

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Analýza karyotypu vakonošů (Psychidae, Lepidoptera)**  
**metodami klasické a molekulární cytogenetiky**

Diplomová práce

**Bc. Martina Flegrová**

Školitelka: RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D.

České Budějovice 2017

Flegrová, M., 2017: Analýza karyotypu vakonošů (Psychidae, Lepidoptera) metodami klasické a molekulární cytogenetiky [Analysis of the karyotype of bagworms (Psychidae, Lepidoptera) by means of classical and molecular cytogenetics. Mgr. Thesis, in Czech.] 53 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

Due to their phylogenetic position, Psychidae play an important role in the investigation of the W chromosome origin in Lepidoptera. Several species of Psychidae were tested for the presence of sex-chromatin and investigated via comparative genomic hybridization. Furthermore, odd chromosome numbers and a Z univalent were observed in females. Overall, this study brings tangible evidence for the absence of the W chromosome in Psychidae, thus contributes to complex knowledge of the W chromosome evolution. In addition, karyotypes of the given species were analyzed using 18S rDNA and histone H3 probes. The results indicate relative stability of their karyotypes.

Tato práce je součástí grantového projektu GA ČR číslo 17-13713S.

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

V Českých Budějovicích dne 10.12. 2017

.....

Martina Flegrová

# **OBSAH**

1. ÚVOD .....	1
1.1. Evoluce pohlavních chromosomů.....	1
1.2. Pohlavní chromosomy motýlů.....	3
1.3. Karyotyp motýlů .....	5
1.4. Cytogenetické markery.....	6
1.4.1. Komparativní genomová hybridizace .....	7
1.4.2. Histon H3 .....	8
1.4.3. rDNA.....	9
1.5. Vakonoši (Psychidae).....	10
2. CÍLE PRÁCE .....	12
3. MATERIÁL A METODY .....	13
3.1. Pokusné organismy .....	13
3.2. Determinace druhů pomocí barcodingu.....	14
3.3. Příprava chromosomálních preparátů.....	14
3.4. Příprava preparátů z malpighických trubic.....	15
3.5. Izolace DNA .....	15
3.6. Příprava hybridizačních sond .....	15
3.6.1. Klonování .....	15
3.6.2. Značení s využitím PCR.....	17
3.6.3. Celogenomová amplifikace.....	17
3.6.4. Značení s využitím Nick-translace.....	17
3.6.5. Sekvence.....	18
3.7. FISH.....	18
3.7.1. TSA FISH.....	18
3.7.2. Nepřímá FISH – Fluorescenční in situ hybridizace s využitím protilátek .....	20
3.7.3. CGH – Komparativní genomová hybridizace.....	21
3.8. Prohlížení preparátů.....	22
4. VÝSLEDKY .....	23
4.1. Barcoding .....	23
4.2. Nepřítomnost sex-chromatinu v interfázních jádrech .....	23

4.3. Počet chromosomů.....	24
4.4. Komparativní genomová hybridizace .....	25
4.5. Počet a poloha klastrů histonu H3 .....	27
4.6. Počet a poloha klastrů 18S rDNA.....	27
5. DISKUZE.....	29
5.1. Počet a poloha klastrů histonu H3 .....	29
5.2. Počet a poloha klastrů 18S rDNA.....	30
5.3. Absence chromosomu W .....	31
5.4. Význam práce pro teorii o vzniku W .....	34
6. ZÁVĚR.....	37
7. POUŽITÉ ZDROJE.....	39
8. PŘÍLOHY.....	48

## PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala v první řadě své školitelce Magdě Zrzavé za odborné vedení, za to že na mě vždy měla čas i trpělivost a průběžně mě povzbuzovala a motivovala. Celému kolektivu naší laboratoře chci poděkovat za uvolněnou atmosféru a za přátelské pracovní prostředí. Velký dík jmenovitě patří Martině Dalíkové, Irence Hladové, Aničce Voleníkové, Jindře Šichové a Monice Štackové za obrovskou pomoc při experimentální části mé práce a za (nejen) odborné konzultace. Dále děkuji Pavlovi Potockému, který mě naučil vakonoše poznávat a sbírat, a všem svým přátelům kteří se na sbírání vakonošů podíleli. Za svědomitou péči o laboratorní chovy děkuji Marii Korchové, a za zaštitění a financování celé práce Františku Marcovi. Poslední a největší dík patří mé rodině a mému příteli za to, že mě celou dobu podporovali a stáli při mě v dobrém i ve zlém, protože bez jejich podpory by tato práce nemohla nikdy vzniknout.

# 1. ÚVOD

## 1.1. Evoluce pohlavních chromosomů

Pohlavní chromosomy hrají klíčovou roli v chromosomálním určení pohlaví jedince a významně ovlivňují jeho plodnost a expresi pohlavně vázaných znaků. V průběhu evoluce eukaryot se objevily mnohokrát, a to nezávisle na sobě. Podle obecně přijímané hypotézy celý proces začíná tím, že jeden z autosomů získá faktor určující pohlaví (Charlesworth, 1991). Postupně se tento nový faktor dostává do těsné vazby s geny pohlavně-specifickými. Protože je výhodné tyto geny předávat společně, v heterogametickém pohlaví je výrazně omezena či zcela zastavena rekombinace na pohlavních chromosomech (Rice, 1987). Chybějící rekombinace však neodvratitelně odstartuje degenerační proces pohlavně specifického chromosomu (Y nebo W). Dochází k hromadění více či méně škodlivých/nefunkčních alel, které jsou v těsné vazbě na geny určující pohlaví. Tyto nevýhodné mutace nemohou být efektivně odstraněny ozdravným procesem rekombinace, jako se tomu děje např. u chromosomů Z nebo X (ty tráví 2/3 svého “evolučního času” v homogametickém pohlaví, kde normálně rekombinují). Výsledkem je potom vysoce degenerovaný, z velké části heterochromatizovaný chromosom s velkým podílem repetitivních sekvencí (mobilních elementů a satelitů) a minimálním počtem funkčních genů. Tento proces může případně vyústit až v úplnou ztrátu pohlavního chromosomu (v případě, že pohlaví určující faktor získá jiný autosom) a celý cyklus se může opakovat. Řád motýli představuje ideální skupinu pro studium evoluce pohlavních chromosomů, protože je velmi druhově i geneticky rozmanitý, a tím umožňuje pozorovat evoluční mechanismy v různých stádiích (Sahara a kol., 2012; Wright a kol., 2016).

Alternativní možností je vznik pohlavního chromosomu z B chromosomu. Tyto nadpočetné, postradatelné elementy se narozdíl od autosomů vyskytují v buňce nepravidelně a obvykle nemají žádný vliv na výsledný fenotyp (Bhat a Wani, 2017; Pansonato-Alves a kol., 2014). Příležitostně se B chromosomy mohou podílet na určení pohlaví. Například u cichlid ve Viktoriině jezeře bylo zjištěno, že jejich B chromosomy nesou funkční protein-kódující geny a vyskytují se pouze v samičích buňkách. Pravděpodobně se zde jedná o proto-pohlavní chromosomy, které budou v průběhu evoluce dále formovány (Yoshida a kol., 2011).

Podobnými případy jsou octomilka, kde osekvenování chromosomu Y podpořilo hypotézu o jeho vzniku specializací B chromosomu, a nikoliv degenerací homologního X (Carvalho, 2002); nebo mera přelétavá (*Cacopsylla peregrina*), kde Y vznikl z B chromosomu, který se v meióze začal párovat s chromosomem X (Nokkala a kol., 2003).

Existují dva základní typy chromosomálního určení pohlaví – systém XX/XY a WZ/ZZ. Systém XX/XY, kde heterogametické pohlaví zastupuje samec, se vyskytuje častěji, a uplatňuje ho např. většina hmyzu nebo téměř všichni savci včetně lidí (Blackmon a kol., 2016). Systém WZ je o něco vzácnější; vyskytuje se například u motýlů, hadů či ptáků. Heterogametickým pohlavím je zde samice, chromosomální konstituce jedinců je WZ/ZZ (samice/samec) (Traut a kol., 2008).

Ačkoliv jsou chromozomy W a Y považovány za rozhodující prvek při určování pohlaví, skutečná míra jejich relevance se mezidruhově velmi liší. Učebnicovým příkladem může být právě řád motýli (Lepidoptera). Na jedné straně existují druhy, pro které je přítomnost chromosomu W jednoznačným signálem k vývoji samičího pohlaví – například u bource morušového (*Bombyx mori*) se embryo obsahující chromosom W bude vždy vyvíjet v samici, a to nezávisle na počtu chromosomů Z (Traut a kol., 2008). Na straně druhé byly prokázány i případy, kdy přítomnost chromosomu W nehraje vůbec žádnou roli v určení pohlaví. Ve své nedávné práci Yoshido a kol. (2016) pozorovali výsledky recipročního křížení mezi dvěma poddruhy martináče *Samia cynthia* se zaměřením na chromosomy W a neo-W. Kromě očekávaných výsledků našli mezi hybridy nejen samice, u kterých se W ani neo-W nevyskytovalo, ale i samce, kteří měli oba tyto “samičí” chromosomy. Prokázali tak, že výskyt W či neo-W u daného druhu nemá vliv ani na určení pohlaví, ani na jeho fitness. Bohužel, u většiny druhů motýlů nejsou k dispozici data, která by u nich umožnila důležitost chromosomu W posoudit.

## 1.2. Pohlavní chromosomy motýlů

Chromosomální určení pohlaví s heterogametickými samicemi je u hmyzu poměrně vzácné a výhradně ho mají pouze dva řády, motýli a jejich sesteský řád chrostíci (Trichoptera) (Traut a kol., 2008). Většina zkoumaných druhů ze skupin Tischeriidae a Ditrysia, které dohromady tvoří téměř 98% z celkového počtu řádu Lepidoptera, má chromosomální konstituci WZ/ZZ (samice/samec). Druhou variantou je konstituce Z/ZZ, která je považována za ancestrální stav a vyskytuje se především u bazálních skupin jako jsou např. chrostíkovníci (Micropterigidae). Odhaduje se, že se tento systém určení pohlaví u motýlů a chrostíků vyvinul již před 180 mil. let, přičemž samičí chromosom W se stal součástí systému až o poznání později, odhadem před 100 mil. let (Sahara a kol., 2012).

Evolučně starší chromosom Z je svou stavbou podobný autosomům a leží na něm množství genů (Traut a kol., 2008). Jejich syntenie je v rámci řádu motýlů velmi konzervovaná, stejně jako u genů na ptačím chromosomu Z (Nanda a kol., 2008) nebo u genů na savčím chromosomu X (Mácha a kol., 2012). Rozsáhlé studie provedené srovnáváním různých druhů s modelovým druhem *B. mori* potvrdily zachovalou syntentii genů na Z, s několika málo výjimkami u okáče *Bicyclus anynana* a zavíječe *Ostrinia nubilalis* (Beldade a kol., 2009). Ve své letošní práci dospěli ke stejným závěrům i Dalíková a kol. (2017), porovnávající pět vybraných genů ležících na Z, a Fraïsse a kol. (2017), kteří provedli komparativní analýzu genomů u tří fylogeneticky vzdálených druhů motýlů a potvrzují u nich společný původ Z. Chromosom Z hraje důležitou roli i ve speciaci. Obsahuje totiž například geny kontrolující produkci feromonů, jejich rozpoznávání a voltinismus (Yasukochi a kol., 2011).

Samičí chromozom W je oproti tomu tvořen převážně mobilními elementy. Narozdíl od chromosomu Z nese jen velmi málo genů (Traut a kol., 2008). Nejznámějším příkladem je feminizační faktor *Fem*, který byl u *B. mori* pomocí deleční mapování lokalizován na malé oblasti chromosomu W; jeho přesné určení se ale velmi dlouho nedařilo (Abe a kol., 2010; Tazima, 1964). Až v roce 2014 byl objeven gen pro piRNA, který slouží jako primární signál k vývoji samičího pohlaví. Jedná se tak o vůbec první objevený případ, kdy je pohlaví určováno pomocí nekódující RNA namísto proteinu (Kiuchi a kol., 2014; shrnuto v Marec, 2014). Umístění některých dalších genů na W již bylo definitivně potvrzeno, a u jiných se tak na

základě dědičnosti několika samičích znaků předpokládá (např. Kawamura, 1988; Sahara a Traut, 2001).

Typickým znakem chromosomu W je jeho převážná heterochromatinizace (Traut, 1999). U pohlavních chromosomů jde o běžný jev, který lze využít při jejich identifikaci (ať se jedná o meiotické nebo mitotické chromosomy). V polyploidních somatických buňkách vytváří W takzvaný sex-chromatin, jehož velikost se zvyšuje se stupněm ploidie buňky. Traut a Marec v roce 1996 provedli rozsáhlou studii, kde sledovali přítomnost sex-chromatinu u 238 druhů, a dospěli k závěru, že sex-chromatin je vhodným orientačním indikátorem přítomnosti W. Korelace mezi absencí sex-chromatinu a absencí chromozomu W byla na základě Z univalentu u chrostíků Trichoptera prokázána o dva roky později (Marec a Novák, 1998). Následně byl sex-chromatin použit ve více pracech jako indikátor přítomnosti a stavu chromosomu W (Lukhtanov, 2000; Makee a Tafesh, 2007). Nicméně několik pozdějších studií dokázalo, že se vždy nemusí jednat o spolehlivý marker – například u hrotnokřídlece *Phymatopus californicus* (Hepialidae) byl chromosom W detekován pomocí komparativní genomové hybridizace, a to navzdory jednoznačné absenci sex-chromatinu v samičích somatických buňkách (Voleníková, 2015). Z dostupných zdrojů vyplývá, že detekce sex-chromatinu je užitečná pro prvotní screening při určování přítomnosti W, ale nelze ji použít jako univerzální a jednoznačný zdroj informací.

O původu a stáří chromosomu W existuje více teorií. V úvahu připadají buď fúze chromosomu Z s autosomem (Traut, 1999), nebo vznik W z B chromosomu, který se začal párovat s chromosomem Z (Lukhtanov, 2000). Původ W se obecně datuje ke skupině Euheteroneura (zahrnující Ditrysia a Tischeriidae; Sahara a kol., 2012). Existují však nepřímé důkazy o absenci W u některých bazálních Ditrysia (např. u Psychidae), a naopak byla přítomnost W prokázána u dvou druhů hrotnokřídleců Hepialidae navzdory jejich velmi bazální pozici v rámci skupiny motýlů (Dalíková a kol., 2017; Traut a Marec, 1996; Voleníková, 2015). Ověření homologie W u těchto skupin bohužel není možné, jednoduše kvůli repetitivní povaze W a jeho dynamické evoluci, která umožňuje jen částečné srovnání pouze u velmi příbuzných druhů. Vítková a kol. (2007) provedli srovnání homologie v rámci skupiny zavíječů Pyralidae pomocí Zoo-FISH a odhalili částečnou homologii u několika blízkých druhů, ale téměř žádnou u druhů



vzdálenějších. Původ chromosomu W je v současnosti předmětem intenzivního výzkumu, přičemž klíčovými skupinami jsou právě bazální Ditrysia.

### 1.3. Karyotyp motýlů

Řád motýli (Lepidoptera) je jednou z nejpočetnějších skupin v rámci hmyzu. Přesto se z cytogenetického hlediska stále jedná o nepříliš probádanou skupinu, a to především díky několika technickým obtížím, které studium cytogenetiky znesnadňují. Identifikace jednotlivých chromosomů je totiž obvykle založena buď na výskytu určitého počtu heterochromatinových bloků, které dohromady vytváří specifický vzor (např. metoda C-pruhování), a nebo na poloze centromery (Bickmore, 2001; Levan a kol., 1964). Tyto metody však u motýlů selhávají hned ze dvou důvodů: typické chromosomy motýlů jsou holokinetické (tzn. postrádají centromeru), a kromě chromosomu W neobsahují větší množství heterochromatinu; navíc jsou malé a uniformní (Sharma a kol., 2002; Wolf a kol., 1997). Navzdory tomu existuje několik dřívějších cytogenetických studií, kde se autorům podařilo vzor na chromosomech využít - například T. Bigger (1976) ve své práci popisuje specifické G-pruhování mitotických chromosomů u běláška zelného, *Pieris brassicae*. Celkově se však spíše jedná o výjimky na poli motýlí cytogenetiky, a reprodukce podobných výsledků není spolehlivá.

