

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



**Srovnání molekulární divergence pohlavních
chromosomů a autosomů u příbuzných druhů
obalečů (Tortricidae)**

Diplomová práce

Bc. Jindra Šichová

Školitel: **Prof. RNDr. František Marec, CSc.**

České Budějovice

2011

Šíchová, J., 2011: Srovnání molekulární divergence pohlavních chromosomů a autosomů u příbuzných druhů obalečů (Tortricidae). [Molecular divergence of sex chromosomes compared to autosomes in related species of tortricids. Mgr. Thesis, in Czech] – 60 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

In systems with female heterogamety (e.g. WZ/ZZ; female/male), the Z chromosome has several characteristics that distinguish it from autosomes, such as different effective population size (N_e) and hemizygoty in the heterogametic sex. These characteristics may lead to an accelerated rate of adaptive changes for the Z-linked genes compared to autosomal coding sequences, often referred to as the Fast-Z effect. This work is the first attempt to test the Fast Z effect in Lepidoptera by using two methodological approaches. These included comparative fluorescence *in situ* hybridizations and comparisons of substitution rates in coding sequences.

Finanční podpora:

Tato práce byla financována z grantů GAČR č. 523/09/2106 a GAAV č. IAA600960925 při Entomologickém ústavu BC AV ČR a z projektu GA JU č. 137/2010/P.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích, dne 26. 4. 2011

.....
Jindra Šíchová

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala své rodině, která mě po celou dobu studia velice podporovala. Dále svému školiteli Frantovi Marecovi za to, že mi vždy zadá téma, díky kterému se naučím mnohem více než bylo původně v plánu. Velký dík patří také Svatavě Kubičkové, která nám nejen umožnila pracovat s laserovým mikroskopem, ale i velmi ochotně pomáhala při mikrodisekci chromosomů. A především mé poděkování patří Petrovi a Martině za obrovskou trpělivost s mojí osobou, přínosné rady a poskytnutý materiál. Petrovi pak ještě za uvedení do problematiky a pomoc při dokončování práce. Celému kolektivu laboratoře pak děkuji za skvělou pracovní atmosféru.

1.	Úvod	1
1.1.	Evoluce pohlavních chromosomů	1
1.2.	Homogametické pohlavní chromosomy	2
1.3.	Sexuálně antagonistická selekce a MSCI	3
1.4.	Pohlavní chromosomy a speciace	4
1.5.	Evoluce pohlavních chromosomů motýlů	6
1.6.	Fylogenetické vztahy vybraných druhů motýlů z čeledi Tortricidae	8
2.	Cíle práce	9
3.	Materiál a metody	10
3.1.	Použité druhy motýlů	10
3.2.	Příprava chromosomálních preparátů	10
3.3.	Barvení chromosomů	11
3.4.	Laserová mikrodisekce	12
3.5.	Příprava sond	12
3.6.	Příprava kompetitorové DNA pro <i>in situ</i> hybridizace	13
3.7.	<i>In situ</i> hybridizace	14
3.8.	Izolace genů	15
3.9.	Vlastní zpracování sekvencí	17
4.	Výsledky	19
4.1.	Karyotypy vybraných obalečů z čeledi Tortricidae	19
4.2.	Studium divergence genomu pomocí malovacích sond	22
4.3.	Stanovení “Fast-Z” efektu na základě srovnání d_N/d_S	24
5.	Diskuze	26
5.1.	Karyotypy zástupců čeledi Tortricidae	26
5.2.	Divergence genomů zástupců čeledi Tortricidae	29
6.	Souhrn	34
7.	Literatura	35
8.	Přílohy	43

1. Úvod

1.1. Evoluce pohlavních chromosomů

Pohlavní chromosomy jsou významnou součástí genomů mnoha organismů a hrají důležitou roli v evolučních procesech jako pohlavní výběr či speciace. V průběhu evoluce se vyvinuly zcela nezávisle u různých druhů rostlin a živočichů, což nasvědčuje tomu, že jejich utváření ovlivňují podobné síly (Charlesworth 1996).

Soudí se, že pohlavní chromosomy vznikly z původně homologního páru autosomů poté, co jeden z partnerů získal gen determinující pohlaví jedince. V dalším kroku pak selekce preferovala stěhování sexuálně antagonistických genů, tj. výhodných pro jedno ale škodlivých pro druhé pohlaví, do vazby k příslušnému genu. Jelikož genetická rekombinace narušuje vazebnou nerovnováhu alel těchto genů, je evolučně velmi výhodné zabránit rekombinaci v daném lokusu chromosomálními přestavbami tak, aby nedošlo ke ztrátě výhod plynoucích ze dvou oddělených pohlaví (Bergero a Charlesworth 2009). Restrikce rekombinace mezi pohlavními chromosomy pak v konečném důsledku vede k degeneraci funkčních genů a šíření repetitivních sekvencí u pohlavně specifických chromosomů, chromosomu Y v systémech určení pohlaví typu XY/XX a chromosomu W v systémech typu WZ/ZZ (Bachtrog 2006, Vítková a kol. 2007, Bergero a Charlesworth 2009).

Degenerace heteromorfních chromosomů je způsobena hned několika souběžně působícími mechanismy. Prvním z nich je proces známý jako Müllerova rohatka (“Müllers ratchet”), tj. nenávratné hromadění mírně škodlivých a neutrálních alel v populaci v důsledku genetického driftu. Jinými slovy, pokud je rychlost vzniku mutací dostatečně vysoká, chromosomy bez mutací budou přítomny v populaci pouze v nízké frekvenci a vlivem genetického driftu budou ztraceny. Chromosomy se do původního stavu mohou dostat pouze zpětnou mutací, jejíž výskyt je vysoce nepravděpodobný (Charlesworth a Charlesworth 1997). Dalším jevem podílejícím se na úpadku pohlavních chromosomů je genetický draft nazývaný též evoluční svezení se (“genetic hitchhiking”), kdy výhodná mutace zapříčiní fixaci všech škodlivých mutací, které jsou s ní v těsné vazbě (Rice 1987, Bachtrog a Gordo 2004). Třetím a neméně důležitým mechanismem degenerace je selekce na pozadí (“background selection”). Při této selekci jsou neutrální mutace odstraněny z genofondu populace díky tomu, že se nacházejí na chromosomu v blízkosti nově vzniklé selekčně negativní mutace a jsou eliminovány spolu s ní. Tento jev vede ke snížení efektivní velikosti populace (N_e) chromosomu Y, čímž posiluje vliv genetického driftu na fixaci škodlivých mutací (Charlesworth 1994). Relativní význam těchto modelů však není dosud zcela jasný a může se lišit mezi organismy (Charlesworth and Charlesworth 2000, Bachtrog 2004, Bachtrog 2006).

