect Molecular Biology* **24**: 561-569.
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas: Genetiskt Arkiv* **52**: 201-220.
- Lockwood APM (1961) “Ringer” solutions and some notes on the physiological basis of their ionic composition. *Comp. Biochem. Physiol.* **2**: 241-289.
- Lorković Z (1990) The butterfly chromosomes and their application in systematics and phylogeny. In: Kudrna O, editor. *Butterflies of Europe Introduction to Lepidopterology*. pp. 332–396.
- Lukhtanov VA (2000) Sex chromatin and sex chromosome systems in nonditrysian Lepidoptera (Insecta). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **38**: 73-79.
- Lukhtanov VA, Dantchenko AV, Vishnevskaya MS, Saifitdinova AF (2015) Detecting cryptic species in sympatry and allopatry: analysis of hidden diversity in *Polyommatus (Agrodiaetus)* butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, **116**: 468-485.
- Lukhtanov V, Puplesiene J (1996) Karyological peculiarities and main features of karyotype evolution in lepidopterans of the nepticuloid, tischerioid, gelechioid and tineoid complexes (Lepidoptera: Nepticuloidea, Tischerioidea, Gelechioidea s.l., Psychoidea, Gracillarioidea). *Entomologicheskoe Obozrenie* **75**: 310-323.
- Makee H, Tafesh N, Harrown N (2010) Mapping of pachytene bivalents of female codling

- moth *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lep., Tortricidae). *Journal of Applied Entomology* **134**: 182-190.
- Mank JE (2013) Sex chromosome dosage compensation: definitely not for everyone. *Trends in Genetics* **29**: 677–683.
- Marec F (2014) Developmental genetics: female silkworms have the sex factor. *Nature* **509**: 570-571.
- Marec F, Novák (1998) Absence of sex chromatin corresponds with a sex-chromosome univalent in females of Trichoptera. *European Journal of Entomology* **95**: 197-209.
- Marec F, Sahara K, Traut W (2010) Rise and fall of the W chromosome in Lepidoptera. In: Goldsmith MR, Marec F (eds.) *Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 49–63.
- Marec F, Tothová A, Sahara K, Traut W (2001) Meiotic pairing of sex chromosome fragments and its relation to atypical transmission of a sex-linked marker in *Ephestia kuehniella* (Insecta: Lepidoptera). *Heredity* **87**: 659-671.
- Marec F, Traut W (1994) Sex chromosome pairing and sex chromatin bodies in W-Z translocation strains of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). *Genome* **37**: 426-435.
- McClintock B (1939) The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **25**: 405–416.
- Mediouni J, Fukova I, Frydrychova R, Dhouibi MH, Marec F (2004) Karyotype, sex chromatin and sex chromosome differentiation in the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae). *Caryologia* **57**:184-194.
- Misov B, Liu S, Meusemann K, Peters RS, Donath A et al. (2014) Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science* **346**: 763-767.
- Mita K, Kasahara M, Sasaki S, Nagayasu Y, Yamada T et al. (2004) The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Research* **11**: 27-35.
- Murakami A, Imai HT (1974) Cytological evidence for holocentric chromosomes of silkworms, *Bombyx mori* and *B. mandarina* (Bombycidae, Lepidoptera). *Chromosoma* **47**: 167-178.
- Mutanen M, Wahlberg N, Kaila L (2010) Comprehensive gene and taxon coverage elucidates radiation patterns in moths and butterflies. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **277**: 2839-2848.
- Nagaraju J, Gopinath G, Sharma V, Shukla JN (2014) Lepidopteran sex determination: A cascade of surprises. *Sexual Development* **8**: 104-112.

- Nakasugi K, Crowhurst R, Bally J, Waterhouse P (2014) Combining transcriptome assemblies from multiple *de novo* assemblers in the allo-tetraploid plant *Nicotiana benthamiana*. *PloS One* **9**: e91776.
- Nguyen P (2013) Comparative mapping of sex-linked genes in Lepidoptera. Ph.D. Thesis. University of South Bohemia, Faculty of Science, School of Doctoral Studies in Biological Sciences, České Budějovice, Czech Republic, 60 pp.
- Nguyen P, Sahara K, Yoshido A, Marec F (2010) Evolutionary dynamics of rRNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica* **138**: 343-354.
- Nguyen P, Sýkorová M, Šíchová J, Kůta V, Dalíková M, Čapková Frydrychová R, Neven LG, Sahara K, Marec F (2013) Neo-sex chromosomes and adaptive potential in tortricid pests. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 6931-6936.