Karyotyp motýlů zůstává v průběhu evoluce poměrně silně konzervován. Důkazy o tom přinášejí rozsáhlé studie zabývající se syntenii genů – v tomto ohledu nejzásadnější poznatky přinesla práce Pringle a kol. z roku 2007. U babočky *Heliconius melpomene* bylo mapováno celkem 72 genů, přičemž všechny zkoumané geny vykazovaly vysoce konzervovanou syntentii s referenčním genomem *Bombyx mori*. Zároveň prokázaly i šest případů chromosomálních fúzí, které byly předpokládány vzhledem k rozdílnému počtu chromosomů u *B. mori* (n=28) a *H. melpomene* (n=21). K podobným závěrům dospělo i mnoho dalších navazujících studií; například mapování syntenie pomocí BAC-FISH u *B. mori* a *Manduca sexta* (Yasukochi a kol., 2009), analýza syntenie pomocí BAC chromosomů mezi *B. mori*, *Helicoverpa armigera* a *Spodoptera frugiperda* (d'Alençon a kol., 2010) nebo nové práce zaměřené na

syntenii genů na chromosomu Z (Dalíková a kol., 2017; Fraïsse a kol., 2017). Vysoká míra konzervovanosti napříč motýlími druhy naznačuje, že jejich chromosomy mají pravděpodobně specifické vlastnosti, díky kterým zůstává syntenie zachována (Voleníková, 2015).

## 1.4. Cytogenetické markery

Výzkum cytogenetiky u motýlů byl po dlouhou dobu omezen jen na počítání či měření chromosomů. Jediným používaným markerem byl sex-chromatin, který lze barvit lakto-aceto-orceinem a pozorovat světelnou mikroskopií v interfázních jádrech, kde indikuje přítomnost chromosomu W (Traut a Marec, 1996). Skutečný průlom nastal až s příchodem flouorescenčních metod, tedy flouorescenční in situ hybridizace (FISH) a jejich modifikací.

Oblíbenou variantou pro modelové druhy motýlů se stala tzv. BAC FISH, která využívá knihovnu z bakteriálních umělých chromosomů. Robustnost signálů je zajištěna dlouhým insertem (100-200 kb) používaným k výrobě sond. BAC FISH byla úspěšně použita pro mapování genů např. u *B. mori* (Yoshido a kol., 2005). Konstrukce BAC knihovny je však velmi nákladná a časově náročná, takže pro použití u nemodelových druhů není vhodná. V případě studia pohlavních chromosomů existuje hned několik možností. Jednou z nich je GISH – genomová in situ hybridizace, která využívá kompetice značené samičí sondy s nadbytkem neznačené samčí sondy o cílové chromosomální sekvence. Ve výsledku značená sonda zvýrazní pouze sekvence, které jsou specifické pro samici, tzn. části chromosomu W. GISH byla úspěšně použita pro detekci chromosomu W u několika druhů motýlů (např. Yoshido a kol., 2006). Další možností je FISH s W-specifickou sondou připravenou laserovou mikrodisekcí sex chromatinu z polyploidních interfázních jader (Fuková a kol., 2007), nebo komparativní genomová hybridizace (CGH). Kromě pohlavních chromosomů lze pomocí FISH analyzovat celou škálu dalších komponent genomu. Pro prvotní screening přestaveb karyotypu, případně aktivity mobilních elementů, je vhodné použít univerzální konzervované markery jako například geny pro histon H3 nebo rDNA.

### 1.4.1. Komparativní genomová hybridizace

CGH je fluorescenční metoda založená na soupeření sond připravených ze dvou jedinců při hybridizaci na chromosomy stejného druhu. V případě, že jsou jejich genomy totožné, obě sondy naznačí preparát rovnoměrně; pokud se genomy v určité části odlišují, jedna ze sond zde bude hybridizovat silněji. Tato skutečnost je hojně využívána například při diagnostice nádorů (shrnuto ve van Beers a Nederlof, 2006), ale také při studiích pohlavních chromosomů. U motýlů se CGH výborně osvědčila jako nástroj k jejich identifikaci, mimo jiné i kvůli nepoužitelnosti proužkovacích metod nebo velikostních rozdílů (Traut a kol., 2001).

Již v roce 1999 provedli Traut a kol. v rámci své studie analýzu pohlavních chromosomů pomocí CGH u zavíječů *Ephesia kuehniella* a *Galleria mellonella* a u bource *B. mori*. U všech tří druhů byli schopni jasně determinovat pachytenní chromosom W, který byl silně značen samičí sondou. Do určité míry ho slabě naznačila i samčí sonda, což autoři připisují vysokému podílu běžných repetitivních sekvencí nashromážděných na W. Oproti tomu, chromosom Z nevykazoval od autosomů téměř žádný rozdíl v hybridizaci - o něco silněji byl částečně značen pouze u *E. kuehniella*. Podobně byla CGH využita v mnoha dalších studiích (Mediouni a kol., 2004; Šíchová a kol., 2015; Traut a kol., 2001), hybridizace byla dokonce provedena i na sex-chromatinu v interfázních jádrech (Sahara a kol., 2003).

Vysokou míru běžných repetitivních sekvencí ve své práci popisují i Fuková a kol. (2005), kteří u obaleče *Cydia pomonella* zaznamenali rovnoměrnou hybridizaci sond na chromosomu W. Lze tedy tvrdit, že metoda CGH nám kromě identifikace pohlavních chromosomů navíc poskytuje přibližnou informaci o jejich složení (Vítková a kol., 2007).

### 1.4.2. Histon H3

Histonový protein H3 je součástí histonového oktameru, který společně s vláknem DNA tvoří tzv. nukleosom - základní jednotku chromatinového vlákna. Histony hrají důležitou roli v kompaktaci chromatinu, a tak umožňují nebo naopak brání interakci specifických proteinů s genomovou DNA (Luger a kol., 1997). Jednou z funkčních domén histonového proteinu je N-konec, který často podléhá post-translačním modifikacím jako je např. fosforylace, metylace či acetylace. Tyto modifikace dále ovlivňují široké spektrum buněčných pochodů (transkripci, dekonduzaci a kompaktaci chromosomů při buněčném dělení atd.) (Nowak a Corces, 2000; Turner, 2000; shrnuto v Hans a Dimitrov, 2001). Původ histonu H3 se datuje až k poslednímu společnému eukaryotickému předku (LECA), a jeho funkční domény zůstávají silně konzervovány napříč všemi eukaryotickými organismy (Waterborg, 2012). Nejen díky tomu je histon H3 oblíbeným cytogenetickým markerem - rozdíly v jeho chromosomální distribuci navíc poměrně přesně odráží evoluční změny v karyotypu (Zhang a kol., 2007). Na základě toho lze pomocí metody FISH odhalit chromosomální inverze, translokace nebo genomové duplikace.

Chromosomální distribucí histonového genu H3 u hmyzu se zabývalo již mnoho prací. Například Castillo a kol. (2017) je zkoumali u sarančat rodu *Dichroplus* a u všech druhů našli jediný intersticiální klastr; podobné výsledky uvádí ve své práci Cabral-de-Mello a kol. (2011) u vrubounů Scarabaeinae, v jejichž případech byly lokalizovány buď jeden nebo maximálně dva klastry. U řádu Lepidoptera však existuje jen několik málo studií – Šíchová a kol. (2013) v rámci studia evoluce karyotypu obalečů Tortricidae našli jediný klastr, který se mírně lišil pouze svou polohou na autosomu (intersticiální/subtelomerický). Ve své pozdější práci se Šíchová a kol. (2015) zabývali rodem *Leptidea*, který se vyznačuje nestabilním karyotypem, a odhalili signifikantní variabilitu v lokalizaci histonu H3 nejen mezi druhy, ale dokonce i mezi potomky jedné samice *L. sinapsis*. Z výsledků výše uvedených prací vyplývá, že histonové geny jsou dobrým markerem dynamiky karyotypové evoluce, protože jejich reorganizace odráží evoluční přestavby genomu (Hladová, 2015). Obecně je histon H3 považován za silněji konzervovaný marker než například ribosomální RNA, a jako možné vysvětlení je navrhována silná purifikující selekce (Waterborg, 2012).

### 1.4.3. rDNA

Geny pro ribosomální RNA (rDNA) jsou v tandemových kopiích uspořádány v jednom nebo více regionech organizátoru jadérka (dále jen NOR). Barvení NOR stříbrem patří mezi jednu z klasických cytogenetických technik, využívaných například při diagnostice nádorů (Trerè, 2000). Díky vysoce konzervované nukleotidové sekvenci je rDNA dobrým markerem i pro fluorescenční metody.

Chromosomální distribuce rDNA může být vodítkem k odhalení chromozomálních fúzí či rozpadů. Informace o nich nám společně s celkovým počtem chromosomů mohou poskytnout představu o tom, jak dynamickou evolucí karyotyp procházel a na kterých chromosomech docházelo nejčastěji ke změnám (Bombarová a kol., 2007). Nguyen a kol. provedli v roce 2009 rozsáhlou studii zabývající se distribucí rDNA u 18 druhů motýlů za použití 18S rDNA sondy z obaleče *Cydia pomonella*. Karyotypy s jediným NOR měly častěji klastr rDNA umístěn intersticiálně, narozdíl od karyotypů s dvěma NOR, které vykazovaly spíše terminálně umístěnou rDNA. U některých druhů byly nalezeny nové, převážně terminální klastry, a to bez odchylek od modálního počtu chromosomů  $n=31$  (Lukhtanov, 2000). Tato skutečnost vylučuje chromozomové fúze jakožto hlavní evoluční mechanismus expanze rDNA; namísto nich Nguyen a kol. navrhuje ektopickou rekombinaci (homologní rekombinaci repetitivních sekvencí u nehomologních chromosomů). Další významnou systematickou studii rDNA motýlů je diplomová práce I. Hladové (2015), která mapovala geny u 24 druhů motýlů a jednoho druhu chrostíka za použití 18S rDNA sondy z obaleče *Cydia pomonella*. Na základě získaných výsledků určila jeden terminální klastr rDNA jako ancestrální stav. Kromě toho pozorovala širokou variabilitu v umístění i počtech klastrů mezi jednotlivými druhy, z čehož usuzuje, že evoluce rDNA genů je velmi dynamická.

Schopnost klastrů rDNA měnit svou polohu v rámci chromosomu (např. inverzí) i počet byla popsána již v roce 1984 u česneku, kde autor studie popisuje vysokou variabilitu mezi dvěma druhy a jejich hybridy. Pozorovanou skutečnost vysvětluje aktivitou mobilních elementů (Schubert, 1984). Navazující studie potvrzují, že mobilní elementy skutečně stojí za šířením a relokací genů rDNA i u dalších rostlinných a živočišných druhů (Eickbush a Eickbush, 2007; Pérez-González a Eickbush, 2001; Roa a Guerra, 2012).

## 1.5. Vakonoši (Psychidae)

Vakonoši (Psychidae) jsou malá skupina nočních motýlů, která se řadí mezi bazální Ditrysia. Charakteristickým znakem larválního stádia vakonošů je stavba druhově specifických vaků z hedvábí a přírodních materiálů, pomocí kterých lze vakonoše alespoň částečně identifikovat. Jedná se o čeleď s neobyčejně vyvinutým pohlavním dimorfismem; více než u poloviny druhů se vyskytují bezkřídle samice, které ani po dosažení dospělosti neopouštějí svůj vak (Rhainds a kol., 2009). Druhotná ztráta křídel u samic se objevuje u dalších 25 čeledí motýlů, přičemž u vakonošů se vyskytuje spíše u fylogeneticky mladších druhů – bazální druhy obvykle mívají okřídlené samice (Sattler, 1991). Vývoj křídelních imaginálních disků se v larválním stádiu odehrává u obou pohlaví velmi podobně až do předposledního instaru, kdy začnou samičí imaginální disky namísto rychlé proliferace stagnovat a nakonec se stanou součástí epidermis (Niitsu, 2003).

Dalším zajímavým rysem celé skupiny je opakovaný, nezávislý vznik partenogeneze. Ten byl detailněji popsán například u druhů *Dahlica fenicella* (Chevasco a kol., 2013) nebo *Dahlica triquetrella* (Grapputo a kol., 2005), která se vyznačuje existencí partenogenetických i sexuálně se rozmnožujících populací v rámci Evropy. Na základě významných rozdílů mitochondriální DNA se předpokládá, že tyto partenogenetické populace vznikaly nezávisle na sobě (Elzinga a kol., 2013). Pro studium pohlavních chromosomů partenogenetické populace představují určitou limitaci, protože díky absenci samčího genomu u nich nelze aplikovat metodu CGH.

Životní cyklus vakonošů trvá přibližně rok, a během něj přijde na svět pouze jediná generace. S příchodem jara začínají larvy vylézat na své hostitelské rostliny, kde se začátkem léta zakuklí a zanedlouho na to vylíhnou. Dospělá imaga žijí velmi krátce – nepřijímají potravu a hynou prakticky ihned po páření. Samice těsně před tím naklade vajíčka do vaku, a larvy, které se z nich vylíhnou, se ukryjí v detritu, kde přezimují (Macek, 2009).

V našich geografických podmínkách se z ekonomického hlediska nejedná o příliš významnou skupinu; ojediněle bylo hlášeno několik případů napadení ovocných sadů vakonošem *Apterona crenulella*, naposledy však v roce 1953 (Manitera.cz, 2017). Naopak v tropických oblastech se jedná o velmi obávané škůdce – například na palmových plantážích v Malajsii představují

vakonoši vážnou ekonomickou hrozbu a jejich kontrola pomocí feromonových pastí nebo přirozenými predátory je předmětem intenzivního studia (Cheong a kol., 2010; Kamarudin a kol., 2010; Sankaran, 1970).

Z cytogenetického hlediska se jedná o velmi málo prostudovanou skupinu. Obecně přijímaným tvrzením je, že vakonoši mají chromosomální konstituci  $Z/ZZ$  (samice/samec). Toto tvrzení se ale opírá pouze o nepřímé důkazy absence  $W$  - primárně se jedná o lichý počet chromosomů u samic (Seiler, 1919), a sekundárně o absenci sex-chromatinu v somatických jádrech (Traut a Marec, 1996). Solidní cytogenetická data na bázi fluorescenčních metod však zatím zcela chybí, a proto není možné přítomnost chromosomu  $W$  zcela vyloučit. Tato informace je přitom zcela klíčová pro pochopení evolučního původu  $W$ , což bylo motivací celé této práce.

## **2. CÍLE PRÁCE**

Nejzásadnějším cílem mé práce bylo především ověřit nepřítomnost chromosomu W pomocí komparativní genomové hybridizace u čeledi vakonoši (Psychidae), a přispět tak ke komplexním znalostem o jeho původu. Vakonoši obecně patří k cytogeneticky málo prostudovaným skupinám v rámci motýlů (Lepidoptera); u většiny druhů nejsou k dispozici ani základní cytogenetická data jako například počet chromosomů nebo přítomnost sex-chromatinu v interfázních jádrech.

Dalším cílem mé práce bylo provést screening karyotypu vybraných druhů pomocí osvědčených markerů - histonu H3 a podjednotky 18S rDNA. Ty by měly pomoci odhalit případné chromosomální přestavby, odhadnout dynamiku evoluce karyotypu a doplnit celkový obraz ancestrálního stavu u bazálních Ditrysia.