Výsledkem degenerace pohlavních chromosomů Y a W je vznik pseudogenů a hromadění repetitivních sekvencí, zejména transposonů (Steinemann a Steinemann 2005), tvořících často rozsáhlé bloky heterochromatinu. Na chromosomu Y se však nachází i nezanedbatelné množství funkčních genů, z nichž se u živočichů většina exprimuje ve varlatech (Ellegren 2011). Při absenci rekombinace

by však tyto geny byly odsouzeny k zániku, a to procesy zmíněnými výše v textu. V průběhu evoluce se tedy zákonitě musely vyvinout mechanismy zabraňující degeneraci těchto klíčových genů. Rozsáhlé sekvenační studie lidského chromosomu Y odhalily v jeho nerekombinující části 8 prakticky identických palindromických sekvencí. Jejich vysoká míra homologie je udržována genovou konverzí a právě ta slouží k případné opravě mutované alely na alelu původní (Rozen a kol. 2003, Skaletsky a kol. 2003).

Značná divergence heteromorfních chromosomů v průběhu evoluce byla potvrzena mezidruhovými srovnávacími analýzami. Hughes a kol. (2010) srovnávali Y chromosomy šimpanze a člověka a potvrdili značné rozdíly v jejich složení. Tyto změny zahrnovaly expanzi palindromických sekvencí a velké ztráty genů kódujících proteiny. To samé potvrdili Koerich a kol. (2008) u octomilek rodu *Drosophila*. Podobná data jsou v systémech určení pohlaví typu WZ/ZZ stále vzácná. Vítková a kol. (2007) však za pomoci malovací sondy poukázali na rychlou ztrátu homologie mezi sekvencemi chromosomu W u blízce příbuzných druhů motýlů z čeledi Pyralidae (zavíječovití).

1.2. Homogametické pohlavní chromosomy

Na rozdíl od svých párovacích partnerů se homogametické pohlavní chromosomy, X nebo Z, mnohem více podobají svým autosomálním předkům. Přesto se od nich v některých ohledech významně liší. Například u chromosomu X je ve srovnání s autosomy rozdíl v genovém obsahu, který je daný jeho hemizygotní konstitucí u samců. Každá nově vzniklá recesivní mutace, která samci přináší alespoň částečnou reprodukční výhodu, je v heterozygotním stavu přímo vystavena selekci a proto rychleji fixována. Důsledkem toho by mělo docházet k tzv. maskulinizaci chromosomu X, tj. akumulaci genů prospěšných pro samce na chromosomu X (Rice 1984). Na druhou stranu však chromosom X stráví dvě třetiny svého evolučního putování v samici a pouze jednu třetinu v samci. Selektce má tedy mnohem větší šanci působit na geny zvýhodňující samice a naopak feminizovat chromosom X (Rice 1984).

Homomorfní pohlavní chromosomy se od autosomů odlišují také svou efektivní velikostí populace (N_e). Za předpokladu stejného množství rozmnožujících se samců a samic odpovídá efektivní velikost populace chromosomů X/Z (N_{eXZ}) třem čtvrtinám efektivní velikosti autosomů (N_{eA}). Nicméně velikost efektivní populace chromosomu X je ovlivněna rozdíly v reprodukčním úspěchu jednotlivých pohlaví. Vyšší rozdíl v reprodukčním úspěchu zvýší N_{eX} u druhů se samčím heterogametickým pohlavím a naopak sníží N_{eZ} u druhů se samičím heterogametickým pohlavím (Vicoso a Charlesworth 2009).

Diferenciace pohlavních chromosomů způsobuje problémy v genové dávce. Geny lokalizované na párovém chromosomu jsou v homogametickém pohlaví přítomny ve dvou kopiích, zatímco u pohlaví heterogametického pouze v kopii jedné. Zachování stálé hladiny exprese u obou pohlaví řeší některé organismy tzv. kompenzací genové dávky. Různé organismy využívají odlišné mechanismy kompenzace. Nejlépe je tento mechanismus prozkoumán u savců a octomilky *Drosophila*

melanogaster. U savců nejčastěji dochází k náhodné inaktivaci chromosomu X u samic (Lyon 1961). Výjimku tvoří vačnatci, kde se preferenčně inaktivuje chromosom X zděděný od otce (Cooper a kol. 1993). Octomilka řeší problém genové dávky zdvojnásobením exprese genů lokalizovaných na chromosomu X u samců (Baker a kol. 1994). U ptáků (systém určení pohlaví WZ/ZZ) probíhá kontrola exprese genů vázaných na chromosom Z individuálně a liší se v závislosti na tkáni a stupni vývoje. Ptáci jsou schopni tolerovat nebo využívat různé množství produktů genů ležících na chromosomu Z a genovou dávku kompenzují jen u některých genů (“gene-by-gene”) zvýšením exprese podobně, jako je tomu u octomilky (Mank a Ellegren 2009). Naprostá většina genů však kompenzaci postrádá. Absence kompenzace genové dávky byla popsána také u motýlů (Johnson a Turner 1979, Suzuki a kol. 1998, Suzuki a kol. 1999). Detailní studii na toto téma provedli Zha a kol. (2009). Za pomoci čipové analýzy sledovali míru exprese 579 genů vázaných na pohlavní chromosom Z bource morušového, *Bombyx mori*. Ve všech tkáních byla exprese signifikantně vyšší u samců v porovnání se samicemi. Také tyto poznatky tedy naznačují, že globální mechanismus kompenzace genové dávky není k úspěšnému přežití druhu zapotřebí (Mank 2009).