- Nilsson NO, Löstedt C, Dävring L (1988) Unusual sex chromosome inheritance in six species of small ermine moths (Yponomeuta, Yponomeutidae, Lepidoptera). *Hereditas* **108**: 259-265.
- Nokkala S, Kuznetsova V, Maryańska-Nadachowska A (2000) Achiasmatic segregation of a B chromosome from the X chromosome in two species of psyllids (Psylloidea, Homoptera) *Genetica* **108**: 181–189.
- Nokkala S, Grozeva S, Kuznetsova V, Maryańska-Nadachowska A (2003) The origin of the achiasmatic XY sex chromosome system in *Cacopsylla peregrina* (Frst.) (Psylloidea, Homoptera). *Genetica* **119**: 327–332.
- Nordenskiöld H (1963) A study of meiosis in progeny of x-irradiated *Luzula purpurea*. *Hereditas* **49**: 33–47.
- O'Connor, C (2008) Karyotyping for chromosomal abnormalities. *Nature Education* **1**: 27.
- Okazaki S, Tsuchida K, Maekawa H, Ishikawa H, Fujiwara H (1993) Identification of a pentanucleotide telomeric sequence, (TTAGG)_n, in the silkworm *Bombyx mori* and in other insects. *Molecular and Cellular Biology* **13**: 1424-1432.
- O'Neil ST, Emrich SJ (2013) Assessing *De Novo* transcriptome assembly metrics for consistency and utility. *BMC Genomics* **14**:465.
- Presgraves DC (2002) Patterns of postzygotic isolation in Lepidoptera. *Evolution* **56**: 1168-1183.

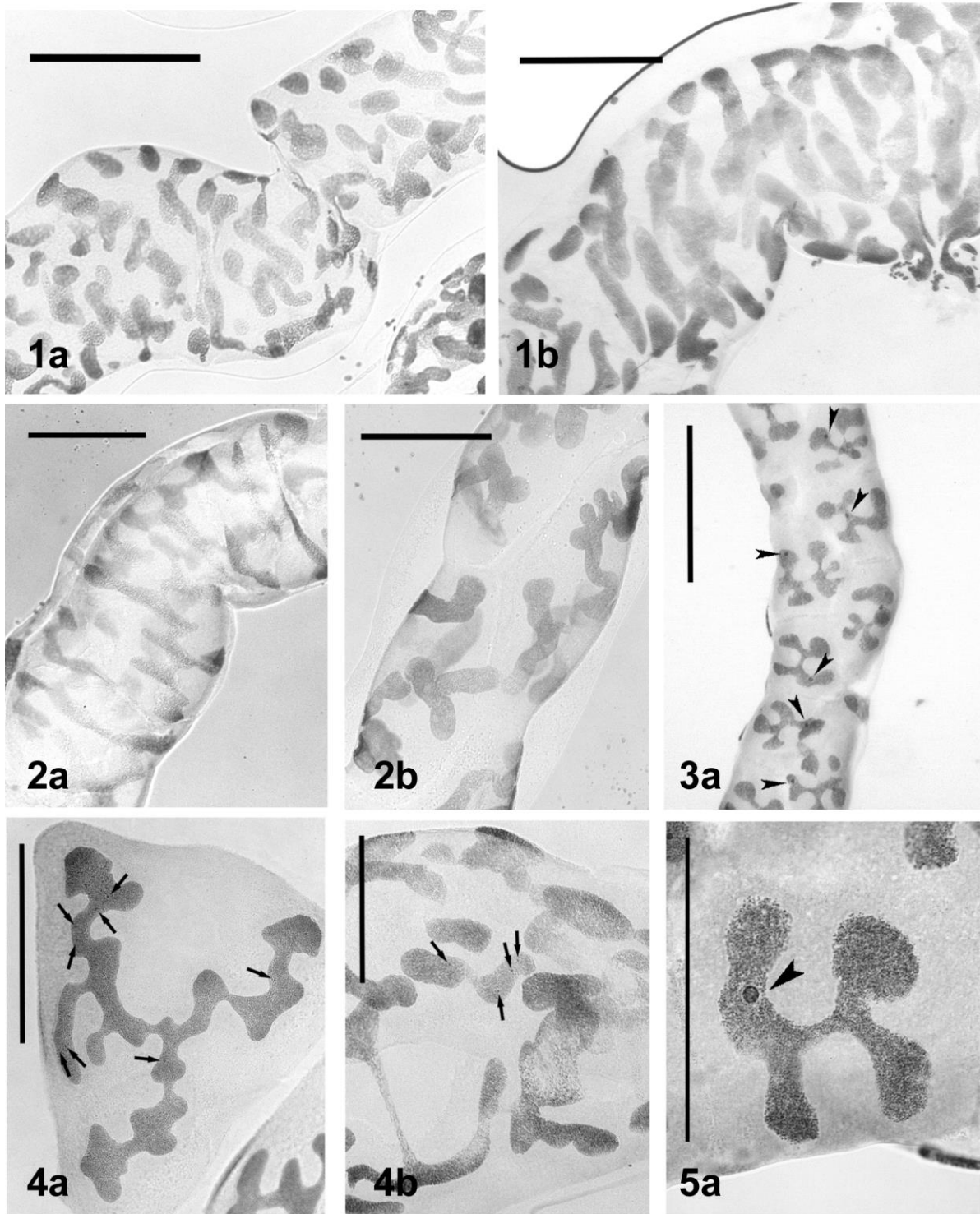
- Pringle EG, Baxter SW, Webster CL, Papanicolaou A, Lee SF et al. (2007) Synteny and chromosome evolution in the Lepidoptera: Evidence from mapping in *Heliconius melpomene*. *Genetics* **177**: 417-426.
- Provazník J (2008) Identifikace molekulárních markerů pohlavních chromosomů u vybraných druhů motýlů. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta Jihočeské university, České Budějovice.
- Putnam AS, Scriber JM, Andolfatto P (2007) Discordant divergence times among Z-chromosome regions between two ecologically distinct swallowtail butterfly species. *Evolution* **61**: 912-927.
- Putturaju HP, Nagaraju J (1985) Preliminary observations on the occurrence of B chromosome in the silkworm *Antheraea roylei* (Lepidoptera: Saturniidae). *Current Science (India)* **54**: 471-473.