Díličními úkoly mé práce tedy bylo:

- 1) Určit ne/přítomnost sex-chromatinu v jádrech malpighických trubic
- 2) Na základě výsledků testu na přítomnost sex-chromatinu ověřit absenci chromosomu W pomocí CGH
- 3) Stanovit počet chromosomů u vybraných druhů
- 4) Stanovit počet kopií a přibližnou polohu klastrů genů pro 18S rRNA
- 5) Stanovit počet kopií a přibližnou polohu klastrů genů pro histon H3



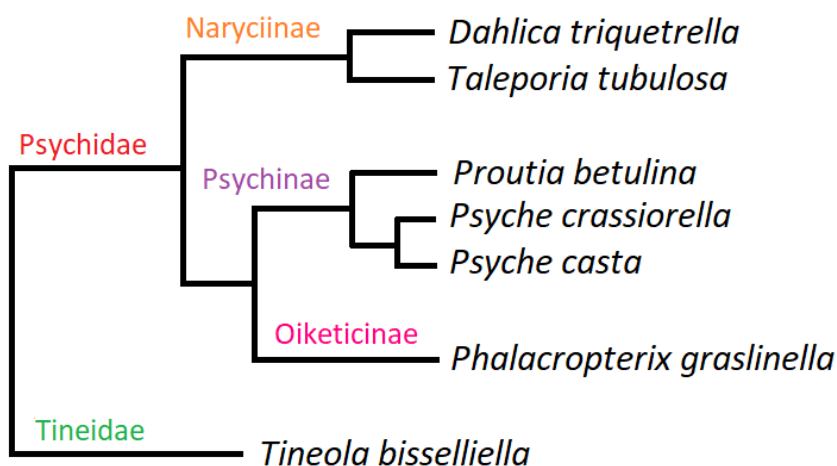
### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1. Pokusné organismy

Veškerý pokusný hmyz z čeledi vakonošů Psychidae (tzn. *Taleporia tubulosa*, *Proutia betulina*, *Psyche crassiorella*, *Psyche casta*, *Dahlica triquetrella* a *Phalacropterix graslinella*) jsem sbírala v bučinách či smíšených lesích v okolí do 20 km. od Českých Budějovic. Hmyz byl ve stádiu předposledního larválního instaru sbírán za denního světla při suchém počasí v období od března do června. Následně byl přechováván v plastové krabíčce vystlané rosenou vegetací při teplotě 4 °C, aby se oddálil proces kuklení. Takto přechovávaný hmyz jsem do pěti dnů vypitvala, a zbylou tkáň neprodleně zmrazila v tekutém dusíku.

Dále jsem pracovala s molem šatním, *Tineola bisselliella* (Tineidae). Rozhodla jsem se jej zahrnout do této práce poté, co jsem zjistila stav u vakonošů – Tineidae totiž představují další bazální skupinu Ditrysia. V tomto případě jsem využila laboratorního chovu. Larvy byly chovány na surové ovčí vlně při teplotě 25°C v režimu 16/8 hodin světlo/tma.

Vzájemné fylogenetické vztahy použitých druhů jsou znázorněny v obrázku 1 (Mutanen a kol., 2010).



Obr. 1: Vzájemné fylogenetické vztahy použitých druhů. Převzato z Mutanen a kol. (2010), přepracováno.

### 3.2. Determinace druhů pomocí barcodingu

Druhy *Dahlica triquetrella*, *Taleporia tubulosa* a *Proutia betulina* (Psychidae) lze relativně snadno určit podle tvaru a velikosti schránek, a podle velikosti a barvy housenek. Naproti tomu druhy *Psyche crassiorella* a *Psyche casta* prakticky není možné od sebe rozeznat v larválním stádiu. Pro přípravu chromosomálních preparátů jsem potřebovala právě larvy (nikoliv dospělé jedince) a proto bylo nutné využít molekulárních metod k určení jedince do druhu. K těmto účelům jsem použila metodu “barcoding”, která umožňuje přesné určení druhu na základě vysoce variabilních oblastí v mitochondriálním genu pro cytochrom oxidázu I (dále jen COI) (Hebert a kol., 2004).

Pomocí PCR a specifických primerů pro Lepidoptera (příloha 1) jsem amplifikovala gen pro COI; protokol jsem převzala z Hebert a kol. (2004). Jedna reakce o objemu 50  $\mu$ l obsahovala 10-50 ng genomové DNA, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 pmol každého z primerů, 20 mM dNTPs, 10 mM Tris HCl (pH 8,3), 50 mM KCl a 1 U ExTaq DNA polymerázy (TaKaRa, Japonsko). Reakce běžela v termocykleru při tomto teplotním profilu: počáteční denaturace 1 minuta při 94°C, poté 6 cyklů denaturace 1 minuta při 94°C, 90 sekund při 45°C a 75 sekund při 72°C, a dále 36 cyklů 1 minuta při 94°C, 90 sekund při 51°C a 75 sekund při 72°C; závěrečným krokem byla 5 minut dlouhá elongace při 72°C. PCR produkty byly elektroforeticky separovány na 1,5 % agarózovém gelu v TAE pufru, obarveny etidium bromidem a vizualizovány pod UV.

Úspěšně amplifikované produkty byly odeslány k sekvenaci (viz kapitola 3.6.5. Sekvence).

### 3.3. Příprava chromosomálních preparátů

Pomocí metody “spreading” byly zhotoveny chromosomální preparáty z ovárií, testes, mozku a samčích křídelních imaginálních disků daného jedince. Orgány jsem za přítomnosti vychlazeného fyziologického roztoku vyjmula z těla larvy a přemístila do hypotonizačního roztoku (75 mM KCl), kde byly ponechány 8 minut. Následně byly fixovány ve fixážním roztoku Carnoy z etanolu, chloroformu a kyseliny octové v poměru 6:3:1 po dobu 15 minut. Poté jsem materiál macerovala pomocí wolframových jehel na sklíčku v 10  $\mu$ l 60% kyseliny

octové – když došlo k homogenizaci materiálu, sklíčko jsem přemístila na plotýnku vyhřátou na 45 °C a materiál po sklíčku rovnoměrně rozptýlila pomalým tahem jehlou. Vzniklé preparáty jsem odvodnila pomocí etanolové řady (70%, 80% a 100% etanol, vždy ponecháno cca 1 minutu) a uskladnila v -20 °C do dalšího použití.

### **3.4. Příprava preparátů z malpighických trubic**

Malpighické trubice byly, stejně jako při získávání gonád, vyjmuty z těla larvy ve vychlazeném fyziologickém roztoku a přemístěny za sklíčko. Zde jsem je zakápla fixáčním roztokem Carnoy (viz výše) a nechala krátce fixovat. Zbylou fixáž jsem odsála filtračním papírem a obarvila pomocí 2,5% lakto-aceto-orceinu. Vše jsem přikryla krycím sklíčkem, pomocí filtračního papíru odsála přebytečné barvivo a hotový preparát zalakovala. Preparáty byly skladovány při 4 °C a pozorovány světelným mikroskopem při 40-ti násobném zvětšení.

### **3.5. Izolace DNA**

Pro izolaci genomové DNA jsem použila NucleoSpin DNA Insect kit (Macherey-Nagel, Německo), který efektivně maceruje tkáň pomocí ocelových kuliček. Při izolaci jsem postupovala podle přiloženého návodu od výrobce. Výslednou koncentraci vytěžené DNA jsem proměřila na fluorometru Qubit 3.0 (ThermoFisher Scientific, Německo), a izolovanou DNA skladovala při -20 °C.

### **3.6. Příprava hybridizačních sond**

#### **3.6.1. Klonování**

Klonování bylo použito pro získání sekvence sondy pro histon H3. S pomocí PCR a degenerovaných primerů (příloha 2) jsem amplifikovala části druhově specifických sekvencí histonu H3 – jako templát jsem použila genomovou DNA ze zástupců dvou podčeledí, *Taleporia tubulosa* a *Proutia betulina*.

Získaná sonda z *Taleporia tubulosa* byla později použita pro detekci histonu H3 i u *Psyche crassiorella*. PCR reakce o objemu 20 µl obsahovala 2 µl 10x TaKaRa ExTaq pufu

(TaKaRa), 0,5 U TaKaRa ExTaq DNA polymerázy, 0,2 mM dNTPs, 1  $\mu$ M degenerovaných primerů a 100 ng DNA. Reakce probíhala v termocykleru. Počáteční denaturace trvala 3 minuty a probíhala při 94°C, poté následovalo 30 cyklů denaturace při 94°C po 30 sekund, nasedání primerů při 58°C po 30 sekund a elongace při 72°C po 90 sekund. Závěrečným krokem byla 3 minuty trvající elongace při 72°C. Získané PCR produkty byly elektroforeticky separovány na agarózovém gelu v TAE pufru, barveny etidium bromidem a vizualizovány pod UV. Produkty očekávaných velikostí jsem z gelu vyřízla a přečistila pomocí kitu Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, USA) podle návodu výrobce.

Přečištěné produkty jsem zaligovala do vektoru Promega pGem T-Easy Vector (Promega) dle návodu výrobce. Ligační směs o celkovém objemu 10  $\mu$ l obsahovala 100 ng získaného produktu, 50 ng vektoru, 3 U T4 DNA ligázy a ligační pufr. Ligační reakce byly při teplotě 4°C inkubovány přes noc. Druhý den jsem provedla transformaci vektoru do kompetentních buněk bakterií *E. coli* (kmen DH5 $\alpha$ ) dle doporučení výrobce – buňky byly nejprve zahřívány při 42°C po 90 sekund, a pak prudce ochlazeny na ledu, aby prošly teplotním šokem.

Takto ošetřené buňky jsem vysela na Petriho misky s 1,5% LB agarem s 143 mM sodnou solí ampicillinu, 0,5 mM IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactosid) a 122 mM X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid), a kultivovala při 37°C přes noc. Následující den jsem provedla modro-bílou selekci kolonií a ty kolonie, které nesly insert, jsem přeočkovala na čisté Petriho misky. Pomocí PCR za použití univerzálních vektorových primerů M13 jsem ověřila délku zaklonovaného produktu a vybrané kolonie jsem inokulovala do 3 ml tekutého LB média se 143 mM ampicilinem. Takto byly kultury inkubovány při 37°C přes noc za stálého míchání.

Požadovaný plasmid jsem z nich izolovala pomocí NucleoSpinPlasmid (Macherey – Nagel) podle návodu výrobce, a výslednou koncentraci vzorku změřila na flourometru Qubit 3.0 (ThermoFisher Scientific).

### **3.6.2. Značení s využitím PCR**

Principem této metody je přímé zabudování značených nukleotidů do nového vlákna. PCR značení bylo využito pro přípravu sondy pro histon H3 pro metodu tyramidové FISH. Do celkového objemu reakce 25  $\mu$ l bylo přidáno 2  $\mu$ l 10x TaKaRa ExTaq pufru (TaKaRa), nukleotidy 40  $\mu$ M dATP, 40  $\mu$ M dCTP, 40  $\mu$ M dGTP, 14,4  $\mu$ M dTTP, 25,6  $\mu$ M značených nukleotidů Fluorescein-12-dUTP (PerkinElmer and Analytical Sciences, USA), 4-5 ng plasmidového templátu, 1  $\mu$ M degenerovaných primerů a 0,25 U TaKaRa ExTaq DNA Polymerázy. Reakce probíhala v termocykleru. Počáteční denaturace trvala 3 minuty a probíhala při 94°C, poté následovalo 30 cyklů denaturace při 94°C po 30 sekund, nasedání primerů při 62°C po 30 sekund a elongace při 72°C po 90 sekund. Závěrečná elongace trvala 3 minuty při 72°C. Hotovou sondu bylo nutné přechistit pomocí Sephadexu (GE Healthcare, UK) na předem připravené kolonce. Pro jednu kolonku jsem smíchala 0,025 g Sephadexu a 400  $\mu$ l MilliQ vody a nechala 45 minut bobtnat při 4°C. Pak jsem pomocí improvizované vakuové pumpy a pipety zbavila Sephadex přebytečné tekutiny, nanesla na něj sondu a centrifugovala 2 minuty při 2 000g. Takto připravená a přečištěná sonda byla skladována při – 20°C.

### **3.6.3. Celogenomová amplifikace**

Amplifikace celého genomu využívá sady degenerovaných primerů, díky nimž je při PCR možné rovnoměrně amplifikovat celý genom. Amplifikaci bylo nutné provést před značením sond pro CGH nick-translací, která vyžaduje poměrně vysokou koncentraci DNA. Při amplifikaci DNA jsem použila Ilustra GenomiPhi HY DNA Amplification kit (GE Healthcare) a postupovala přesně podle návodu od výrobce. Reakční směs obsahovala minimálně 10 ng DNA a byla inkubována při 30 °C po 4 hodiny.

### **3.6.4. Značení s využitím Nick-translace**

Principem značení nick-translace je použití velmi malého množství DNázy, DNA polymerázy a značených nukleotidů. Nukleotidy jsou pomocí polymerázy při reparaci DNA inkorporovány do vlákna, které endonukleáza poškodila, společně s běžnými nukleotidy – výsledkem je tedy rovnoměrně značená DNA. Značení nick-translací bylo využito pro sondy

na nepřímou FISH a na CGH, a bylo provedeno pomocí Nick-Translation Kit (Abott Molecular Inc, USA). Reakce o objemu 20 µl obsahovala 1 µg DNA, NT pufr (0,05M Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,005% BSA), 0,1 M merkaptoetanol, 0,1 mM značené nukleotidy Cy3-dUTP (Jena Bioscience, Německo) nebo Fluorescein-12-dUTP (Jena Bioscience), 0,05 mM dATP, dCTP, dGTP a 0,01 mM dTTP, 40 U DNA polymerázy I (ThermoFisher Scientific) a 0,01 U DNázy I (ThermoFisher Scientific). Reakce byla inkubována při 15 °C po dobu 3,5 hodiny a konečná deaktivace enzymů probíhala při 70 °C po 10 minut. Takto připravené sondy byly skladovány při -20 °C.

### **3.6.5. Sekvence**

Vzorky byly připraveny podle pokynů provozovatele a odeslány k sekvenaci Sangerovou metodou do firmy SeqMe (Dobříš, Česká republika). Získané sekvence byly upravovány a porovnávány v programech Mega 6.06 (Tamura a kol.,2013) nebo Geneious 7.1.7 (Biomatters, 2014) a jejich totožnost byla ověřena pomocí nástroje BLAST na webových stránkách NCBI (Altschul a kol., 1990).

## **3.7. FISH**

Principem fluorescenční *in-situ* hybridizace (dále jen FISH) je hybridizace předem připravené sondy značené barevnými fluorochromy s chromosomální DNA, fixované na preparátu. Chromosomální DNA je za přítomnosti formamidu denaturována při vyšší teplotě a poté je na preparát aplikována denaturovaná sonda. Dochází k postupné renaturaci řetězců, ale zároveň i k hybridizaci chromosomálního řetězce se sondou, díky čemuž je možné velmi přesně detekovat polohu a počet konkrétních klastrů genů. U všech druhů jsem vždy testovala několik jedinců obou pohlaví.

### **3.7.1. TSA FISH**

Tyramidová FISH (dále jen TSA FISH) využívá enzymatické amplifikace signálu s využitím tyramidu, a umožňuje přesnou detekci genů o nízkém počtu kopií. TSA FISH probíhala

podle zavedeného protokolu z Carabajal Paladino a kol. (2014). Pomocí této metody jsem detekovala histon H3 – používala jsem sondu značenou PCR. Po počátečním odvodnění preparátů v etanolové řadě (70%, 80% a 100%; každý po minutě) jsem preparáty ponechala 10 minut v roztoku 10mM HCl při 37 °C, abych odstranila přebytečnou cytoplasmu. Po promytí v PBS (3x 5 min, pokojová teplota) jsem preparáty 30 minut inkubovala při pokojové teplotě v 1% peroxidu vodíku a následovalo opět trojí promytí v PBS. Poté jsem aplikovala RNázu A (100 µg/ml) v 2x SSC kvůli odstranění přebytečné RNA, a inkubovala při 37 °C 1-2 hodiny. Po uplynutí inkubační doby jsem preparáty znovu promyla v PBS a pro snížení pozadí jsem preparáty ponechala 30 minut při 37 °C v 5x Denhartově roztoku (0,1% polyvinylpyrolidol, 0,1% BSA, 0,1% Ficoll 400).