1.3. Sexuálně antagonistická selekce a MSCI

Geny uplatňující se v pohlavním výběru často skýtají výhodu pouze pro jedno pohlaví, zatímco pro druhé mohou být škodlivé. Tyto geny nazýváme sexuálně antagonistické. Pro tento typ genů je výhodná lokalizace na pohlavních chromosomech, ať už kvůli výše zmíněné hemizygotické expresi či pohlavně závislému přenosu (“sex-bias transmission”; Rice 1984). Otázkou však zůstává, jestli preferenčně dochází k maskulinizaci či feminizaci pohlavního chromosomu X. Doposud získané výsledky totiž nejsou konzistentní a liší se mezi druhy (Vicoso a Charlesworth 2006, Ellegren a Parch 2007).

Chromosom X je u octomilky a háďátka *Caenorhabditis elegans* obohacen o geny se specifickou expresí u samic, zatímco geny exprimující se u samců jsou na něm výrazně podprezentovány (Parisi a kol. 2003, Ranz a kol. 2003, Reinke a kol. 2004). Tento trend je ještě výraznější u genů exprimovaných v gonádách (Parisi a kol. 2003). U savců je však situace odlišná. Dvě nezávislé studie prokázali, že geny exprimované v průběhu rané spermatogeneze v myších varlatech jsou významně obohaceny na pohlavním chromosomu X (Wang a kol. 2001, Khil a kol. 2004). Geny aktivní v pozdní spermatogenezi se však na chromosomu X téměř nenacházely (Khil a kol. 2004).

U organismů se systémem určení pohlaví typu WZ/ZZ je v důsledku absence kompenzace genové dávky studium sexuálně antagonistické selekce mnohem jednodušší. U kura domácího bylo zjištěno, že se na chromosomu Z nachází mnohem více genů s primární expresí v mozku samce (Kaiser a Ellegren 2006, Štorchová a Divina 2006). Akumulaci genů výhodných pro samčí pohlaví na chromosom Z potvrdili i Arunkumar a kol. (2009) při studiu transkriptomu bource morušového, *B. mori*. Odlišných výsledků se však dobral Mořkovský a kol. (2010) při srovnání míry exprese samčích

a samičích genů v zárodečných ovariálních buňkách kuřete. Na chromosomu Z se nacházelo velké množství genů se specifickou expresí v somatických buňkách ovárií, zatímco geny exprimované v primárních oocytech na něm byly výrazně podreprezentovány. Tyto výsledky naznačují, že sexuálně antagonistická selekce vede na chromosomu Z k většímu zastoupení alel výhodných pro samice.

Vedle genového obsahu se X chromosom a autosomy liší mírou pohybu genů skrze retrotranspozici (Singh a Petrov 2007). Na rozdíl od duplikovaných genů jsou geny vzniklé retrotranspozicí snadno identifikovatelné. DNA retroelementů je totiž nejprve transkribována do RNA, potom se pomocí enzymu reverzní transkriptázy opět vytvoří kopie DNA, která se následně může integrovat do nových poloh v genomu. Geny duplikované tímto způsobem neobsahují žádné introny, mají poly-A konec a invertované repetice (Ostertag a Kazazian 2001). U savců a octomilky bylo provedeno množství studií, které se zabývaly osudem retrotranspozicí vzniklých genů (shrnutí Betrán a kol. 2004). Betrán a kol. (2002) u octomilky zjistili, že retropozicí vzniklé autosomální geny pocházejí převážně z chromosomu X. Stejně výsledky byly potvrzeny i u savců (Emerson a kol. 2004, Vinckenbosch a kol. 2006), kde však souběžně docházelo k retropozici genů na pohlavní chromosom X (Emerson a kol. 2004, Potrzebowski a kol. 2010). K akumulaci retropozicí vzniklých genů dochází i na pohlavním chromosomu Z, což bylo dokázáno u kuřete (Bellott a kol. 2010). Velmi zajímavé je to, že většina retrogenů s původem na pohlavním chromosomu X se specificky exprimuje v testes (Betrán a kol. 2002, Emerson a kol. 2004, Marques a kol. 2005). U octomilky pět ze šesti genů vzniklých retrotranspozicí z pohlavního chromosomu X má expresi ve varlatech, zatímco jejich rodičovské kopie tuto pohlavně specifickou expresi postrádají (Betrán a kol. 2002).

Za tento útěk genů z pohlavního chromosomu X je vedle sexuálně antagonistické selekce zmíněné výše (Wu a Xu 2003) patrně zodpovědný také nedávno popsáný fenomén meiotické inaktivace pohlavních chromosomů, tzv. MSCI (“meiotic sex chromosome inactivation”). Při meiotické inaktivaci dochází epigenetickými modifikacemi histonů k transkripčnímu umlčení nespárovaných oblastí na pohlavních chromosomech. MSCI je tedy projevem daleko obecnějšího mechanismu - meiotické inaktivace nespárovaného chromatinu, tzv. MSUC (“meiotic silencing of unsynapsed chromatin”). Důsledky inaktivace zpravidla přetrvávají ještě dlouho po ukončení meiosis (Namekawa a Lee 2009). MSCI byla popsána u savců (Namekawa a kol. 2006, Hornecker a kol. 2007), sarančete *Eyprepocnemis plorans* (Cabrero a kol. 2007), octomilky (Hense a kol. 2007), háďátka (Bean a kol. 2004) a nedávno dokonce i u druhu se systémem určení pohlaví typu WZ/ZZ, kuřete (Schoenmakers a kol. 2009). Tyto studie naznačují, že právě MSCI je hlavní příčinou hromadného exodu genů exprimovaných ve varlatech z pohlavních chromosomů na autosomy.