- Ranz JM, Casals F, Ruiz A (2001) How malleable is the eukaryotic genome? Extreme rate of chromosomal rearrangement in the genus *Drosophila*. *Genome Research* **11**:230–239.
- Regier JC, Mitter C, Kristensen NP, Davis DR, van Neukirchen EJ et al. (2015) A molecular phylogeny for the oldest (nonditrysian) lineages of extant Lepidoptera, with implications for classification, comparative morphology and life-history evolution. *Systematic Entomology* **40**: 671-704.
- Robinson R (1971) Lepidoptera genetics. Pergamon Press, Oxford, 687 pp.
- Sahara K, Marec F, Eickhoff U, Traut W (2003a) Moth sex chromatin probed by comparative genomic hybridization (CGH). *Genome* **46**: 339-342.
- Sahara K, Marec F, Traut W (1999) TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Research* **7**: 449-460.
- Sahara K, Yoshido A, Kawamura N, Ohnuma A, Abe H et al. (2003b) W-derived BAC probes as a new tool for identification of the W chromosome and its aberrations in *Bombyx mori*. *Chromosoma* **112**: 48-55.
- Sahara K, Yoshido A, Shibata F, Fujikawa-Kojima N, Okabe T et al. (2013) FISH identification of *Helicoverpa armigera* and *Mamestra brassicae* chromosomes by BAC and fosmid probes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **43**: 644-653.
- Sahara K, Yoshido A, Traut W (2012) Sex chromosome evolution in moths and butterflies. *Chromosome Research* **20**: 83-94.

- Saura A, von Schoultz B, Saura AO, Brown KS (2013) Chromosome evolution in Neotropical butterflies. *Hereditas* **150**: 26–37.
- Sharma A, Sharma A (1980) Chromosome Techniques: Theory and Practice. Third edition. Butterworths, London, UK, 711 pp.
- Smith G, Chen YR, Blissard GW, Briscoe AD (2014) Complete dosage compensation and sex-biased gene expression in the moth *Manduca sexta*. *Genome Biology and Evolution* **6**: 526–537.
- Sperling FAH (1994) Sex-linked genes and species differences in Lepidoptera. *Canadian Entomologist* **126**: 807-818.
- Stein LD, Bao Z, Blasiar D, Blumenthal T, Brent MR et al. (2003) The genome sequence of *Caenorhabditis briggsae*: A platform for comparative genomics. *PLoS Biology* **1**: e45.
- Suomalainen E (1966) Achiasmatische Oogenese Bei Trichopteren. *Chromosoma* **18**: 201-207.