Současně jsem si připravila hybridizační směs, která obsahovala cca 15 ng sondy rozpuštěné v 50 % deionizovaném formamidu, 10% dextran sulfátu a 2x SSC. Hybridizační směs jsem aplikovala na preparáty, které byly okamžitě denaturovány na ploténce při 70 °C po dobu pěti minut a následně přemístěny do inkubační komůrky. Zde probíhala hybridizace při 37 °C přes noc.

Další den probíhalo promývání preparátů: nejdříve 3x 5 minut při 46 °C v 50% formamidu v 2x SSC, dále 5x 2 minuty při 46 °C v 2x SSC, potom 3x 5 minut při 62 °C v 0,1x SSC a 5 minut při pokojové teplotě v TNT pufre (0,1 M Tris-Cl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20). Pro zablokování reakce byly preparáty 30 minut inkubovány s TNB pufrem (0,1 M TRIS-HCl, 0,15 M NaCl, 0,5% blokovací činidlo) v pokojové teplotě, a následně byla aplikována protilátka konjugovaná s křenovou peroxidázou (anti-fluorescein HRP, PerkinElmer), ředěná pufrem TNB v poměru 1:1000. Inkubace s protilátkou probíhala hodinu při 37 °C ve vlhké komůrce. Preparáty byly promyty 3x po 5 minutách za pokojové teploty TNT pufrem a pro amplifikaci signálu byl aplikován tyramid ředěný rozpouštědlem (TSA Plus Fluorescein system, PerkinElmer) v poměru 1:50. Inkubace s tyramidem probíhala za pokojové teploty 7-9 minut a pak byly preparáty opět 3x promyty v TNT pufre. Poté jsem preparáty ještě opláchla ve miliQ vodě s 1% Kodak FotoFlo (Kodak, USA) a posledním krokem byla aplikace 25 µl DAPI (Sigma-Aldrich, USA) v DABCO (Sigma-Aldrich) o koncentraci 0,5 µg/ml. Preparát jsem zakryla krycím sklíčkem a okraje zalakovala lakem na nehty.

### 3.7.2. Nepřímá FISH – Fluorescenční in situ hybridizace s využitím protilátek

Metoda nepřímé FISH využívá několikanásobného zesílení signálu pomocí konjugovaných protilátek. Výborně se tedy hodí k detekci genů o nízkém počtu kopií. V mé práci jsem tuto metodu využívala k vizualizaci genů pro 18S rDNA malé ribosomální podjednotky (18S rDNA).

Již připravenou sondu z obaleče jablečného, *Cydia pomonella*, jsem obdržela od své kolegyně Ireny Hladové. Částečná sekvence 18S rDNA byla nejprve amplifikována PCR, zaklonována a naznačena nick-translací (detailní popis postupu je uveden v práci Hladová, 2015).

Koncentrace DNA použité na jeden preparát byla 25 ng. K naznačené sondě jsem přidala 25 µg sonikované DNA z lososího spermatu jako kompetitor (Sigma-Aldrich). Celkový objem sondy a lososí DNA jsem použila jako výchozí číslo pro výpočet objemu dalších reagensů – přidala jsem octan sodný (1/10 objemu) a vychlazený 100% etanol (2,5 násobek objemu). Směs jsem nechala vysrážet 30 minut v -80°C a poté jsem ji 20 minut centrifugovala při 4°C a při 15 000 rpm. Pipetou jsem odsála supernatant, k peletu jsem přidala 500 µl vychlazeného 70% etanolu a znovu centrifugovala 5 minut při 4°C a při 15 000 rpm. Supernatant jsem opět pečlivě odsála a promytý pelet jsem 30 minut za občasného promíchání rozpouštěla v 5 µl deionizovaného formamidu, předehřátého na 37°C. Poté jsem přidala 5 µl předehřátého 20% dextran sulfátu a provedla 5 minutovou denaturaci při 90°C. Celou reakci jsem prudce ochladila na ledu a aplikovala na preparáty, které jsem připravovala souběžně následujícím způsobem. Po odvodnění v etanolové řadě (70%, 80% a 100%. cca minutu v každém) jsem aplikovala RNázu A (200 µg/ml) v 2x SSC a inkubovala hodinu při 37°C. Preparáty jsem promyla 2x po 5 minutách v 2x SSC za pokojové teploty, a přemístila je na 30 minut do 5x Denhartova roztoku při 37°C pro snížení pozadí. Poté jsem nanesla 70% formamid v 2x SSC a provedla 3,5 minutovou denaturaci při 68°C. Po denaturaci jsem preparáty prudce ochladila v ledovém 70% etanolu (-20°C) jednu minutu, a odvodnila v 80% a 100% etanolu při pokojové teplotě po 30 sekundách. Po osušení jsem nanesla rozpuštěnou sondu, překryla krycím sklíčkem, zapečetila tekutým lepidlem a nechala přes noc hybridizovat při 37°C ve vlhké komůrce.

Druhý den jsem odstranila lepidlo a krycí sklíčko a promyla preparáty 3x po 5 minutách v 50% formamidu v 2x SSC při 46°C, 5x po 2 minutách v 2x SSC při 46°C, 3x po 5 minutách v



0,1 SSC při 62°C a dále v 0,1% Tweenu v 4x SSC po 5 minut při pokojové teplotě. Promyté preparáty jsem blokovala 2,5% roztokem BSA při pokojové teplotě 30 minut, a poté jsem aplikovala streptavidin-Cy3 (Jackson ImmunoRes. Labs. Inc, USA) ředěný blokovacím roztokem 2,5% BSA v 4x SSC, 1:1000 a inkubovala 30 minut při pokojové teplotě. Potom jsem preparáty opět 3x promyla v 0,1% Tweenu v 4x SSC při 37°C a opět blokovala roztokem BSA. Po druhém blokování jsem pro zesílení signálů nanasla antistreptavidin (Vector Labs. Inc, USA) ředěný 1:25 s blokovacím roztokem a inkubovala 30 minut při 37°C. Protilátku jsem 3x odmyla stejným způsobem a znovu aplikovala BSA. Ještě jednou jsem použila streptavidin-Cy3 pro zesílení signálu, odmyla ho a promyla hotové preparáty 5 minut v 1% Tritonu v 2x SSC a 5 minut v 1% Kodak PhotoFlo (Kodak) v miliQ vodě. Nakonec jsem preparát obarvila 25 µl DAPI (Sigma-Aldrich) v DABCO (Sigma-Aldrich) o koncentraci 0,5 µg/ml, přikryla krycím sklíčkem a zalakovala.

### **3.7.3. CGH – Komparativní genomová hybridizace**

Metodu CGH jsem využívala pro zjištění případných rozdílů v samičím a samčím karyotypu. Principem metody je vzájemná kompetice různě naznačených samičích a samčích celogenomových sond při hybridizaci na chromosomální preparát – v případě detekce pohlavních chromosomů se při metodě CGH sondy vždy aplikují na preparáty z heterogametického pohlaví, tzn. u motýlů na samice.

Používala jsem optimalizovaný protokol s částečnou prehybridizací sondy. Pro každý preparát jsem pomocí nick-translace připravila červeně značenou samčí sondu a zeleně značenou samičí sondu, při čemž každá obsahovala 250 ng DNA. Ke směsi samčí a samičí sondy jsem přidala 25 µg sonikovaného lososího spermatu, která zde slouží jako kompetitor, a dále 1/10 celkového objemu octanu sodného a 2,5 násobek objemu 100% vychlazeného etanolu. Směs byla ponechána v -80°C po dobu 30 minut, aby došlo k precipitaci DNA. Poté byla reakce celtrifugována při 4°C při 15 000 rpm 5 minut a vzniklý supernatant byl opatrně odstraněn pipetou. K peletu jsem přidala 500 µl vychlazeného 70% etanolu a znovu centrifugovala 5 minut při 4°C a při 15 000 rpm. Supernatant jsem opět pečlivě odsála a takto promytý pelet byl rozpuštěn v 5 µl 100% deionizovaného formamidu, předeštěného na 37°C. Po promíchání bylo přidáno 5 µl 20% dextran sulfátu a celá směs byla denaturována při 90°C po dobu 5

minut, a okamžitě poté prudce ochlazena na ledu. Před použitím jsem připravenou sondu ještě umístila na hodinu a půl do 37°C, aby došlo k renaturaci běžných repetitivních sekvencí.

V mezičase jsem provedla přípravu preparátů – nejprve jsem je odvodnila v etanolové řadě (70%, 80% a 100% po cca minutě) a nechala oschnout. Aplikovala jsem RNázu A (200 µg/ml) v 2x SSC a inkubovala hodinu při 37°C. Preparáty jsem dvakrát promyla při pokojové teplotě po 5 minutách v 2x SSC, poté jsem nanasla 70% formamid v 2x SSC a denaturovala 3,5 minuty při 68°C. Po denuraci byly preparáty prudce ochlazeny v ledovém 70% etanolu a následně odvodněny v 80% a 100% etanolu při pokojové teplotě. Po oschnutí jsem aplikovala připravenou sondu, zakryla krycím sklíčkem a zapečetila tekutým lepidlem. Takto ošetřené preparáty jsem umístila na tři dny do vlhké komůrky do 37°C. Po uplynutí inkubační doby jsem odstranila lepidlo a krycí sklíčko a 5 minut promývala preparáty v 1% Triton X v 0,1x SSC při 62°C. Poté jsem je krátce opláchla v 1% Kodak PhotoFlo (Kodak) v miliQ vodě při pokojové teplotě, po oschnutí nanasla 25 µl DAPI (Sigma-Aldrich) v DABCO (Sigma-Aldrich) o koncentraci 0,5 µg/ml, přikryla krycím sklíčkem a zalakovala lakem na nehty.

### **3.8. Prohlížení preparátů**

Preparáty z malpighických trubic a preparáty z experimentů FISH a CGH jsem prohlížela na světelném a fluorescenčním mikroskopu Zeiss Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss Jena, Německo), při čemž k fluorescenční mikroskopii jsem používala 3 barevné filtry (pro DAPI a pro každou sondu zvlášť) a černobílé snímky pořizovala pomocí kamery Olympus CCD XM10 s programem cellSens 1.9 (Olympus, Německo). Výsledný obraz jsem upravila a složila v počítači v programu Adobe Photoshop CS6 version 13.0.1.

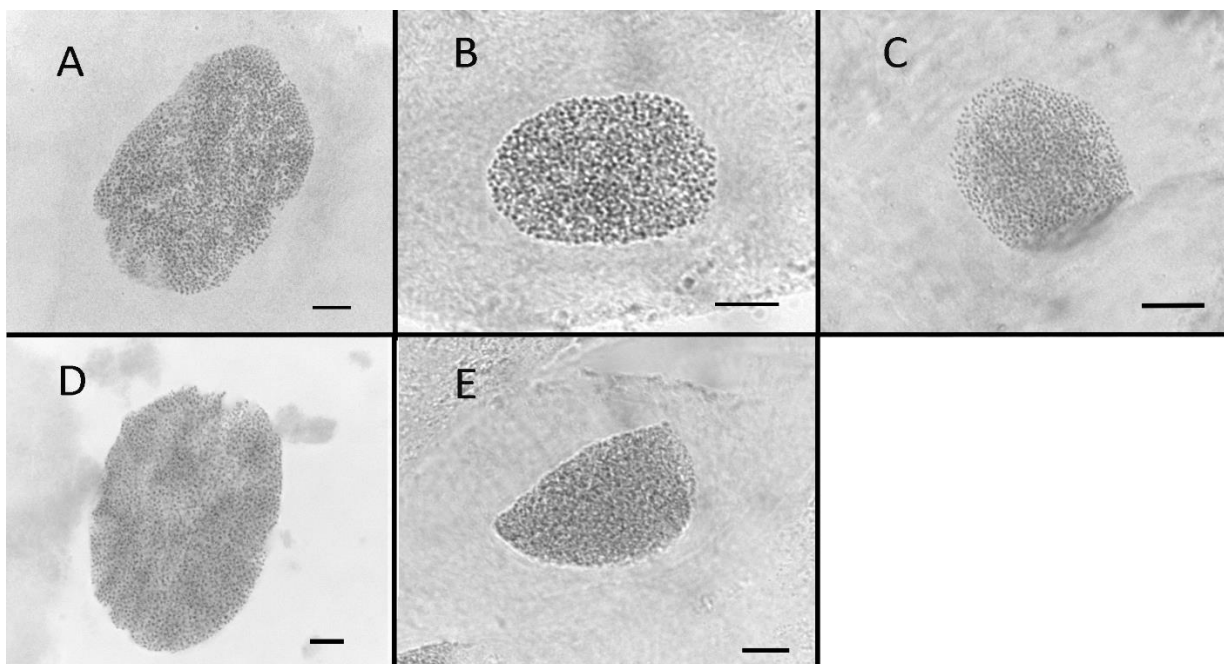
## 4. VÝSLEDKY

### 4.1. Barcoding

Metodu barcoding jsem použila pro odlišení larev druhů *Psyche casta* a *Psyche crassiorella*. Mitochondriální sekvence cytochrom oxidázy I jsem přiřadila k jedenácti referenčním sekvencím získaným z NCBI GenBank (příloha 3) v programu MEGA 6.06 (Tamura a kol., 2013) a s pomocí algoritmu Neighbor-joining se mi podařilo tyto dva druhy spolehlivě rozeznat – obě rozhodující větve měly bootstrapovou podporu 99% (příloha 4). Zjistila jsem, že naprostá většina zkoumaných vzorků patří k druhu *Psyche crassiorella*, ačkoliv na stejné lokalitě sběru se vyskytovaly i se svým sesterským druhem. Barcoding se tedy ukázal jako spolehlivý způsob k rozeznání larev těchto druhů a umožnil jejich širší analýzu.

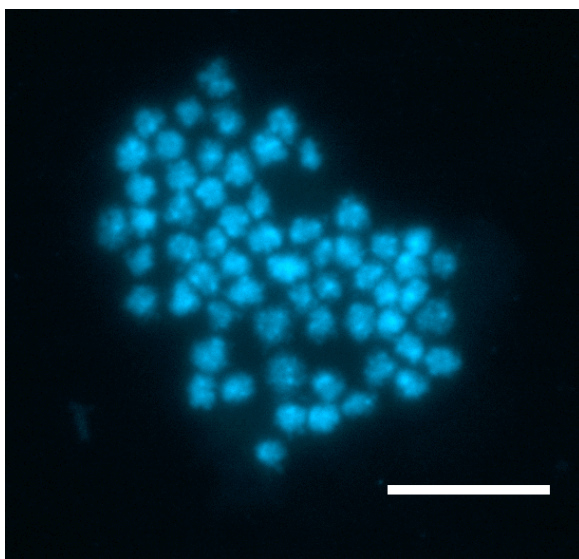
### 4.2. Nepřítomnost sex-chromatinu v interfázních jádrech

Nalezené druhy čeledi Psychidae (*Taleporia tubulosa*, *Proutia betulina*, *Psyche crassiorella*, *Dahlica triquetrella* a *Phalacropterix graslinella*) byly testovány na přítomnost sex-chromatinu v polyploidních jádrech malpighických trubic. U žádného z daných druhů se sex-chromatin nevyskytoval ani u samic (obr. 2), ani u samců.