1.4. Pohlavní chromosomy a speciace

Pohlavní chromosomy X nebo Z hrají významnou roli i při speciaci, ke které dochází v důsledku tvorby prezygotických či postzygotických rozmnožovacích bariér mezi nově vznikajícími druhy (Coyne a Orr, 1998).

Prezygotické bariéry působí před vznikem zygoty a zahrnují nekompatibilitu gamet, prostorové nebo časové oddělení, či jiné ekologické nebo etologické nároky. Z pohledu pohlavních chromosomů zde hraje velkou roli pohlavní výběr (Qvarnström a Baley 2009). Analýza výsledků reciprokých křížení ukázala, že znaky podléhající pohlavnímu výběru jsou ovlivněny geny vázanými na pohlavní chromosom X (Reinhold 1998). Nedávná studie však vazbu těchto znaků na chromosom X zpochybnila (Qvarnström a Baley 2009). Zajímavá je však situace u organismů s pohlavními chromosomy Z a W, kde samice preferují samce s geny prospěšnými jejich synům (Albert a Otto 2005). Saether a kol. (2007) u lejsků rodu *Ficedula* prokázali, že geny pro preference samic jsou vázané na pohlavní chromosom Z. To potvrdil i Sperling (1994) u několika druhů motýlů a Iyengar a kol. (2002) u přástevníka *Utetheisa ornatrix*. U organismů se systémem určení pohlaví typu WZ/ZZ navíc nedochází ke kompenzaci genové dávky na pohlavních chromosomech (Itoh a kol. 2007). Z tohoto důvodu jsou geny vázané na chromosom Z dvakrát více exprimované v samcích (ZZ) oproti samicím (WZ), což může vést k akumulaci pohlavně dimorfních znaků podléhajících pohlavnímu výběru na chromosomu Z.

Postzygotické bariéry, jak už název napovídá, vznikají až po oplození vajíčka a zahrnují sterilitu nebo neživotaschopnost hybridů. Tento typ izolace popisují Haldanovo a Coynovo pravidlo. První z nich říká, že pokud se v první filiální generaci F_1 mezidruhových kříženců vyskytne jedno pohlaví se sníženou fertilitou nebo životaschopností, je to mnohem častěji pohlaví heterogametické (Haldane 1922). Platnost tohoto pravidla byla prokázána u širokého spektra druhů (Coyne 1992, Laurie 1997, Presgraves 2002, Price a Bouvier 2002). Vzniká při rozdělení populace v důsledku fixace odlišných alel kódujících členy proteinových komplexů nebo signálních drah. Po opětovném spojení populace mohou tyto alely v proteinových interakcích vykazovat nekompatibilitu. Pokud je pro plnou životaschopnost nebo fertilitu jedince důležitá interakce produktů genu z heteromorfního pohlavního chromosomu s autosomálním genem, budou tyto proteiny už v generaci F_1 inkompatibilní s polovinou svých partnerů a dojde k hybridnímu rozpadu (Turelli a Orr 1995, Turelli a Orr 2000, Presgraves 2002).

Velký efekt chromosomu X na plodnost a životaschopnost hybridů se někdy vysvětluje nejen jeho hemizygotní konstitucí v heterogametickém pohlaví, ale i jeho předpokládaným větším obsahem genů způsobujících mezidruhovou inkompatibilitu. Toto tzv. Coynovo pravidlo bylo poprvé potvrzeno u octomilky (Coyne 1984). Teorii velkého vlivu chromosomu X na reprodukční úspěšnost jedince ("Large-X effect") dokazují studie zabývající se introgresí chromosomu X jednoho druhu na genetické pozadí druhu jiného. Masly a Presgraves (2007) na octomilkách ukázali, že substituce části chromosomu X způsobuje samčí sterilitu v 60 procentech případů oproti 18 procentům v případě introgrese podobně velkého autosomálního úseku. Velký vliv chromosomu X byl dokázán i u různých poddruhů myši domácí (Oka a kol. 2004, Štorchová a kol. 2004, Good a kol. 2008). Velký efekt tentokrát však chromosomu Z ("Large-Z effect") byl popsán i u organismů s heterogametickým

Nepřímým důkazem přítomnosti chromosomu W v genomu motýlů je pohlavně specifické heterochromatinové tělísko (“sex chromatin”) v interfázních jádrech samic, které je dobře patrné v polyploidních buňkách larev i dospělců. Ve většině buněk se vyskytuje pouze jedno tělísko, které se zvětšuje s rostoucím stupněm polyploidizace. Výjimku tvoří folikulární a nutritivní buňky, kde se nachází celá řada malých tělísek (Traut a Marec 1996). U některých druhů motýlů, jako například *Orgyia antiqua*, se chromosom W skládá nejen z heterochromatinu, ale i z velké části euchromatinu. S ohledem na nízký počet chromosomů tohoto druhu se evidentně jedná o chromosom neo-W, který vznikl fúzí původního chromosomu W s jedním či dvěma autosomy (Traut a Marec 1997, Yoshido a kol. 2005b). V polyploidních buňkách pak nalezneme pohlavně specifický heterochromatin rozpadlý do několika menších útvarů. Podobnou fragmentaci můžeme pozorovat i u W-chromosomálních mutantních linií zavíječe moučného, *Ephestia kuehniella*, u kterých byla na chromosom W traslokována část autosomu nebo chromosomu Z (Traut a kol. 1986, Marec a Traut 1994). Jedním z možných vysvětlení fragmentace pohlavně specifického heterochromatinu pak může být transkripční aktivita euchromatinové části.