- Suomalainen E (1963) On the chromosomes of the Geometrid moth *Cidaria*. *Proceedings of the 11th International Congress of Genetics* **1**: 137-138.
- Suomalainen E (1965) On the chromosomes of the Geometrid moth *Cidaria*. *Chromosoma* **16**: 166-184.
- Šíchová J (2011) Srovnání molekulární divergence pohlavních chromosomů a autosomů u příbuzných druhů obalečů (Tortricidae). Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Jihočeské university, České Budějovice, 60 pp.
- Šíchová J, Nguyen P, Dalíková M, Marec F (2013) Chromosomal evolution in tortricid moths: conserved karyotypes with diverged features. *PLoS One* **8**: e64520.
- Šíchová J, Voleníková A, Dincă V, Nguyen P, Vila R et al. (2015) Dynamic karyotype evolution and unique sex determination systems in *Leptidea* wood white butterflies. *BMC Evolutionary Biology* **15**: 89.
- Traut W (1976) Pachytene mapping in female silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera). *Chromosoma* **58**: 275- 284.
- Traut W, Marec F (1996) Sex chromatin in Lepidoptera. *The Quarterly Review of Biology* **71**: 239–256.
- Traut W, Marec F (1997) Sex chromosome differentiation in some species of Lepidoptera (Insecta). *Chromosome Research* **5**: 283-291.

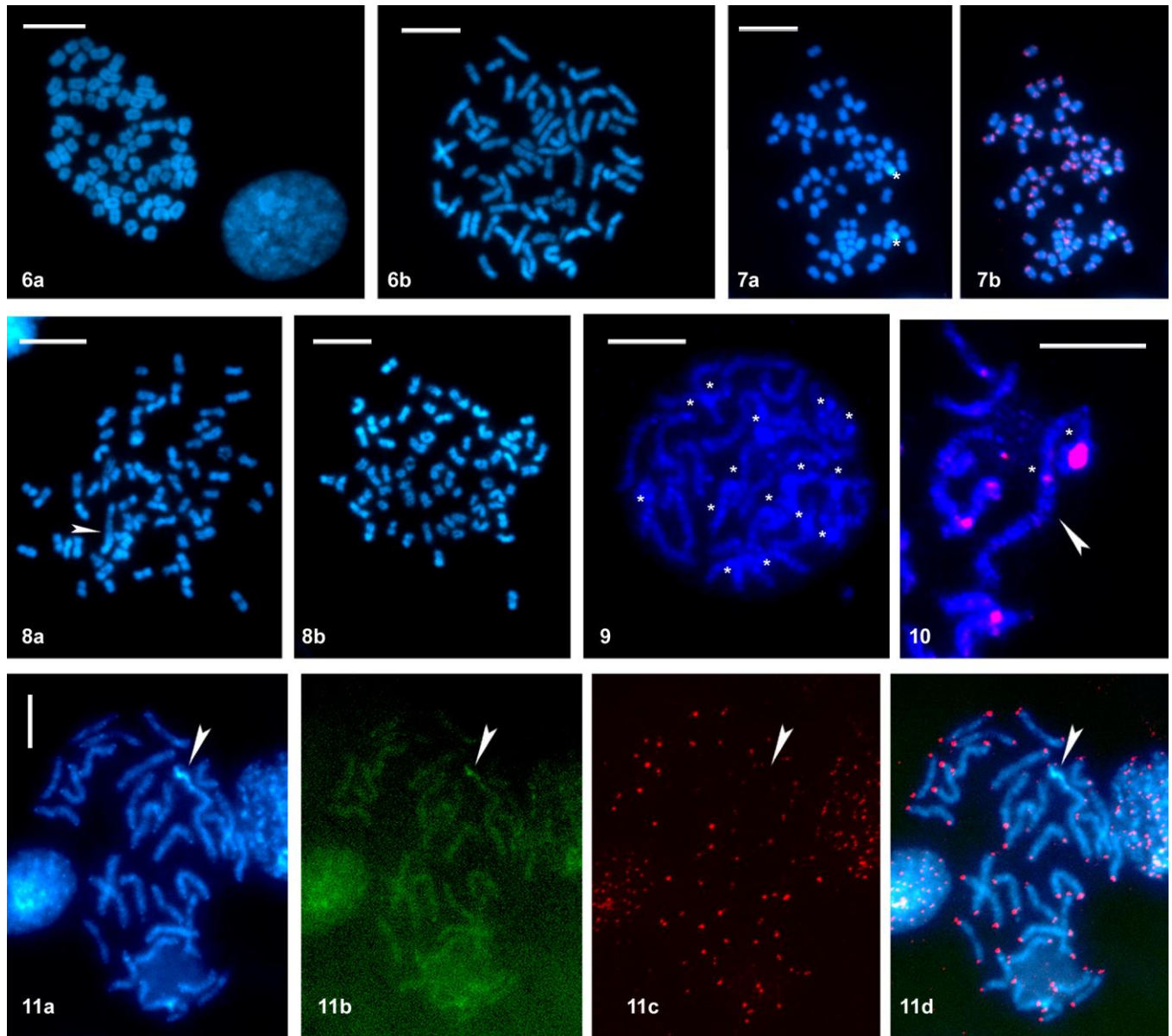
- Traut W, Mosbacher GC (1968) Geschlechts-chromatin bei Lepidepteren. *Chromosoma* **25**: 343-356.