Obr. 2: Samičí polyploidní interfázní jádra. Barveno lakto-aceto-orceinem. Měřítko = 10  $\mu\text{m}$ . A: *Taleporia tubulosa*, B: *Proutia betulina*, C: *Psyche crassiorella*, D: *Dahlica triquetrella* a E: *Phalacropterix graslinella*.

### 4.3. Počet chromosomů

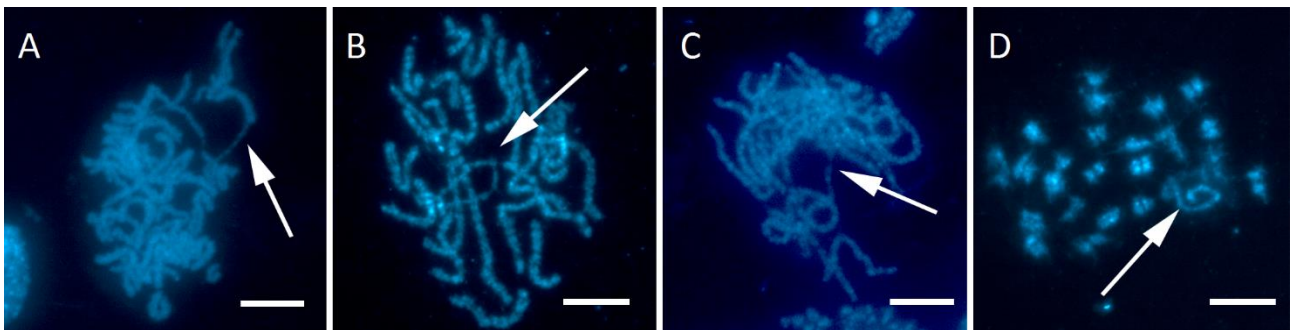


Mitotické preparáty jsem získávala z mozků, gonád a samčích imaginálních disků. U vybraných druhů se mi podařilo určit počet chromosomů - u druhu *Taleporia tubulosa* jsem určila 59/60 chromosomů a u *Psyche crassiorella* 61/62 chromosomů, čímž jsem potvrdila již známé výsledky prací Seiler (1919, 1922). U druhu *Proutia betulina* dosud počet chromosomů nebyl znám – určila jsem ho na 61/62 chromosomů (obr. 3).

Obr. 3: Mitotické chromosomy samice *Proutia betulina*. Měřítko = 10  $\mu\text{m}$ .

V průběhu mé práce jsem se podílela i na určení počtu chromosomů u mola šatního, *Tineola bisselliella* (Tineoidea) z fylogeneticky blízce příbuzné čeledi Tineidae, u kterého bylo spočítáno 59/60 chromosomů. Tyto výsledky byly již zahrnuty do publikace Dalíková a kol., (2017).

Dále jsem analyzovala meiotické pachytenní chromosomy a u samic druhu *Taleporia tubulosa*, *Proutia betulina*, *Psyche crassiorella* a *Tineola bisselliella* jsem identifikovala Z univalent (obr. 4). Z druhů *Dahlica triquetrella* a *Phalacropterix graslinella* se mi bohužel nepodařilo získat ani stádium pachytene, ani mitotické chromosomy.

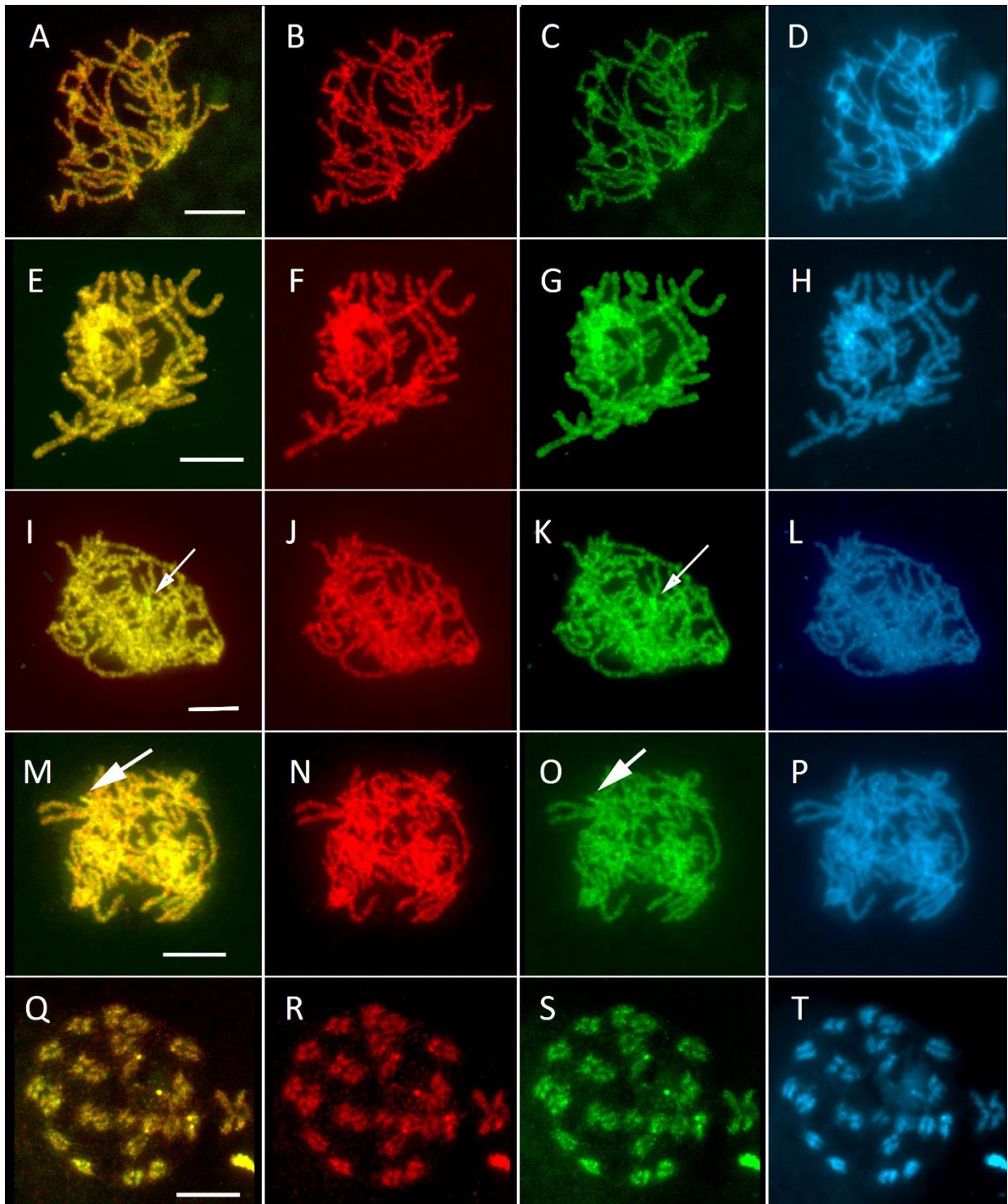


Obr. 4: Z univalent na samičích pachytenních jádrech. Barveno DAPI. Měřítko 10 =  $\mu\text{m}$ . A: *Taleporia tubulosa*, B: *Proutia betulina*, C: *Psyche crassiorella*, D: *Tineola bisselliella*.

#### 4.4. Komparativní genomová hybridizace

Nepřítomnost chromosomu W jsem ověřovala pomocí metody CGH. Vzhledem k absenci sex-chromatinu v jádrech malpighických tubic a k odlišným počtům chromosomů mezi samci a samicemi jsem očekávala rovnoměrnou hybridizaci obou sond. U druhů *Taleporia tubulosa*, *Proutia betulina* a mola *Tineola bisselliella* se tak skutečně stalo – obě sondy naznačily preparát zcela rovnoměrně, bez viditelných rozdílů.

U druhu *Psyche crassiorella* jsem detekovala terminální úsek chromosomu, který byl výrazně silněji značen samičí sondou (zeleně). Tento jev jsem pozorovala jak u tří samičích, tak u čtyř samčích preparátů, a to včetně preparátu ze samce, z jehož DNA byla připravena samčí část sondy (obr. 5).

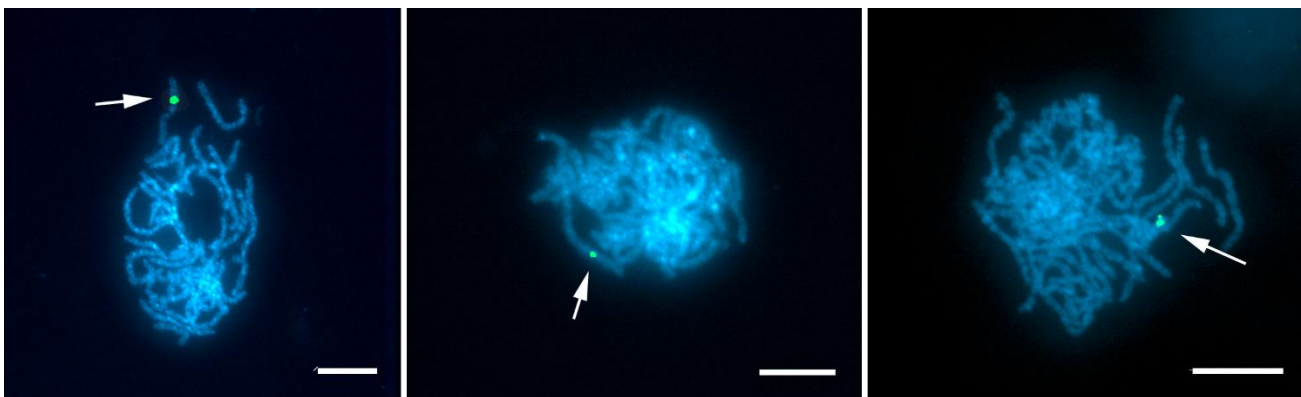


Obr. 5: Komparativní genomová hybridizace. Měřítka 10 =  $\mu\text{m}$ . Překryv samičí + samčí sondy (A,E,I,M,Q); samčí sonda značená červeně (B,F,J,N,R); samičí sonda značená zeleně (C,G,K,O,S); barveno DAPI (D,H,L,P,T). Druhy: A-D: samice *Taleporia tubulosa*, E-H: samice *Proutia betulina*, I-L : samice *Psyche crassiorella* (odlišně značený terminální úsek označen šipkou), M-P: samec *Psyche crassiorella*, Q-T: samice *Tineola bisselliella*.

#### 4.5. Počet a poloha klastrů histonu H3

Pro zjištění počtu a polohy klastrů histonu H3 byla použita sonda získaná PCR amplifikací zaklonovaného histonu z druhů *Taleporia tubulosa* (ten byl použit i pro *Psyche crassiorella*) a *Proutia betulina*. Zaklonovaný fragment byl sekvenován, a získané sekvence byly po úpravě porovnány v programu MEGA 6.06 (Tamura a kol., 2013). Celková délka sekvence byla 1 123 bází, přičemž 85 pozic vykazovalo polymorfismus. Po překladu do proteinového kódu obě sekvence vykazovaly 93% identitu.

Naznačenou sondu jsem použila na meiotické preparáty metodou TSA FISH. U druhů *Taleporia tubulosa*, *Proutia betulina* a *Psyche crassiorella* jsem u obou pohlaví určila jeden velmi silný intersticiální klastr umístěný přibližně ve třetině autosomu (obr. 6).

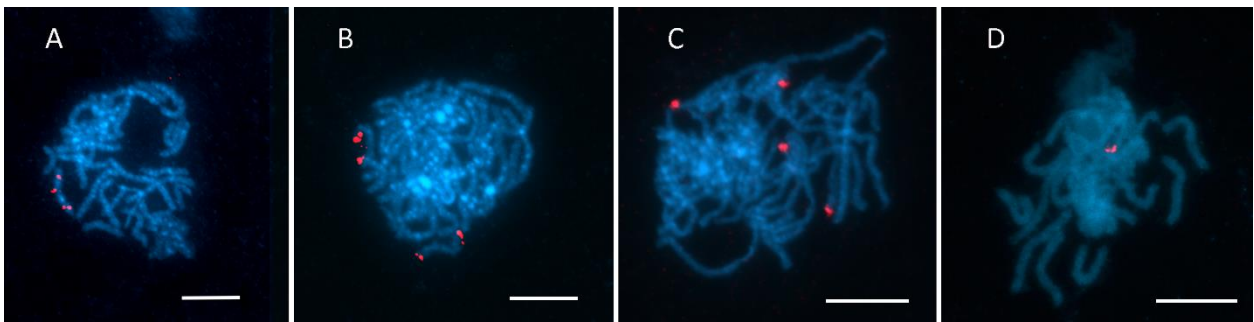


Obr. 6: Poloha klastru histonu H3. Pachytenní jádra barvena DAPI, signály zeleně (viz šipky). Měřítko = 10  $\mu$ m. A: samice *Taleporia tubulosa*, B: samec *Proutia betulina*, C: samice *Psyche crassiorella*.

#### 4.6. Počet a poloha klastrů 18S rDNA

Pro zjištění počtu a polohy klastrů 18S rDNA byla použita sonda z *Cydia pomonella*. Sondu jsem aplikovala na meiotické preparáty metodou nepřímé FISH. U druhu *Taleporia tubulosa* jsem identifikovala tři silné klastry, prokazatelně umístěné na stejném bivalentu autosomů. Tyto klastry byly umístěny intersticiálně, s pravidelnými rozestupy od sebe. Čtvrtý klastr byl velmi slabý; na některých jádrech nebyl vůbec patrný a vyskytoval se na jiném autosomu

(jeho polohu bohužel nebylo možné určit). U druhu *Proutia betulina* jsem našla čtyři terminální klastry, z toho dva umístěné na opačných koncích stejného autosomálního bivalentu, a dva ležící na odlišných autosomech. K podobným výsledkům jsem dospěla i u posledního druhu *Psyche crassiorella*, kde jsem také určila čtyři silné terminálně umístěné klastry, které pravděpodobně leží na rozdílných chromosomech. U druhu *Tineola bisselliella* jsem identifikovala jeden silný klastr na pachytenních bivalentech, který odpovídal dvěma klastrům na mitotických chromosomech – potvrdila jsem tak výsledek práce Hladová (2015), která detekovala jeden intersticiální klastr (obr. 7).



Obr. 7: Poloha klastrů rDNA. Pachytenní jádra barvena DAPI, signály červeně. Měřítko = 10  $\mu$ m. A: samice *Taleporia tubulosa*, B: samec *Proutia betulina*, C: samec *Psyche crassiorella*, D: samice *Tineola bisselliella*.



## **5. DISKUZE**

Čeď vakonošů (Psychidae) byla až do současné doby z pohledu cytogenetiky studována jen zřídka; o karyotypu jednotlivých druhů vakonošů je známo velmi málo. Jedním z cílů této práce proto bylo provést základní cytogenetický screening pomocí ověřených markerů (histonu H3 a 18S rDNA), a utvořit tak konkrétnější představu o jeho skladbě. Dodatečně jsem do části screeningu zahrnula i zástupce příbuzné čeďi molovitých (Tineidae), *Tineola bisselliella*.

### **5.1. Počet a poloha klastrů histonu H3**

Sekvenování zaklonovaných fragmentů histonu H3 odhalilo mezi *P. betulina* a *T. tubulosa* 93% shodu v proteinové sekvenci. Takto vysoká shoda ale není u histonů výjimkou – sekvence histonů je silně konzervovány i mezi fylogeneticky mnohem vzdálenějšími druhy díky purifikující selekci (Waterborg, 2012). Neméně konzervovaná zůstává také početnost a distribuce klastrů, které geny histonu H3 tvoří na chromosomech. Potvrzují to i výsledky mé práce, kde jsem u druhů *T. tubulosa*, *P. betulina* a *P. crassiorella* shodně našla jeden silný intersticiální klastr, umístěný přibližně ve třetině bivalentu autosomů, a to u obou pohlaví. V rámci skupiny vakonošů tedy výsledky screeningu naznačují spíše stabilní karyotyp.