Pro srovnávací studium genomů motýlů lze použít dvou metodických přístupů. První z nich spočívá v použití chromosomálně specifických malovacích sond připravených ze vzorků získaných buď tříděním chromosomů (“chromosome sorting”) nebo pomocí laserové mikrodisekce. Takto připravené sondy se dají v dalším kroku využít pro komparativní barvení chromosomů (“comparative chromosome painting”), tzv. Zoo-FISH. Principem Zoo-FISH je hybridizace specifické malovací sondy jednoho druhu na chromosomální preparáty druhu jiného (Scherthan a kol. 1994). Tento metodický přístup se velmi osvědčil u obratlovců (Jauch a kol. 1992, Matsuda a kol. 2005, Krylov a kol. 2010). Podobné studie jsou však u motýlů velmi vzácné. Vítková a kol. (2007) vůbec poprvé za pomoci Zoo-FISH potvrdila rychlou divergenci chromosomu W u blízce příbuzných druhů motýlů z čeledi Pyralidae. Tento experiment bohužel také poukázal na to, že chromosom W není vhodným nástrojem pro srovnávací studie.

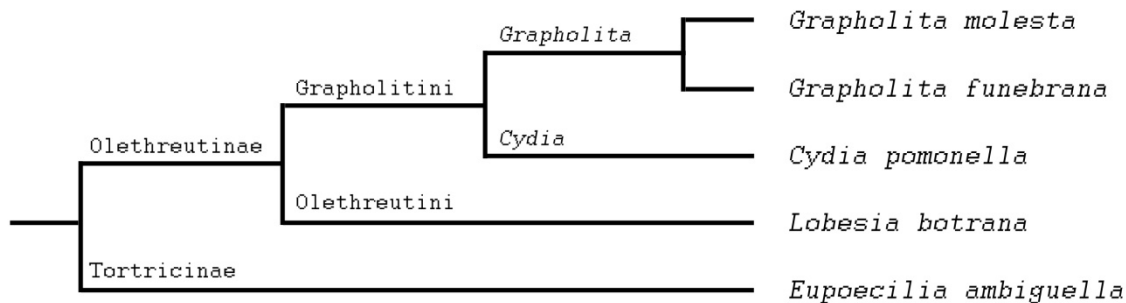
Druhým přístupem je fyzické mapování genů pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace s použitím sond odvozených z umělých bakteriálních chromosomů (“Bacterial Artificial Chromosome, BAC”), tzv. BAC-FISH. Tato metoda je vynikajícím nástrojem pro identifikaci chromosomů (Sahara a kol. 2003) stejně tak jako pro sestavování karyotypu a studium syntenie genů. Yoshido a kol. (2005a) za pomoci metody BAC-FISH spolehlivě rozpoznali všechny pachytenní bivalenty bource morušového, *B. mori*, a přiřadili je k příslušným vazebným skupinám. Porovnání fyzické mapy lišaje tabákového, *Manduca sexta*, s mapou bource morušového následně odhalilo vysokou míru syntenie genů včetně jejich zachovalého pořadí (Sahara a kol. 2007, Yasukochi a kol. 2009). Použití sond z klonů BAC v mezidruhových hybridizacích je však omezené. Yoshido a kol. (2007) využili klony specifické pro chromosom W bource morušového pro identifikaci chromosomu W u 16 dalších druhů motýlů. Sondy spolehlivě označily chromosom W pouze v jednom případě a to u *Bombyx mandarina*, divokého předka bource morušového. Stejně výsledky byly pozorovány i při použití klonů BAC

odvozených z pohlavního chromosomu Z a autosomů (F. Marec, nepublikované výsledky). Hybridizace sond z klonů BAC lišaje tabákového, *M. sexta*, na chromosomální preparáty lišaje svlačcového, *Agrius convolvuli*, však ukazuje možné využití této metody pro karyotypové analýzy blízké příbuzných druhů (Yasukochi a kol. 2009).

1.6. Fylogenetické vztahy vybraných druhů motýlů z čeledi Tortricidae

Modelovým druhem této práce je obaleč jablečný, *Cydia pomonella* (L.), z čeledi Tortricidae. Tento druh má klasické určení pohlaví typu WZ/ZZ, přičemž chromosom W tvoří v interfázních jádrech samic heterochromatinové tělísko, sex chromatin. Karyotyp obaleče jablečného obsahuje 28 párů holokinetických chromosomů, které jsou rozděleny do pěti skupin podle velikosti. Chromosom Z je u tohoto druhu vůbec největším elementem v karyotypu (shrnutí v práci Fuková a kol. 2005).

Dalšími druhy použitými v této práci jsou obaleč východní, *Grapholita molesta*, a obaleč švestkový, *Grapholita funebrana*. Oba tyto významní škůdci jsou v současnosti řazeni podle morfologických znaků do rodu *Grapholita*, sesterské skupiny rodu *Cydia* (Komai 1999). Rody *Grapholita* a *Cydia* jsou zástupci skupiny Grapholitini. Sesterskou větví této skupiny jsou Olethreutini (Horak 2006), do které patří další druh použitý v této práci, obaleč mramorovaný, *Lobesia botrana*. Nejvzdálenějším a posledním druhem této práce je obalečik jednopásný, *Eupoecilia ambiguella*, který patří do podčeledi Tortricinae, sesterské skupině větve podčeledi Olethreutinae (Mutanen a kol. 2010), do které patří všichni výše zmíněný obaleči. Pro názornost jsou fylogenetické vztahy výše zmíněných obalečů znázorněny na Obr. 1.



Obr. 1. Fylogenetické vztahy vybraných zástupců čeledi Tortricidae odvozené na základě morfologie.

2. Cíle práce

Homogametické pohlavní chromosomy X a Z se od autosomů liší v několika aspektech. Hlavními rozdíly jsou hemizygotita v heterogametickém pohlaví a odlišná efektivní velikost populace (N_e). Tyto odlišnosti mohou v konečném důsledku ovlivnit rychlost adaptivní evoluce. Recentní práce na modelových organismech prokázaly vyšší divergenci pohlavních chromosomů X ve srovnání s autosomy, tzv. efekt rychlejšího chromosomu X ("Fast-X effect"). Mank a kol. (2007) ukázali, že ke zrychlené evoluci dochází i v případě chromosomu Z u organismů s heterogametickým určením samičího pohlaví, ptáků. U motýlů dosavadní výsledky svědčí o rychlé divergenci pohlavního chromosomu W (Vítková a kol. 2007). Srovnání evoluce autosomů a chromosomu Z však dosud nebylo provedeno. Cílem této práce tedy bylo vyvinout metodické nástroje, které by umožnily studovat molekulární evoluci pohlavních chromosomů a autosomů u vybraných druhů obalečů z čeledi Tortricidae. Tato práce zahrnovala několik dílčích úkolů.