- Traut W, Sahara K, Marec F (2007) Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sexual Development* **1**: 332–346.
- Traut W, Sahara K, Otto TD, Marec F (1999) Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma* **108**: 173-180.
- Traut W, Vogel H, Glöckner G, Hartmann E, Heckel DG (2013) High-throughput sequencing of a single chromosome: a moth W chromosome. *Chromosome Research* **21**: 491-505.
- Traut W, Weith A, Traut G (1986) Structural mutants of the W chromosome in *Ephestia* (Insecta: Lepidoptera). *Genetica* **70**: 69-79.
- van Nieukerken EJ, Kaila L, Kitching IJ, Kristensen NP, Lees DC, et al. (2011) Order Lepidoptera Linnaeus, 1758. In: Zhang ZQ, editor. Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. *Zootaxa* **3148**: 212–221.
- Van't Hof AE, Nguyen P, Dalíková M, Edmonds N, Marec F, Saccheri IJ (2013) Linkage map of the peppered moth, *Biston betularia* (Lepidoptera, Geometridae): a model of industrial melanism. *Heredity* **110**: 283-295.
- Voleníková A (2012) Aberantní výskyt heterochromatinu u zavíječe moučného, *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta Jihočeské university, České Budějovice.
- Vítková M, Fuková I, Kubičková S, Marec F (2007) Molecular divergence of the W chromosomes in pyralid moths (Lepidoptera). *Chromosome Research* **15**: 917-930.
- Wadsworth CB, Li X, Dopman EB (2015) A recombination suppressor contributes to ecological speciation in *OSTRINIA* moths. *Heredity* **114**: 593-600.
- Walters JR, Hardcastle TJ (2011) Getting a full dose? Reconsidering sex chromosome dosage compensation in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genome Biology and Evolution* **3**: 491–504.
- Walters JR, Hardcastle TJ, Jiggins CD (2015) Sex Chromosome Dosage Compensation in *Heliconius* Butterflies: Global yet Still Incomplete? *Genome Biology and Evolution* **7**: 2545–2559.
- White MJD (1973) Animal cytology and evolution. Third edition. Cambridge University Press, Cambridge, 961 pp.

- Wolf KW, Novak 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.
- Xia QY, Zhou ZY, Lu C, Cheng DJ, Dai FY et al. (2004) A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science* **306**: 1937-1940.
- Xie Y, Wu G, Tang J, Luo R, Patterson J et al. (2014) SOAPdenovo-Trans: de novo transcriptome assembly with short RNA-Seq reads. *Bioinformatics* **30**: 1660-1666.
- Yamamoto K, Nohata J, Kadono-Okuda K, Narukawa J, Sasanuma M et al. (2008) A BAC-based integrated linkage map of the silkworm, *Bombyx mori* Genome Biol 9: R21.
- Yasukochi Y, Ashakumary LA, Baba K, Yoshido A, Sahara K (2006) A second-generation integrated map of the silkworm reveals synteny and conserved gene order between lepidopteran insects. *Genetics* **173**:1319-1328.
- Yoshido A, Marec F, Sahara K (2005) Resolution of sex chromosome constitution by genomic *in situ* hybridization and fluorescence *in situ* hybridization with (TTAGG)(n) telomeric probe in some species of Lepidoptera. *Chromosoma* **114**: 193-202.
- Yoshido A, Marec F, Sahara K (2016) The fate of W chromosomes in hybrids between wild silkmoths, *Samia cynthia ssp.*: no role in sex determination and reproduction. *Heredity*: accepted 17 Nov. 2015.