Zdá se, že tento vzorec vakonoši sdílí s několika dalšími skupinami motýlů: jediný intersticiální klastr byl v rámci diplomové práce I. Hladové (2015) detekován napříč skupinou Ditrysia, např. u mola *Tineola bisselliella* (Tineidae), u klíněnky *Cameraria ohridella* (Gracillariidae), u babočky *Aglais urticae* (Nymphalidae), u zavíječe *Ephestia kuehniella* (Pyrilidae), u modelového bource *Bombyx mori* (Bombycidae) a mnoha dalších. U pěti druhů obalečů Tortricidae ke stejným výsledkům dospěla Šichová a kol., (2013). Jako častá alternativa k intersticiálnímu klastru se objevuje klastr terminální, který byl pozorován např. u záředníčka *Plutella xylostella* (Pluteliidae) nebo u bělásky *Pieris brassicae* (Pieridae). Co se týče non-ditrysijských motýlů, jeden intersticiální klastr se vyskytoval u dvou druhů hrotnokřídlců (Hepialidae) a jeden terminální klastr u minovníčka *Tischeria ekebladella* (Tischeriidae). Výjimku z pravidla představují mimo jiné motýli rodu *Leptidea* (Pieridae), kde bylo v

souvislosti s dynamickou karyotypovou evolucí pozorováno několikanásobné zmnožení histonových klastrů a dokonce vnitrodruhová variabilita v jejich počtu. Zajímavé srovnání s celou skupinou motýlů pak poskytuje zástupce sesterského řádu chrostík *Glyphotaelius pellucidus*, u kterého byly popsány tři terminální klastry (Hladová, 2015; Šíchová a kol., 2015). Odhlédneme-li od těchto vzácných odchylek, můžeme na základě dostupných dat tvrdit, že jediný klastř genů H3 je u motýlů společným znakem. Ačkoliv zatím nelze určit, zda je původní lokalizace intersticiální či terminální, jejich vyvážený výskyt naznačuje relativně časté chromosomální inverze na daném chromosomu.

## 5.2. Počet a poloha klastrů 18S rDNA

Evoluce klastrů 18S rDNA je v porovnání s histonovými klastry mnohem dynamičtější, a není zcela závislá na případných chromosomálních přestavbách. Přesto jejich distribuce poskytuje užitečné informace například o aktivitě mobilních elementů v genomu, případně ji lze využít k identifikaci chromosomů u daného druhu. Navíc, sekvence 18S rDNA zůstává evolučně silně konzervovaná, což umožňuje aplikaci sondy z jednoho druhu na další příbuzné druhy.

Výsledky této práce odhalily u všech druhů vakonošů čtyři klastry rDNA, které se ale odlišují svou velikostí i lokalizací. U druhů *Proutia betulina* a *Psyche crassiorella* jsem shodně identifikovala čtyři stejně velké terminální klastry, přičemž u *P. betulina* byly dva z nich prokazatelně lokalizovány na opačných koncích téhož chromosomu. U *P. crassiorella* zatím nelze detailněji určit jejich vzájemnou polohu; na základě dostupných výsledků se ale spíše bude jednat o čtyři různě lokalizované terminální klastry. Nejzajímavější distribuci klastrů jsem pozorovala u *Taleporia tubulosa*, kde byly tři stejně velké klastry rDNA umístěny intersticiálně na jednom chromosomu. Čtvrtý klastř byl velmi slabý a nebylo možné ho detekovat na každém jádru, což zde pravděpodobně znamená nízký počet kopií rDNA genů. U mola *Tineola bisselliella* jsem potvrdila již známý jeden intersticiální klastř (Hladová, 2015).

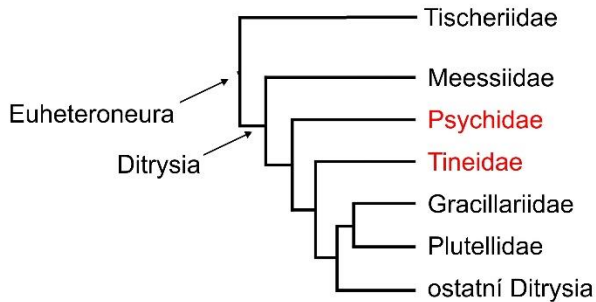
Jak vyplývá ze systematických studií Hladová (2015) a Nguyen a kol. (2009), nejčastěji se u motýlů objevuje pouze jeden, případně dva klastry rDNA, a to bez zjevné souvislosti s fylogenetickou pozicí daného druhu. Jeden intersticiální klastr byl kromě *T. bisselliella* pozorován např. u minovníčka *Tischeria ekebladella* (Tischeriidae) nebo u bource *Bombyx mori* (Bombycidae); jeden terminální klastr pak u chrostíka *Glyphotaelius pellucidus*, u záředníčka *Plutella xylostella* (Pluteliidae) nebo u bělásky *Pieris brassicae* (Pieridae). Dva terminální klastry se vyskytují např. u hrotnokřídlece *Phymatopus californicus* (Hepialidae) nebo u zavíječe *Ephestia kuehniella* (Pyrilidae). Objevují se ale i kuriózní případy, jakým je babočka *Inachis io* (Nymphalidae) se svými jedenácti klastry.

V porovnání se získanými výsledky této práce je zřejmé, že čtyři klastry u vakonošů pravděpodobně budou odvozeným stavem, a mohly by mít souvislost buď s rozsáhlými chromosomálními přestavbami (čemuž ale nenasvědčuje ani zachovaný počet chromosomů, ani distribuce klastru H3) a nebo s vysokou aktivitou mobilních elementů v jejich genomu, případně s vyšší frekvencí ektopické rekombinace mezi nehomologními chromosomy. V žádné z dostupných studií jsem nenalezla případ podobný *T. tubulosa*, kdy by se tři klastry nalézaly na témže chromosomu. Vzhledem k tomu, že tento druh má ve srovnání s ancestrálním karyotypem motýlů redukovaný počet chromosomů, je možné, že lokalizace tří klastru rDNA na jednom chromosomu vypovídá o dávné fúzi, pokud přítomnost těchto klastrů nebyla dokonce její příčinou. Této skutečnosti navíc bude v budoucím výzkumu možné využít ke spolehlivé identifikaci daného chromosomu. U *P. crassiorella* a *P. betulina* jsem pozorovala analogii se zavíječem *Ostrinia nubilalis* (Pyrilidae) u kterého byly nalezeny čtyři terminální klastry – vzhledem k jejich vzájemné fylogenetické pozici se ale pravděpodobně jedná o pouhou shodu náhod.

### 5.3. Absence chromosomu W

Hlavní motivací této práce bylo ověřit absenci chromosomu W u vakonošů. Tato skupina je vzhledem ke své fylogenetické pozici klíčová pro pochopení vzniku chromosomu W u motýlů (viz kapitola 1.2. Pohlavní chromosomy motýlů; shrnuto v Dalíková a kol., 2017). Obecně

uznávaná teorie o jeho vzniku tvrdí, že chromosom W vznikl již u společného předka Tischeriidae a Ditrysia (tzn. Euheteroneura). Pokud by tomu tak skutečně bylo, měl by být chromosom W přítomen i u bazálních skupin Ditrysia, tzn. u vakonošů, u jejich sesterské skupiny molovitých (Tineidae) nebo u skupiny Meessiidae (obr. 8).



Obr.8: Zjednodušené fylogenetické vztahy Euheteroneura. Převzato z Dalíková a kol. (2017), přepracováno.

Bohužel, toto tvrzení je v rozporu s několika nepřímými důkazy o jeho absenci; primárně se jedná o lichý počet chromosomů u samic vakonošů (Seiler, 1919), a sekundárně o absenci sex-chromatinu v somatických jádrech vakonošů a molů (Traut a Marec, 1996). Na bázi těchto studií ale nelze přítomnost chromosomu W definitivně vyloučit – pokud by totiž W tvořil trivalent s dvěma Z, jako je tomu např. u hrotnokřídlece *P. californicus* (Voleníková, 2015), byl by počet chromosomů stále lichý; pokud by navíc W vznikl fúzí s autosomem, nemusel by obsahovat větší množství heterochromatinu a tím pádem by netvořil sex-chromatin (Brown a Bachtrog, 2014; Voleníková, 2015).

Výsledky této práce však jasně podpořily původní domněnku o absenci W u vakonošů. Analýza polyploidních interfázních jader somatických buněk jednoznačně vyloučila přítomnost sex-chromatinu u všech pěti zkoumaných druhů vakonošů a u jednoho mola, a to u obou pohlaví. U čtyř druhů (vakonošů *Taleporia tubulosa*, *Proutia betulina*, *Psyche crassiorella* a mola *Tineola bisselliella*) se mi podařilo získat dostatek materiálu pro důkladnou cytogenetickou analýzu, která dále rozšířila důkazy o absenci W. Prvním nepřímým důkazem byl počet

chromosomů – ten byl znám již na počátku 20. století u druhů *T. tubulosa* (59/60) a *P. crassiorella* (61/62) (Seiler, 1919 a 1922). Má práce tento počet chromosomů potvrdila, a navíc přinesla zcela nové poznatky o počtu chromosomů u *P. betulina* (61/62) a u *T. bisselliella* (59/60). Tyto výsledky dobře korelují s modálním a pravděpodobně ancestrálním počtem chromosomů u motýlů ( $n=31$ ) (Lukhtanov, 2000). Nicméně, lichý počet chromosomů u samic je zde prvotním náznakem absence W.

Nejzásadnější důkazy v tomto ohledu přinesla komparativní genomová hybridizace (CGH) na samičích pachytenních chromosomech. U všech druhů, které byly podrobeny detailnější cytogenetické analýze, tato metoda zcela jasně vyloučila přítomnost diferencovaného chromosomu W. Navíc zde byl velmi dobře patrný Z univalent, který se u samců nevyskytoval. V kombinaci s počty chromosomů a chybějícím sex-chromatinem se tak jedná o celistvý a dostatečně spolehlivý důkaz absence W u zkoumaných vakonošů a u mola *T. bisselliella*.

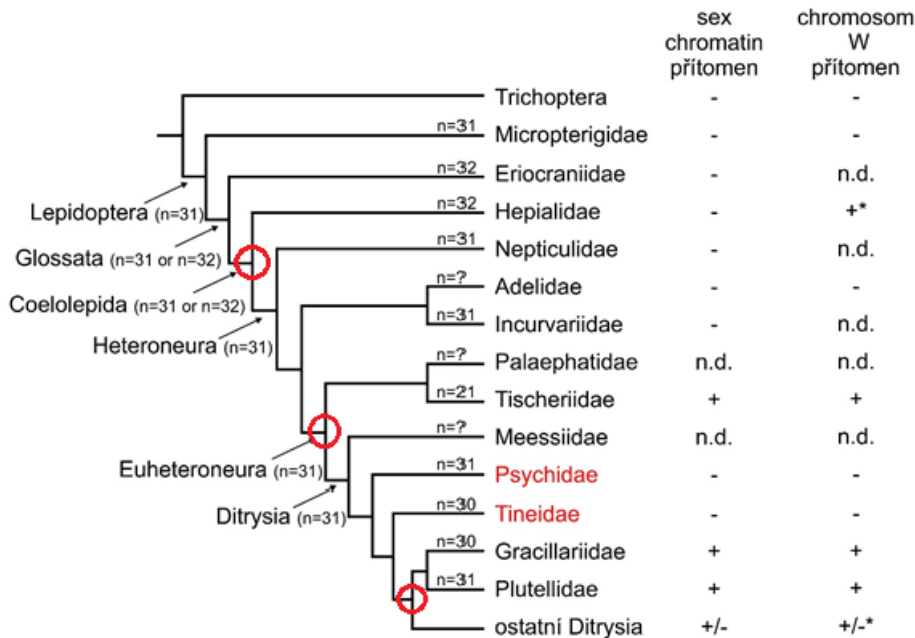
Zajímavý náhled do rozdílné skladby karyotypu mezi jedinci poskytly výsledky CGH u *P. crassiorella*. Zelená samičí sonda totiž opakovaně označila u určitého bivalentu terminální část. Prvotní domněnka, že by se mohlo jednat o sekvenci specifickou pro samice (tzn. například o část W), byla záhy vyloučena provedením experimentu na samčích pachytenních chromosomech, a to včetně samce, ze kterého byla připravena samčí část sondy. Výsledek byl u všech experimentů shodný. Existuje několik možných vysvětlení tohoto jevu, přičemž nejvíce pravděpodobnou verzí je repetitivní DNA, která by se v rámci vnitrodruhové variability vyskytovala ve více kopiích u konkrétní samice než u samce, ze kterého byla připravena sonda. Vnitrodruhová variabilita počtu repetitivních sekvencí je zcela běžným jevem – její existence byla mnohokrát popsána bez účinků na fenotyp (rutinně je využívána i pro identifikaci osob při forenzní genetice), ale i jako původce lidské Huntingtonovy choroby (Budworth a McMurray, 2013). Pro potvrzení jedné z hypotéz bude nezbytné provést další experimenty CGH na širším vzorku z daného druhu, a to za použití různých sond z více jedinců.

Alternativním vysvětlením by mohla být fúze autosomu s B chromosomem. Podobný případ byl pozorován například u sarančete *Eyprepocnemis plorans*, kde fúzí B chromosomu s autosomem došlo k aktivaci latentního NOR (Camacho a kol., 2003). V budoucím výzkumu by

bylo vhodné provést FISH s telomerickou sondou, která by mohla detekovat případné intersticiální telomerické sekvence a pomohla tak případnou fúzi odhalit.

#### 5.4. Význam práce pro teorii o vzniku W

Výsledky mé diplomové práce potvrzují absenci chromosomu W u vakonošů a molů. Pro tuto skutečnost připadají v úvahu dvě možná vysvětlení: sekundární ztráta chromosomu W u některých skupin nebo nezávislý vznik několika variant chromosomu W. Otázkou však stále zůstává, kdy tento chromosom W vznikl - zda skutečně až u skupiny Euheteroneura, jak se obecně tvrdí, anebo již mnohem dříve, čemuž by nasvědčovala jeho přítomnost u bazálních motýlů Hepialidae. V tom případě by ale muselo dojít k sekundární ztrátě i u dalších skupin jako jsou např. Adelidae, u nichž byla absence W prokázána až velice nedávno v práci Fraïsse a kol. (2017), nebo u Nepticulidae a Incurvariidae, u nichž se absence W pouze předpokládá na základě chybějícího sex-chromatinu (obr. 9).



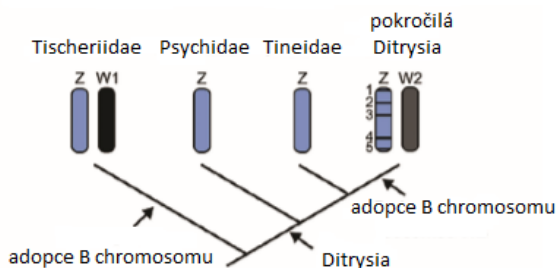
Obr. 9: Zjednodušené fylogenetické vztahy mezi skupinami řádu Lepidoptera, přítomnost W u jednotlivých skupin, modální počty chromosomů a možný původ společného W, za předpokladu sekundárních ztrát.

Vysvětlivky: červeně (čeledi testované v této práci), - (sex-chromatin/W nepřítomno), + (sex-chromatin/W přítomno), n.d. (neurčeno), n (haploidní počet chromosomů), červený kroužek (jedna z možností vzniku W), hvězdička (ne všechny druhy testované na sex-chromatin byly podrobeny i cytogenetické analýze). Převzato z Dalíková a kol., 2017; přepracováno.