Prvním krokem byla kompletní karyotypová analýza vybraných druhů obalečů, konkrétně *G. molesta*, *G. funebrana*, *L. botrana* a *E. ambiguella*. Tyto analýzy zahrnovaly: (1) určení počtu chromosomů, (2) stanovení přítomnosti/nepřítomnosti sex chromatinu u obou pohlaví, (3) identifikaci chromosomu W a hrubý odhad jeho molekulárního složení za pomoci barvení orceinem a komparativní genomové hybridizace (CGH), (4) lokalizaci a určení počtu rDNA klastrů, (5) izolaci genů pro přesné stanovení fylogenetické příbuznosti vybraných druhů.

Dalším úkolem bylo připravit celochromosomové malovací sondy z pohlavních chromosomů Z, W a autosomů obaleče jablečného, *C. pomonella*, za pomoci laserové mikrodisekce. Tyto sondy byly následně použity pro srovnání míry divergence pohlavních chromosomů a autosomů metodou Zoo-FISH na chromosomálních preparátech výše zmíněných obalečů. Alternativně byla provedena mezidruhová hybridizace sond odvozených z umělých bakteriálních chromosomů, tzv. BAC-FISH. Vedle použití celochromosomových barvicích sond a sond odvozených z klonů BAC byla existence efektu "Fast-Z" testována určením poměru nesynonymních a synonymních substitucí (d_N/d_S ; Ellegren 2009) mezi sekvencemi chromosomu Z a autosomů obaleče jablečného a bource morušového, *B. mori*.

3. Materiál a metody

3.1. Použité druhy motýlů

Celkem bylo v této práci použito 5 druhů motýlů z čeledi Tortricidae, konkrétně *Cydia pomonella*, *Grapholita funebrana*, *Grapholita molesta*, *Lobesia botrana* a *Eupoecilia ambiguella*. Kmen *C. pomonella* označený dle svého původu Krym-61 je držen v laboratorním chovu na Entomologickém ústavu BC AVČR a detailní informace o jeho původu a podmínkách chovu jsou uvedeny v publikaci Fuková a kol. (2005). Vajíčka *G. molesta* byla získána od Beatrice Christoffel a Sylvie Dorn (Švýcarské vysoké učení technické, Zurich, Švýcarsko). Podrobnosti o původu a metodě chovu tohoto druhu jsou uvedeny v práci Notter-Hausmann a Dorn (2010). Vajíčka druhů *L. botrana* a *E. ambiguella* poskytla Annette Reineke (Geisenheimské výzkumné centrum, Německo); ta nám též poskytla protokoly na přípravu umělého média a metodu chovu v laboratorních podmínkách. Vajíčka *G. funebrana* se nám bohužel získat nepodařilo. Pokusy jsem proto prováděla na larvách ze švestek sbíraných z volné přírody z okolí Českých Budějovic, zejména z aleje podél silnice ze Zalin do Ledenic.

3.2. Příprava chromosomálních preparátů

3.2.1. “Spreading” technika

Chromosomální preparáty z křídelních disků, testes, ovárií a malpighických trubic pro mikrodisekci, *in situ* hybridizace a karyotypové analýzy jsem připravovala pomocí tzv. “spreading” techniky (Traut 1976) na histologické plotýnce a to s mírnými úpravami podle protokolu Mediouni a kol. (2004). Pitvu jsem prováděla ve fyziologickém roztoku pro *Ephesia kuehniella* (0,9% NaCl, 0,042% KCl, 0,025% CaCl₂, 0,02% NaHCO₃, případně 0,025% glukosy) (Glaser 1917, citováno v Lockwood 1961). Materiál jsem následně přenesla na 10 - 15 minut do hypotonického roztoku (0,075 M KCl). Hypotonizovanou tkáň jsem poté 15 minut fixovala v čerstvě připravené fixáži dle Carnoye (etanol - chloroform - kyselina octová v poměru 6:3:1). Vypitvaná ovária jsem bez hypotonizace přenesla přímo do fixáže. Fixovaný materiál jsem v dalším kroku přemístila do kapky 60% kyseliny octové na podložní sklo ošetřené v kyselém etanolu (1% HCl, 96% etanol) a macerovala jej pomocí wolframových jehel. Sklo jsem následně přemístila na plotýnku zahřátou na 45°C, kde jsem kapku nechala odpařit za občasného posouvání jehlou. Připravené preparáty jsem odvodnila v etanolové řadě (70% - 80% - 100% po jedné minutě) a skladovala do dalšího použití v - 80°C.

3.2.2. Roztlakové (“squash”) preparáty

Pro stanovení počtu chromosomů jsem provedla roztlakové preparáty z testes housenek pátého instaru, a to podle protokolu Fuková a kol. (2005). Testes jsem nejdříve vypitvala ve fyziologickém roztoku, následně je 10 minut hypotonizovala v 0,075 M KCl a nakonec 15 minut fixovala ve fixáži dle Carnoye. Fixovanou tkáň jsem přenesla na podložní sklo do kapky 2,5% lakto-aceto orceinu a vše nechala přes noc barvit. Druhý den jsem testes přemístila do kapky lakto-acetátu, mírně roztrhala

wolframovými jehlami a překryla krycím sklíčkem. Nakonec jsem provedla roztlak a hrany krycího skla překryla lakem na nehty.

3.2.3. Příprava preparátů z malpighických trubic

Pro stanovení přítomnosti pohlavně specifického heterochromatinu u obou pohlaví vybraných druhů motýlů jsem připravila preparáty z malpighických trubic a to opět podle protokolu uvedeného ve Fuková a kol. (2005). Malpighické trubice jsem vypitvala ve fyziologickém roztoku z dospělců a larev 3. a 5. instaru a ihned přemístila na podložní sklo do kapky připravené fixáže. Tkáň jsem nechala 2 minuty fixovat, poté fixáž slila a místo ní nakapala 1,5% lakto-aceto orcein. Materiál jsem nechala 5 minut barvit a poté jsem přes něj umístila krycí sklo. Přebytné barvivo jsem odstranila za pomoci filtračního papíru a okraje skla utěsnila lakem na nehty.