- 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, Sahara K, Marec F, Matsuda Y (2011) Step-by-step evolution of neo-sex chromosomes in geographical populations of wild silkmoths, *Samia cynthia ssp.* *Heredity* **106**: 614-624.
- Yoshido A, Šíchová J, Kubíčková S, Marec F, Sahara S (2013) Rapid turnover of the W chromosome in geographical populations of wild silkmoth *Samia cynthia ssp.* *Chromosome Research* **21**: 149-164.
- You M, Yue Z, He W, Yang X, Yang G et al. (2013) A heterozygous moth genome provides insights into herbivory and detoxification. *Nature Genetics* **45**: 220-225.
- Zha X, Xia Q, Duan J, Wang C, He N, Xiang Z (2009) Dosage analysis of Z chromosome genes using microarray in silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **39**: 315-321.

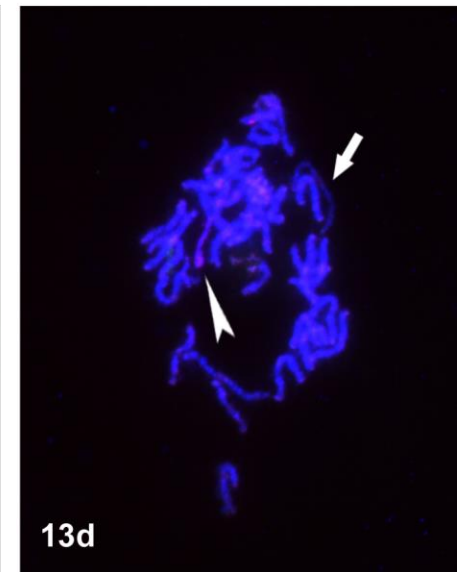
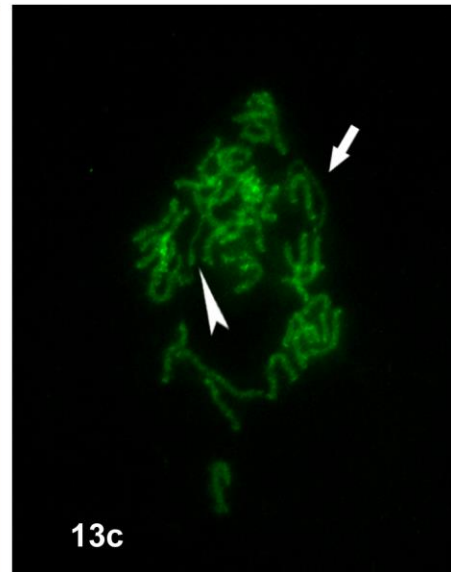
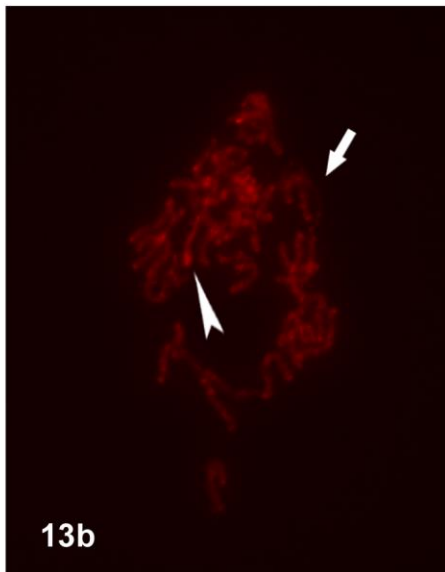
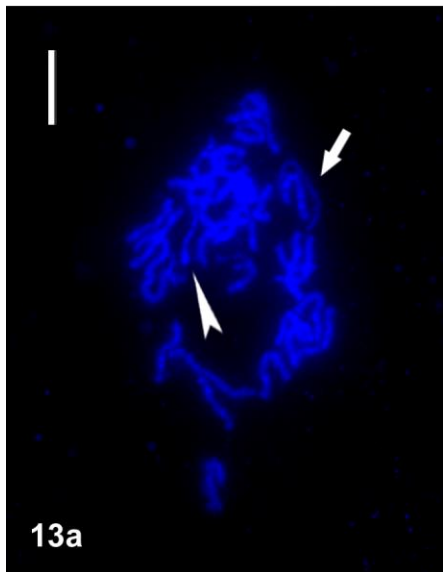
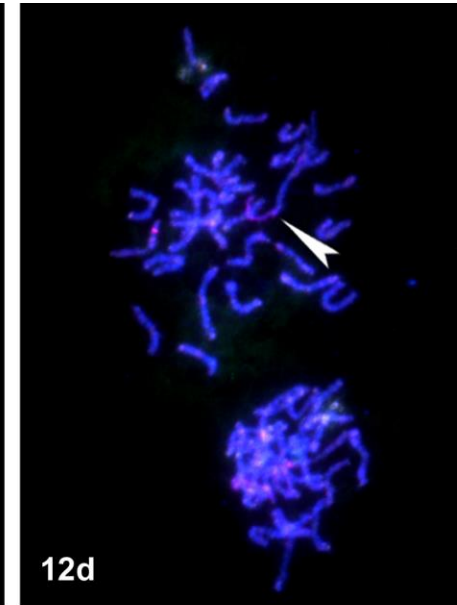
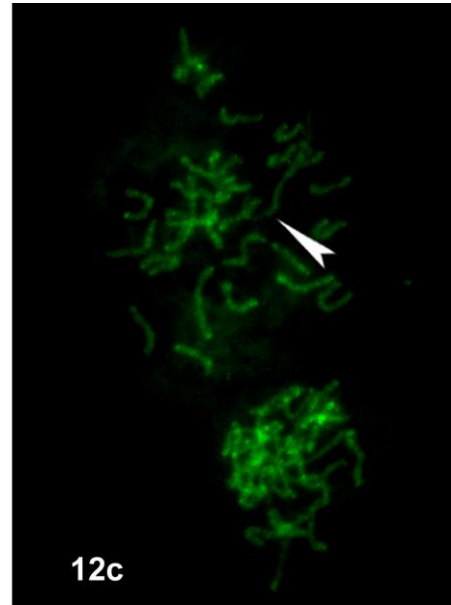
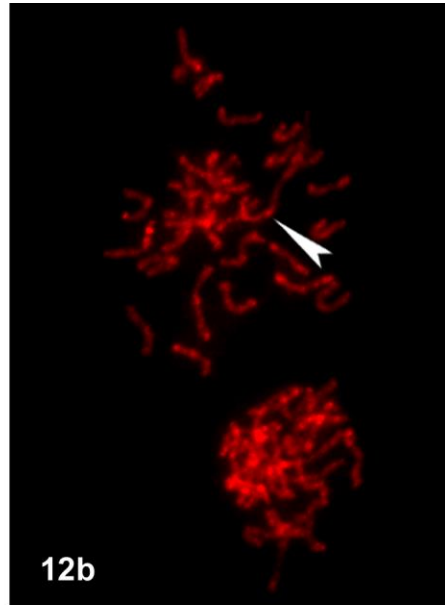
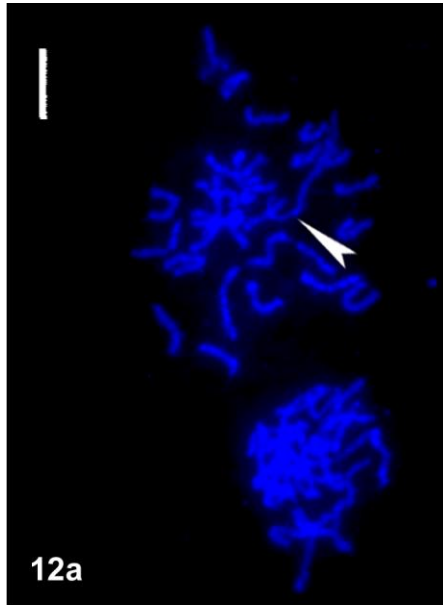
7. Příloha