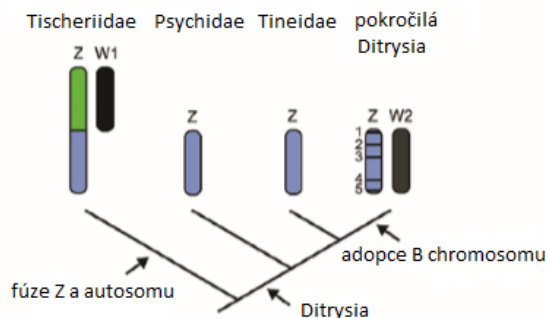
Dalším možným vysvětlením absence W u vakonošů a molů může být nezávislý vznik chromosomů W nejprve u Hepialidae, pak u Tischeriidae a později u Ditrysia, poté co došlo k odštěpení bazálních skupin (dále jen pokročilá Ditrysia) (Dalíková a kol., 2017; Traut a Marec, 1996).

V každém případě by mechanismem vzniku W mohla být buď fúze chromosomu Z s autosomem, nebo adopce B chromosomu, který se začal párovat s chromosomem Z. V případě nezávislého vzniku několika variant W by se pak tyto události u různých skupin musely opakovat nebo kombinovat. Zda chromosom W vznikl pouze jednou (Euheteroneura) nebo dvakrát (Tischeriidae + pokročilá Ditrysia), a zda pochází z B chromosomu či z fúze Z s autosomem se pokusili ve své práci zjistit Dalíková a kol. (2017), kteří mapovali syntenii genů na chromosomu Z. Podařilo se jim vyloučit možnost, že chromosom W vznikl nezávisle u pokročilých Ditrysia fúzí autosomu a chromosomu Z. Pokud by tomu tak bylo, musely by se některé z vybraných genů vyskytovat u bazálních Ditrysia na autosomech – což tato práce přesvědčivě vyvrátila, a naopak potvrdila mezi těmito skupinami konzervovanou syntenii genů ležících na Z. Na základě nižší parsimonie dále zavrhuje jediný vznik W, neboť taková událost by vyžadovala jeden vznik W a později jeho dvě nezávislé ztráty u Psychidae a Tineidae. Navrhují tedy nezávislý vznik W u Tischeriidae a u pokročilých Ditrysia, a to buď mechanismem nezávislé adopce B chromosomu u obou skupin, anebo fúzí autosomu s chromosomem Z u Tischeriidae v kombinaci s adopcí B chromosomu u pokročilých Ditrysia (obr. 10).

### a) Dvě nezávislé adopce B chromosomů



### b) Fúze Z a autosomu + adopce B chromosomu



Obr. 10: Navržené mechanismy nezávislého vzniku W u Tischeriidae a pokročilých Ditrysia. Převzato z Dalíková a kol. (2017), přepracováno.

Autoři práce se navíc přiklánějí k druhé variantě (obr. 10b), a to kvůli sníženému počtu chromosomů pozorovanému u skupiny Tischeriidae, naznačujícím zvýšenou pravděpodobnost chromosomálních fúzí. Narozdíl od této studie, nejnovější práce Fraïsse a kol. (2017) se přiklání ke vzniku W z B chromosomu na základě zjištěné vysoké konzervovanosti chromosomu Z napříč skupinou motýlů, přičemž navrhuje dvě varianty jeho původu: skupinu Euheteroneura, nebo některou ze skupin bazálních motýlů. Není totiž možné ignorovat skutečnost, že několik vyšetřených hrotnokřídlců Hepialidae chromosom W má – v jejich případě připadá v úvahu buď nezávislý vznik jedné z variant W, anebo vznik jediného původního W: tato hypotéza je však méně parsimonická, protože předpokládá větší množství sekundárních ztrát chromosomu W.

Pro komplexní pochopení evoluce chromosomu W bude potřeba směřovat výzkum k bazálním skupinám motýlů, a dále k bazálním Ditrysia, jako jsou například Meessiidae. V první řadě je nezbytné ověřit u nich ne/přítomnost chromosomu W spolehlivými cytogenetickými technikami a provést rozsáhlejší studii syntenie genů na chromosomu Z u bazálních druhů motýlů. Navíc, informace o absenci sex-chromatinu u mnoha skupin (včetně vakonošů a molů) pocházejí z velmi úzkého vzorku druhů, a nemusí platit pro další druhy v dané skupině. Proto bude nutné rozšířit množství testovaných druhů v rámci jednotlivých čeledí.



## 6. ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce bylo ověřit absenci chromosomu W u vakonošů Psychidae. Pro tyto účely byla u pěti druhů vakonošů (*T. tubulosa*, *P. betulina*, *P. crassiorella*, *D. triquetrella* a *P. grasslinella*) analyzována polyploidní interfázni jádra, u nichž byla jednoznačně vyloučena přítomnost sex-chromatinu. Dále byl u tří druhů vakonošů (*T. tubulosa*, *P. betulina* a *P. crassiorella*) a jednoho druhu mola (*T. bisselliella*) analyzován počet chromosomů. U zbylých dvou druhů se bohužel nepodařilo získat mitotické a meiotické preparáty, tudíž nebylo možné provést detailnější analýzu. U dvou druhů vakonošů (*T. tubulosa* a *P. crassiorella*) byl potvrzen již známý stav, a u druhů *P. betulina* (n=31) a *T. bisselliella* (n=30) byl nově určen na základě mitotických preparátů.

Nejdůležitější důkazy přinesla přímá cytogenetická analýza pachytenních chromosomů – u všech čtyř výše zmíněných druhů jsem u samic identifikovala Z univalent, a metoda komparativní genomové hybridizace definitivně vyloučila přítomnost diferencovaného chromosomu W. U druhu *P. crassiorella* jsem navíc detekovala terminální část chromosomu, která byla jak na samičích tak na samčích preparátech výrazněji označena samičí sondou. Vyloučila jsem variantu, že by se mohlo jednat o sekvence specifické pro samice – možnými vysvětleními zůstává vnitrodruhová variabilita v počtu repetitivních sekvencí, anebo fúze autosomu s B chromosomem.

Součástí mé práce dále bylo provést základní cytogenetický screening karyotypu, a určit počet a polohu klastrů histonu H3 a 18S rDNA. U tří druhů vakonošů (*T. tubulosa*, *P. betulina* a *P. crassiorella*) jsem určila přítomnost jediného intersticiálního klastru H3. Tyto výsledky jsou shodné s jedním intersticiálním klastrem u *T. biselliella*, který byl určen v práci Hladová (2015), a celkově korelují se známými výsledky u dalších druhů motýlů, čímž podporují představu o konzervativním chování klastrů histonu H3. U stejných druhů a u mola *T. biselliella* jsem určovala i počet a lokalizaci klastrů 18S rDNA. Výsledek *T. biselliella* byl shodný s prací Hladová (2015), kde jsem potvrdila jeden intersticiální klastr. Druhy *P. betulina* a *P. crassiorella* měly shodný počet terminálně umístěných klastrů (čtyři), u druhu *P. betulina* navíc dva z nich ležely na opačných koncích téhož chromosomu. Zajímavou distribuci klastrů jsem pozorovala u *T. tubulosa*, kde byly tři silné klastry intersticiálně lokalizovány na stejném chromosomu. Čtvrtý klastr o nízkém počtu kopií bylo obtížné detekovat a jeho poloha zůstala

neurčena. V porovnání s dalšími druhy z dostupných studií se jedná o zcela unikátní distribuci, a celkově se počet klastrů rDNA u vakonošů zdá vyšší než je mezi motýly obvyklé. Pravděpodobně se zde jedná o odvozený stav, který může naznačovat aktivitu mobilních elementů v genomu nebo časté ektopické rekombinace.

Závěrem tedy mohu říci, že jsem úspěšně provedla screening karyotypu a určila polohu a počet klastrů histonu H3 a 18S rDNA u vybraných druhů. Hlavně se mi ale podařilo poskytnout dostatek přímých i nepřímých důkazů, které jednoznačně potvrzují absenci chromosomu W u vakonošů, a přispět tak ke komplexním znalostem o jeho původu.

## **7. POUŽITÉ ZDROJE:**

- Abe, H., Fujii, T., Shimada, T., a Mita, K. (2010). Novel non-autonomous transposable elements on W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Genetics*, 89: 375–387. <https://doi.org/10.1007/s12041-010-0049-3>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., a Lipman, D. J. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215: 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Beldade, P., Saenko, S. V., Pul, N., a Long, A. D. (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. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000366>
- Bhat, T. A., a Wani, A. A. (2017). Chromosome structure and aberrations. *Springer*. 260-303. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-3673-3>
- Bickmore, W. (2001). Karyotype analysis and chromosome banding. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–7. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0001160>
- Bigger, T. R. L. (1976). Karyotypes of three species of Lepidoptera including an investigation of B-chromosomes in *Pieris*. *Cytologia*, 41: 261–282.
- Blackmon, H., Ross, L., a Bachtrog, D. (2016). Sex determination, sex chromosomes, and karyotype evolution in insects. *The Journal of Heredity*, 108: 78-93. <https://doi.org/10.1093/jhered/esw047>
- Bombarová, M., Marec, F., Nguyen, P., a Špakulová, M. (2007). Divergent location of ribosomal genes in chromosomes of fish thorny-headed worms, *Pomphorhynchus laevis* and *Pomphorhynchus tereticollis* (Acanthocephala). *Genetica*, 131: 141–149. <https://doi.org/10.1007/s10709-006-9124-3>
- Brown, E. J., a Bachtrog, D. (2014). The chromatin landscape of *Drosophila*: Comparisons between species, sexes, and chromosomes. *Genome Research*, 24: 1125–1137. <https://doi.org/10.1101/gr.172155.114>
- Budworth, H., a McMurray, C. T. (2013). A brief history of triplet repeat diseases. *Methods in Molecular Biology*, 277: 705-714. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-411-1-1>
- Cabral-de-Mello, D. C., Oliveira, S. G., de Moura, R. C., a Martins, C. (2011). Chromosomal

- organization of the 18S and 5S rRNAs and histone H3 genes in Scarabaeinae coleopterans: insights into the evolutionary dynamics of multigene families and heterochromatin. *BMC Genetics*, 12: 88. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-12-88>
- Camacho, J. P. M., Cabrero, J., López-León, M. D., Bakkali, M., a Perfectti, F. (2003). The B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* and the intragenomic conflict. *Genetica*, 117: 77–84. <https://doi.org/10.1023/A:1022311320394>
- Carabajal Paladino, L. Z., Nguyen, P., Šíchová, J., a Marec, F. (2014). Mapping of single-copy genes by TSA-FISH in the codling moth, *Cydia pomonella*. *BMC Genetics*, 15: S15. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-15-S2-S15>
- Carvalho, A. B. (2002). Origin and evolution of the *Drosophila* Y chromosome. *Current Opinion in Genetics a Development*, 12: 664–668. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(02\)00356-8](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(02)00356-8)
- Castillo, E. R. D., Taffarel, A., Maronna, M. M., Cigliano, M. M., Palacios-Gimenez, O. M., Cabral-De-Mello, D. C., a Martí, D. A. (2017). Phylogeny and chromosomal diversification in the *Dichroplus elongatus* species group (Orthoptera, Melanoiplinae). *PLoS ONE*, 12: e0172352. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172352>
- Charlesworth, B. (1991). The evolution of sex chromosomes. *Science*, 251: 1030–3. <https://doi.org/10.1126/science.1998119>
- Cheong, Y. L., Sajap, A. S., Hafidzi, M. N., Omar, D., a Abood, F. (2010). Outbreaks of bagworms and their natural enemies in an oil palm, *Elaeis guineensis*, plantation at Hutan Melintang, Perak, Malaysia. *Journal of Entomology*, 7: 141–151. <https://doi.org/10.3923/je.2010.141.151>
- Chevasco, V., Elzinga, J. A., Galarza, J. A., Mappes, J., a Grapputo, A. (2013). Investigating the origin of parthenogenesis and ploidy level in *Dahlica fennicella* (Lepidoptera: Psychidae). *Annales Zoologici Fennici*, 50: 125–145. <https://doi.org/10.5735/086.050.0301>
- d’Alençon, E., Sezutsu, H., Legeai, F., Permal, E., Bernard-Samain, S., Gimenez, S., Feyereisen, R. (2010). Extensive synteny conservation of holocentric chromosomes in Lepidoptera despite high rates of local genome rearrangements. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107: 7680–7685. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910413107>

- Dalíková, M., Zrzavá, M., Hladová, I., Nguyen, P., Šonský, I., Flegrová, M., Kubíčková, S., Voleníková, A., Kawahara, A., Y., Peters, R., S., Marec, F. (2017). New insights into the evolution of the W chromosome in Lepidoptera. *Journal of Heredity*, 108: 709-719. <https://doi.org/10.1093/jhered/esx063>
- Eickbush, T. H., a Eickbush, D. G. (2007). Finely orchestrated movements: Evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics*, 175: 477-85. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.071399>
- Elzinga, J., Jokela, J., a Shama, L. N. S. (2013). Large variation in mitochondrial DNA of sexual and parthenogenetic *Dahlica triquetrella* (Lepidoptera: Psychidae) shows multiple origins of parthenogenesis. *BMC Evolutionary Biology*, 13: 90. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-90>
- Fraïsse, C., Picard, M. A. L., a Vicoso, B. (2017). The deep conservation of the Lepidoptera Z chromosome suggests a non-canonical origin of the W. *Nature Communications*, 8: 1486. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01663-5>
- Fuková, I., Nguyen, P., a Marec, F. (2005). Codling moth cytogenetics: karyotype, chromosomal location of rDNA, and molecular differentiation of sex chromosomes. *Genome*, 48: 1083–1092. <https://doi.org/10.1139/g05-063>
- Fuková, I., Traut, W., Vítková, M., Nguyen, P., Kubíčková, S., a Marec, F. (2007). Probing the W chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin. *Chromosoma*, 116: 135–145. <https://doi.org/10.1007/s00412-006-0086-0>
- Grapputo, A., Kumpulainen, T., a Mappes, J. (2005). Phylogeny and evolution of parthenogenesis in Finnish bagworm moth species (Lepidoptera: Psychidae: Naryciinae) based on mtDNA-markers. *Annales Zoologici Fennici*, 42: 141–160.
- Hans, F., a Dimitrov, S. (2001). Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene*, 20: 3021–3027. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204326>
- Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., a Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 14812–14817. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406166101>
- Hladová, I. (2015). Nové cytogenetické markery a evoluční dynamika karyotypů motýlů.

Diplomová práce, Jihočeská Univerzita.