3.3. Barvení chromosomů

3.3.1. Barvení DAPI

Počty pachytenních i mitotických chromosomů jsem stanovovala též po obarvení preparátů pomocí DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), které jsem prováděla s mírnými obměnami podle protokolu Traut a kol. (1999). Preparáty z křídelních disků a testes připravené “spreading” technikou byly po vyjmutí z mrazícího boxu (- 80°C) odvodněny v etanolové řadě (70% - 80% - 100%, v každém po dobu 1 minuty). Po jejich oschnutí jsem skla ponořila na 5 minut do 1% Triton X-100 v 1x PBS pufru a následně na 15 minut do 1% Triton X-100 v 1x PBS pufru s DAPI o koncentraci 0,5 µg/ml. Obarvené preparáty jsem následně promyla 5 minut v 1% PhotoFlo (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) v 1x PBS pufru a poté 1 minutu ve sterilní miliQ vodě s 1% PhotoFlo. Na oschlá skla jsem nakápla 20 µl média zabraňujícího vyhasínání fluorescence (“antifade”) připraveného z DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane; Sigma-Aldrich), vše zakryla krycím sklíčkem a jeho okraje uzavřela lakem na nehty.

3.3.2. Barvení orceinem

K identifikaci chromosomu W podle silně barvitelného heterochromatinu jsem použila barvení 2,5% lakto-aceto orceinem dle protokolu Traut (1976). Preparáty ovárií připravené “spreading” technikou jsem odvodnila etanolovou řadou, nechala na vzduchu oschnout a do středu skla nanasla kapku 2,5% orceinu. Materiál jsem nechala 5 minut barvit a poté jsem ho překryla krycím sklem. Přebytný orcein jsem odsála filtračním papírem a okraje skla utěsnila lakem na nehty.

3.3.3. Vyhodnocení preparátů

Zhotovené preparáty jsem nakonec prohlédla v mikroskopu Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Jena, Německo). Digitální fotografie jsem snímala chlazenou CCD kamerou F-View pomocí programu Analysis Software, verze 3.2 (Soft Imaging System GmbH, Münster, SRN). U barvení DAPI a fluorescenčních *in situ* hybridizací (níže v textu) jsem fotografie snímala pro každou

fluorescenční barvu zvlášť. Snímky jsem poté obarvila a dále zpracovala pomocí programu Adobe Photoshop, verze 7.0.

3.4. Laserová mikrodisekce

3.4.1. Příprava skel na mikrodisekci

Pro laserovou mikrodisekci bylo nutné připravit skla se speciální polyetylen-naftalátovou membránou (PEN membrána o tloušťce 0,013 mm; Goodfellow, Huntington, Anglie). Nejdříve jsem do středu krycího skla (75 x 25 mm, tloušťka 0,17 mm; vyrobena na zakázku firmou MENZEL-GLASER, Braunschweig, SRN) nanasla kapku 100% etanolu a ihned překryla PEN membránou. Přebytečný etanol jsem vytlačila kouskem papíru a okraje membrány utěsnila lakem na nehty. Takto připravená skla jsem před vlastní přípravou preparátů sterilizovala nejméně 30 minut pod UV lampou.

Na vysterilizovaná skla s PEN membránou jsem "spreading" technikou zhotovila preparáty z křídelních disků (pro vyřezání chromosomu Z a autosomů) a malpighických trubic (pro vyřezání pohlavně specifického heterochromatinu chromosomu W) obaleče jablečného. Preparáty jsem následně 10 minut barvila v 5% Giemse (PENTA, Chrudim) v 0,1 M Sørensenově fosfátovém pufru (0,05 M Na₂HPO₄·12 H₂O; 0,05 M KH₂PO₄; pH = 6,8) a do vlastního vyřezávání skladovala při 4°C.

3.4.2. Vlastní mikrodisekce

Samotné vyřezávání chromosomů Z, autosomů a sex chromatinu bylo provedeno s odbornou pomocí Dr. Svatavy Kubíčkové na Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně na laserovém mikroskopu P.A.L.M. Microlaser System (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, SRN). V invertovaném mikroskopu jsem nejdříve našla příslušná jádra, z kterých byly následně chromosomy vyříznuty slabým laserovým paprskem (1, 5 – 1,7 μJ/puls, 1 μm v průměru) a katapultovány do víčka mikrozkušavky s kapkou minerálního oleje pomocí silnějšího paprsku (2 μJ/puls). Jednotlivé vzorky obsahovaly jeden i více vyřezaných chromosomů Z, v důsledku absence identifikačních markerů vždy po jednom autosomu (brány největší a nejmenší autosomy) a několik heterochromatinových tělísek.

3.5. Příprava sond

3.5.1. Příprava celochromosomových malovacích sond

Vyřezaný materiál jsem nejdříve namnožila soupravou WGA4 GenomePlex Single Cell Whole Genome Amplification Kit (Sigma-Aldrich). Po amplifikaci jsem všechny vzorky přečistila pomocí soupravy Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) a pro zvýšení výtěžku chromosomální vzorky ještě reamplifikovala použitím WGA3 GenomePlex WGA Reamplification Kit (Sigma-Aldrich). Reamplifikované vzorky jsem opět přečistila. Všechny kroky jsem provedla dle pokynů výrobce.

Amplifikované vzorky jsem v dalším kroku naznačila fluorochromem, opět pomocí soupravy WGA3. Tentokrát však s drobnými úpravami v protokolu, konkrétně se změněnou koncentrací

jednotlivých nukleotidů. Reakce obsahovala 0,4 mM dCTP, dATP, dGTP, 0,336 mM dTTP a 0,04 mM Orange-dUTP (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA).