Obr. 1-5. Analýza výskytu pohlavně specifického heterochromatinu na preparátech z polyploidních buněk Malpighiho trubic jedinců samičího i samčího pohlaví hrotnokřídleců druhu *Hepialus humuli* a *Phymatopus californicus*, v porovnání se zavíječem moučným, *Ephestia kuehniella* (A. Voleníková, nepublikováno). Tkáně byly ve všech případech barveny lacto-oceto-orceinem. Velikost měřítka kromě Obr. 5a odpovídá 200 μm , v případě Obr. 5a je 100 μm . **1a-b.** Polyploidní jádra Malpighiho trubic samice (**a**) a samce (**b**) hrotnokřídlece druhu *H. humuli*. Heterochromatinové tělísko nebylo ani u jednoho pohlaví přítomné. **2a-b.** Polyploidní jádra Malpighiho trubic samice (**a**) a samce (**b**) hrotnokřídlece druhu *Phymatopus californicus*. Heterochromatinové tělísko nebylo ani u jednoho pohlaví přítomné. **3a.** Polyploidní jádra Malpighiho trubic samice zavíječe moučného *E. kuehniella*. Heterochromatinová tělíska jsou na rozdíl od studovaných druhů hrotnokřídleců přítomna ve všech jádrech (označeno hroty šipek). **4a-b.** Výskyt heterochromatinových zrn (šipky) v polyploidních jádrech Malpighiho trubic u samice (**a**) a samce (**b**) hrotnokřídlece *P. californicus*. **5a.** Detail pohlavně specifického heterochromatinu na příkladu zavíječe moučného *E. kuehniella*. Heterochromatinové tělísko je označeno hrotem šipky.