- Kamarudin, N., Ahmad, S. N., Arshad, O., a Wahid, M. B. (2010). Pheromone mass trapping of bagworm moths, *Metisa plana* Walker (Lepidoptera: Psychidae), for its control in mature oil palms in Perak, Malaysia. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 13: 101–106. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2009.11.003>
- 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. <https://doi.org/10.1007/BF00140224>
- Kiuchi, T., Koga, H., Kawamoto, M., Shoji, K., Sakai, H., Arai, Y., Katsuma, S. (2014). A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm. *Nature*, 509: 633–636. <https://doi.org/10.1038/nature13315>
- Levan, A., Fredga, K., a Sandberg, A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52: 201–220. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x>
- Luger, K., Mäder, a W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., a Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389: 251–260. <https://doi.org/10.1038/38444>
- Lukhtanov, V. A. (2000). Sex chromatin and sex chromosome systems in nonditrysian Lepidoptera (Insecta). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 38: 73–79. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0469.2000.382130.x>
- Macek, J. (2009). *Motýli a housenky střední Evropy: Noční motýli I*. Academia. 48-56.
- Mácha, J., Teichmanová, R., Sater, A. K., Wells, D. E., Tlapáková, T., Zimmerman, L. B., a Krylov, V. (2012). Deep ancestry of mammalian X chromosome revealed by comparison with the basal tetrapod *Xenopus tropicalis*. *BMC Genomics*, 13: 315. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-315>
- Makee, H., a Tafesh, N. (2007). Sex chromatin body as a cytogenetic marker of W chromosome aberrations in *Cydia pomonella* females. *Area-Wide Control of Insect Pests: From Research to Field Implementation*, 81: 113–118. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6059-5\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6059-5_9)
- Manitera.cz. (2017). Živočišní škůdci: Vakonoš ovocný. Dostupné z: <http://www.manitera.cz/zivocisni-skudci/motyli-lepidoptera/vakonos-ovocny-vakonos->

podkopenkovy/

- Marec, F. (2014). Developmental genetics: Female silkworms have the sex factor. *Nature*, 509(7502), 570–571. <https://doi.org/10.1038/nature13336>
- Marec, F., a Novák, K. (1998). Absence of sex chromatin corresponds with a sex-chromosome univalent in females of Trichoptera. *European Journal of Entomology*, 95: 197–209.
- Mediouni, J., Fuková, I., Frydrychová, R., Marec, F., Fuková, I., Marec, F., a Dhouibi, M. H. (2004). Karyotype, sex chromatin and sex chromosome differentiation in the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae). *Caryologia*, 57: 184–194. <https://doi.org/10.1080/00087114.2004.10589391>
- Mutanen, M., Wahlberg, N., a 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. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0392>
- Nanda, I., Schlegelmilch, K., Haaf, T., Scharl, M., a Schmid, M. (2008). Synteny conservation of the Z chromosome in 14 avian species (11 families) supports a role for Z dosage in avian sex determination. *Cytogenetic and Genome Research*, 122: 150–156. <https://doi.org/10.1159/000163092>
- Nguyen, P., Sahara, K., Yoshido, A., a Marec, F. (2010). Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica*, 138: 343–354. <https://doi.org/10.1007/s10709-009-9424-5>
- Niitsu, S. (2003). Postembryonic development of the wing imaginal discs in the female wingless bagworm moth *Eumeta variegata* (Lepidoptera, Psychidae). *Journal of Morphology*, 257: 164–170. <https://doi.org/10.1002/jmor.10116>
- Nokkala, S., Grozeva, S., Kuznetsova, V., a Maryanska-Nadachowska, A. (2003). The origin of the achiasmatic XY sex chromosome system in *Cacopsylla peregrina* (Psylloidea, Homoptera). *Genetica*, 119: 327–332. <https://doi.org/10.1023/B:GENE.00000003757.27521.4d>
- Nowak, S. J., a Corces, V. G. (2000). Phosphorylation of histone H3 correlates with transcriptionally active loci. *Genes and Development*, 14: 3003–3013. <https://doi.org/10.1101/gad.848800>
- Pansonato-Alves, J. C., Serrano, É. A., Utsunomia, R., Camacho, J. P. M., Da Costa Silva, G.

- J., Vicari, M. R., Foresti, F. (2014). Single origin of sex chromosomes and multiple origins of B chromosomes in fish genus *Characidium*. *PLoS ONE*, 9: e107169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107169>
- Pérez-González, C. E., a Eickbush, T. H. (2001). Dynamics of R1 and R2 elements in the rDNA locus of *Drosophila simulans*. *Genetics*, 158: 1557–1567.
- Pringle, E. G., Baxter, S. W., Webster, C. L., Papanicolaou, A., Lee, S. F., a Jiggins, C. D. (2007). Synteny and chromosome evolution in the lepidoptera: Evidence from mapping in *Heliconius melpomene*. *Genetics*, 177: 417–426. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.073122>
- Rhains, M., Davis, D. R., a Price, P. W. (2009). Bionomics of Bagworms (Lepidoptera: Psychidae). *Annual Review of Entomology*, 54: 209–226. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090448>
- Rice, W. R. (1987). The accumulation of sexually antagonistic genes as a selective agent promoting the evolution of reduced recombination between primitive sex chromosomes. *Evolution*, 41: 911–914. <https://doi.org/10.2307/2408899>
- Roa, F., a Guerra, M. (2012). Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications. *BMC Evolutionary Biology*, 12: 225. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-225>
- Sahara, K., Marec, F., Eickhoff, U., a Traut, W. (2003). Moth sex chromatin probed by comparative genomic hybridization (CGH). *Genome*, 46: 339–342. <https://doi.org/10.1139/g03-003>
- Sahara, K., a 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2001.00958.x>
- Sahara, K., Yoshido, A., a Traut, W. (2012). Sex chromosome evolution in moths and butterflies. *Chromosome Research*, 20: 83–94. <https://doi.org/10.1007/s10577-011-9262-z>
- Sankaran, T. (1970). The oil palm bagworms of sabah and the possibilities of their biological control. *Tropical Pest Management*, 16: 43–55. <https://doi.org/10.1080/09670877009411717>
- Sattler, K. (1991). A review of wing reduction in Lepidoptera. *Bulletin of the British Museum*



- (*Natural History*), 60: 243–288.
- Schubert, I. (1984). Mobile nucleolus organizing regions (NORs) in *Allium* (Liliaceae s. lat.) - Inferences from the specificity of silver staining. *Plant Systematics and Evolution*, 144: 291–305. <https://doi.org/10.1007/BF00984139>
- Seiler, J. (1919). Researches on the sex-chromosomes of Psychidae (Lepidoptera). *Biological Bulletin*, 36: 399–404.
- Seiler, J. (1922). Geschlechtschromosomen, Untersuchungen an Psychiden. *Genetics*, 2: 240–270.
- Sharma, V. I., Obe, G., a Sobti, R. C. (2002). *Some Aspects of Chromosome Structure and Function*. Springer Science a Business Media, 354-378.
- Šíchová, J., Nguyen, P., Dalíková, M., a Marec, F. (2013). Chromosomal evolution in tortricid moths: Conserved karyotypes with diverged features. *PLoS ONE*, 8: e64520. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064520>
- Šíchová, J., Voleníková, A., Dincă, V., Nguyen, P., Vila, R., Sahara, K., a Marec, F. (2015). Dynamic karyotype evolution and unique sex determination systems in *Leptidea* wood white butterflies. *BMC Evolutionary Biology*, 15: 89. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0375-4>
- Tazima, Y. (1964). The Genetics of the Silkworm. *Academic*.
- Traut, W. (1999). The evolution of sex chromosomes in insects: Differentiation of sex chromosomes in flies and moths. *European Journal of Entomology*, 96: 227-235.
- Traut, W., Eickhof, U., a Schorch, J. C. (2001). Identification and analysis of sex chromosomes by comparative genomic hybridization (CGH). *Methods in Cell Science*, 23: 155–161. <https://doi.org/10.1023/A:1013138925996>
- Traut, W., a Marec, F. (1996). Sex chromatin in Lepidoptera. *The Quarterly Review of Biology*, 71: 239–256. <https://doi.org/10.1086/419371>
- Traut, W., Sahara, K., a Marec, F. (2008). Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sexual Development*, 1: 332-346. <https://doi.org/10.1159/000111765>
- Traut, W., Sahara, K., Otto, T. D., a Marec, F. (1999). Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma*, 108: 173–180. <https://doi.org/10.1007/s004120050366>
- Trerè, D. (2000). Ag NOR staining and quantification. *Micron*, 31: 127–131.

- [https://doi.org/10.1016/S0968-4328\(99\)00069-4](https://doi.org/10.1016/S0968-4328(99)00069-4)
- Turner, B. M. (2000). Histone acetylation and an epigenetic code. *BioEssays*, 22: 836–845.  
[https://doi.org/10.1002/1521-1878\(200009\)22:9<836::AID-BIES9>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1521-1878(200009)22:9<836::AID-BIES9>3.0.CO;2-X)
- van Beers, E. H., a Nederlof, P. M. (2006). Array-CGH and breast cancer. *Breast Cancer Research*, 8: 210. <https://doi.org/10.1186/bcr1510>
- Vítková, M., Fuková, I., Kubičková, S., a Marec, F. (2007). Molecular divergence of the W chromosomes in pyralid moths (Lepidoptera). *Chromosome Research*, 15: 917–930.  
<https://doi.org/10.1007/s10577-007-1173-7>
- Voleníková, A. (2015). Analýza pohlavních chromosomů vybraných druhů primitivních motýlů z čeledi hrotnokřídlecovití (Lepidoptera: Hepialoidea). Diplomová práce, Jihočeská Univerzita.
- Waterborg, J. H. (2012). Evolution of histone H3: emergence of variants and conservation of post-translational modification sites. *Biochemistry and Cell Biology*, 90: 79–95.  
<https://doi.org/10.1139/o11-036>
- Wolf, K. W., Novák, K., a Marec, F. (1997). Kinetic organization of metaphase I bivalents in spermatogenesis of Lepidoptera and Trichoptera species with small chromosome numbers. *Heredity*, 79: 135–143. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6881550>
- Wright, A. E., Dean, R., Zimmer, F., a Mank, J. E. (2016). How to make a sex chromosome. *Nature Communications*, 7: 12087. <https://doi.org/10.1038/ncomms12087>
- Yasukochi, Y., Miura, N., Nakano, R., Sahara, K., a Ishikawa, Y. (2011). Sex-linked pheromone receptor genes of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, are in tandem arrays. *PLoS ONE*, 6: e18843. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018843>
- Yasukochi, Y., Tanaka-Okuyama, M., Shibata, F., Yoshido, A., Marec, F., Wu, C., Sahara, K. (2009). Extensive conserved synteny of genes between the karyotypes of *Manduca sexta* and *Bombyx mori* revealed by BAC-FISH mapping. *PLoS ONE*, 4: e7465.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007465>
- Yoshida, K., Terai, Y., Mizoiri, S., Aibara, M., Nishihara, H., Watanabe, M., Okada, N. (2011). B chromosomes have a functional effect on female sex determination in lake victoria cichlid fishes. *PLoS Genetics*, 7: e1002203.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002203>
- Yoshido, A., Bando, H., Yasukochi, Y., a Sahara, K. (2005). The *Bombyx mori* karyotype and

- the assignment of linkage groups. *Genetics*, 170: 675–685.  
<https://doi.org/10.1534/genetics.104.040352>
- Yoshido, A., Marec, F., a Sahara, K. (2016). The fate of W chromosomes in hybrids between wild silkmoths, *Samia cynthia* ssp.: no role in sex determination and reproduction. *Heredity*, 116: 424–433. <https://doi.org/10.1038/hdy.2015.110>
- Yoshido, A., Yamada, Y., a 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. <https://doi.org/10.11416/jibs.75.147>
- Zhang, L., Bao, Z., Wang, S., Huang, X., a Hu, J. (2007). Chromosome rearrangements in Pectinidae (Bivalvia: Pteriomorphia) implied based on chromosomal localization of histone H3 gene in four scallops. *Genetica*, 130: 193–198.  
<https://doi.org/10.1007/s10709-006-9006-8>

## **8. PŘÍLOHY**

### **Příloha 1: Primery použité pro barcoding**

FORWARD: ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG

REVERSE: TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA

### **Příloha 2: Degenerované primery pro amplifikaci a značení histonu H3**

FORWARD: ATGGCNCGTACNAARCARAC

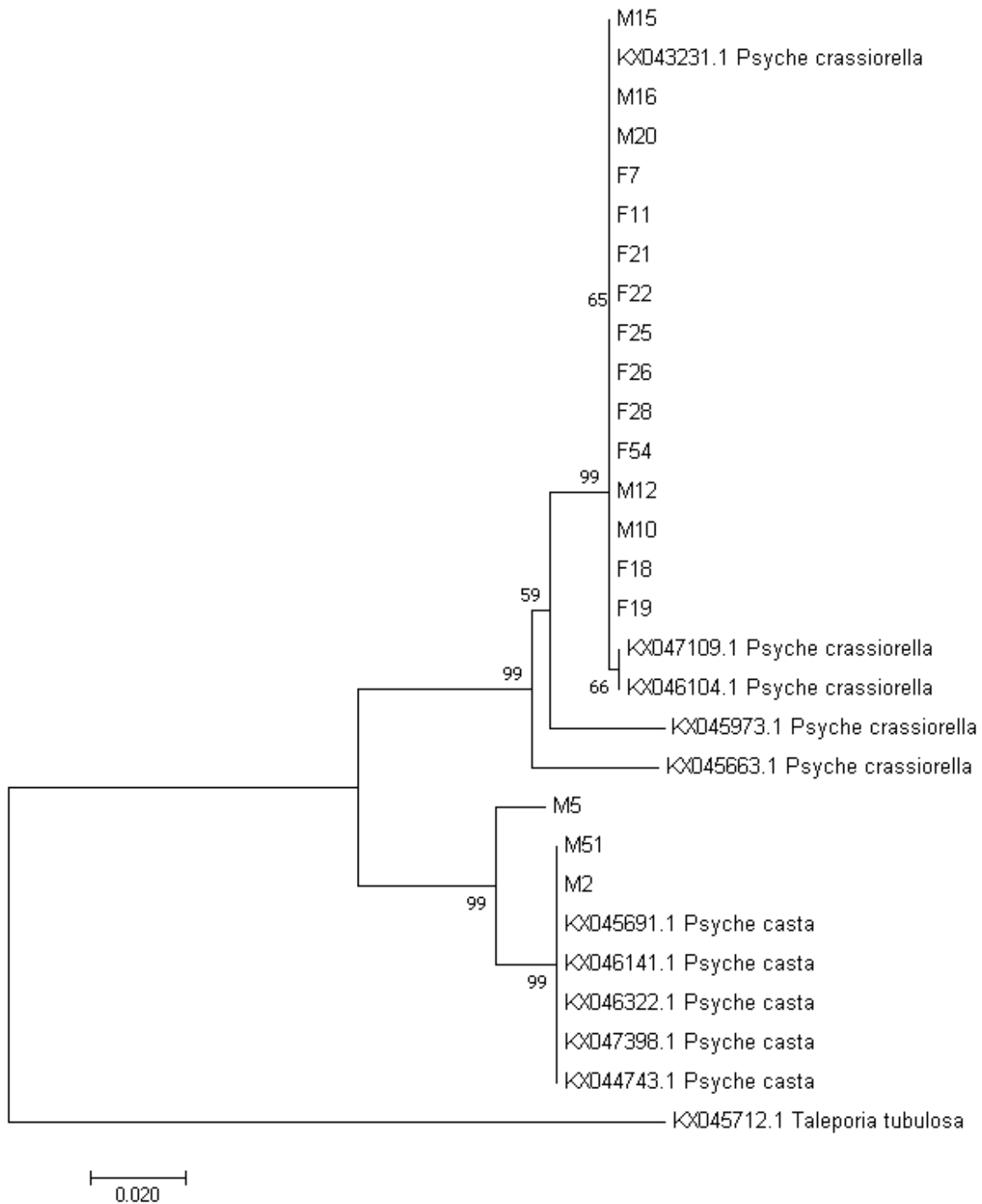
REVERSE: TANGCACGYTCNCGGAT

### **Příloha 3: Tabulka referenčních sekvencí COI z NCBI GenBank**

**Tab.1: Referenční sekvence**

<b>Druh</b>	<b>Přístupový kód NCBI</b>
<i>Psyche casta</i>	KX046141.1
<i>Psyche casta</i>	KX046322.1
<i>Psyche casta</i>	KX046322.1
<i>Psyche casta</i>	KX047398.1
<i>Psyche casta</i>	KX045691.1
<i>Psyche crassiorella</i>	KX047109.1
<i>Psyche crassiorella</i>	KX046104.1
<i>Psyche crassiorella</i>	KX045973.1
<i>Psyche crassiorella</i>	KX043231.1
<i>Psyche crassiorella</i>	KX045663.1
<i>Taleporia tubulosa</i>	KX045712.1

## Příloha 4: Fylogenetický strom rozlišující druhy



Rozlišení druhů *Psyche casta* a *Psyche crassiorella* metodou barcoding, *Taleporia tubulosa* použita jako vnější skupina (outgroup). Vysvětlivky: M = samec, F = samice.