Obr. 6-11. Počty chromosomů hrotnokřídleců *Hepialus humuli* a *Phymatopus californicus* a jejich základní karyotypová charakteristika. Chromosomy jsou ve všech případech pobarveny DAPI, měřítko je 10 μm . **6a-b.** Mitotický komplement samce hrotnokřídlece *H. humuli*. Počet chromosomů se rovná $2n=64$. **7a-b.** Mitotický komplement samce hrotnokřídlece *H. humuli* s vyznačenými heterochromatinovými bloky na autosomech (hvězdičky) a signálem telomerické sondy FISH (Cy3-dUTP, červený signál). **8a-b.** Mitotický komplement samice (**a**) a samce (**b**) hrotnokřídlece *P. californicus*. Počet chromosomů je $2n=63$ u samice a $2n=63$ u samce. Hrot šipky označuje neobvykle velký chromosom v samičím karyotypu, který u samce není přítomný. **9.** Heterochromatinové bločky na pachytenních bivalentech samice hrotnokřídlece *P. californicus*. Lokalizace nejvýraznějších bloků je vyznačena hvězdičkami. **10.** Detail chromosomu W u samice hrotnokřídlece *P. californicus* (chromosom označen hrotem šipky). Genomová in situ hybridizace (Cy3-dUTP, červený signál) vyznačila diferencovanou část chromosomu a malý bloček na euchomatinové části (označeno hvězdičkou). **11a-d.** Genomová in situ hybridizace kombinovaná s FISH s telomerickou sondou na pachytenních chromosomech hrotnokřídlece *P. californicus*. Hrot šipky označuje chromosom W (**a**). Diferencovaná část chromosomu W je výrazněji značena genomovou sondou (Green-dUTP, zelený signál) (**b**). Konce jednotlivých chromosomů jsou označeny telomerickou sondou (Cy3-dUTP, červený signál) (**c**). Lokalizace telomerických signálů prokazuje přítomnost trivalentu WZ_1Z_2 (**d**).



Obr. 12-13. Detailní analýza struktury chromosomu W samice hrotnokřídlece *P. californicus* pomocí komparativní genomové hybridizace. Chromosomy jsou ve všech případech pobarveny DAPI, měřítko je 10 μm . **12a-d.** Pachytenní chromosomy s vyznačeným chromosomem W (hrot šipky) (**a**). Samičí genomová sonda (Cy3-dUTP, červený signál) poskytla výrazný signál především na diferencované části chromosomu W (hrot šipky) (**b**). Samčí genomová DNA (Green-dUTP, zelený signál) značila diferencovanou část chromosomu W (hrot šipky) v porovnání s ostatními chromosomy méně, přesto však na ní byl signál detekovatelný (**c**). Přehled hybridizace všech sond, chromosom W se pravděpodobně páruje v trivalentu WZ_1Z_2 (**d**). **13a-d.** Pachytenní chromosomy s vyznačeným W (hrot šipky) a univalentem Z (šipka) (**a**). Samičí celogenomová sonda (Cy3-dUTP, červený signál) výrazně barvila diferencovanou část chromosomu W (hrot šipky), lokalizace signálu na univalentu Z_1 (šipka) byla nižší než na autosomech (**b**). Samčí celogenomová sonda (Green-dUTP, zelený signál) značila všechny chromosomy, diferencovanou část chromosomu W (hrot šipky) v porovnání s autosomálními bivalenty a univalentem Z (šipka) méně (**c**). Přehled hybridizace všech sond, chromosom W se pravděpodobně páruje v bivalentu WZ.