3.5.2. Příprava a značení ostatních sond metodou “nick” translace

Genomovou DNA (gDNA) pro komparativní genomové hybridizace (CGH) jsem extrahovala ze všech studovaných druhů motýlů pomocí soupravy Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Düsseldorf, Německo) podle protokolu dodaného výrobcem. Získanou samčí gDNA jsem následně naznačila červeným fluorochromem Cy3-dUTP (GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA) a samičí gDNA zeleným fluorochromem fluorescein-12-dUTP (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) soupravou Nick Translation Kit (Abbott Molecular Inc.) dle pokynů výrobce. Značící reakce probíhala 16 hodin při 16°C.

Pro mezidruhové hybridizace jsem také použila sondy připravené z umělých bakteriálních chromosomů (“Bacterial Artificial Chromosomes”) obaleče jablečného. Přehled použitých klonů, jejich původ a specifita jsou uvedeny v Tab. 1. DNA příslušných klonů jsem získala od svých kolegů a naznačila je červeným fluorochromem Cy3-dUTP (GE Healthcare) opět metodou “nick” translace. Značící reakci jsem nechala inkubovat 8 hodin při 16°C.

Tab. 1. Seznam a základní informace o použitých klonech BAC obaleče jablečného.

Klon BAC	Marker	Specifita	Zdroj
3B13	CpW27	repetice obohacená na chr. W	Dalíková (2009)
23N12	CpW2	W-specifická sekvence	Dalíková (2009)
09J15	<i>EF-1a</i>	autosomální gen	P. Nguyen, nepublikováno
22K12	<i>Ard1</i>	autosomální gen	P. Nguyen, nepublikováno
20G10	<i>Shaker</i>	gen lokalizovaný na chr. Z	P. Nguyen, nepublikováno
12E19	<i>IDH2</i>	gen lokalizovaný na chr. Z	Sýkorová (2011)
19N22	<i>Notch</i>	gen lokalizovaný na chr. Z	Kůta (2011)

Biotinem značenou sondu, kterou jsem použila pro mapování rDNA u studovaných druhů motýlů, jsem připravila z genu pro 18S rRNA dle protokolu z práce Fuková a kol. (2005). Značící reakci jsem provedla opět metodou “nick” translace s použitím biotin-16-dUTP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo). Značila jsem po dobu 1 hodiny při 16°C.

3.6. Příprava kompetitorové DNA pro *in situ* hybridizace

Pro výrobu kompetitorové DNA ze samců i samic obaleče jablečného jsem nejdříve extrahovala gDNA klasickou fenol-chloroformovou extrakcí (Blin a Stafford 1976). Samice zbavené zadečků a samce jsem homogenizovala v tekutém dusíku a následně nechala přes noc inkubovat při 37°C v extrakčním pufru (0,3 g homogenátu/10 ml extrakčního pufru: 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 0,5% sarkosyl, 100 µg/ml proteinázy K). Druhý den jsem do roztoku přidala RNázu A (10 µg na 1 ml extrakčního pufru) a ponechala ještě další hodinu inkubovat opět při 37°C. Po hodinové inkubaci jsem provedla fenol-chloroformovou extrakci (viz Šíchová 2009). Nakonec

jsem DNA precipitovala přidáním 1/10 objemu 3 M octanu sodného a 7/10 objemu isopropanolu a rozpustila v 1x TE pufru na výslednou koncentraci 500 ng/μl. Kvalitu gDNA jsem ověřila restriktivním štěpením.

Pro komparativní genomové hybridizace (CGH) jsem jako kompetitora použila samčí DNA extrahovanou soupravou Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) a následně amplifikovanou pomocí soupravy GenomiPhi HY DNA Amplification Kit (GE Healthcare). Takto získanou DNA jsem na závěr fragmentovala sonikátorem (viz Vítková a kol. 2007).

3.7. *In situ* hybridizace

3.7.1. Fluorescenční *in situ* hybridizace s fluorochromem značenými sondami

Tato varianta fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) byla použita pro testování celochromosomových sond získaných laserovou mikrodisekcí, komparativní genomové hybridizace (CGH) a testování sond připravených z klonů BAC (BAC-FISH). Postupovala jsem s mírnými obměnami podle protokolu pro CGH uvedeného v práci Traut a kol. (1999).

Preparáty jsem před vlastní hybridizací odvodnila v etanolové řadě a poté denaturovala 3,5 minuty při 68°C v 70% deionizovaném formamidu v 2x SSC pufru. Hybridizační směs obsahovala fluorescenčně značené sondy, kompetitorovou DNA, 25 μg sonikované DNA ze spermií lososa (Sigma-Aldrich), 1/10 celkového objemu 3 M octanu sodného a 2,5x objem 100% ledového etanolu. Množství použité sondy a kompetitora záviselo na druhu hybridizace. Pro FISH s celochromosomovými sondami jsem použila cca 300 ng sondy bez ohledu na to, zda byly či nebyly použity 3 μg samičí kompetitorové DNA. Hybridizační směs pro CGH obsahovala 250 ng samčí i samičí značené sondy a 2,5 μg samčí kompetitorové DNA a pro BAC-FISH 160 ng příslušné sondy a 3 μg samčího kompetitora.

Hybridizační směs jsem stočila v chlazené centrifuze při 13000 rpm 15 minut. Vysrážená DNA byla po odstranění supernatantu promyta přidáním 70% ledového etanolu a za stejných podmínek opět zcentrifugována. Po odstranění supernatantu jsem pelet rozpustila v 5 μl 100% deionizovaného formamidu 30-ti minutovou inkubací při 37°C. Nakonec jsem ke směsi přidala 5 μl 20% dextransu sulfátu v 4x SSC pufru a sondu denaturovala 5 minut při 90°C. Sondu jsem nanesla na denaturované preparáty, překryla ji krycím sklíčkem a okraje skla utěsnila kaučukovým lepidlem Fixogum (Marabuwerke GmbH, Tamm, SRN). Vlastní hybridizace probíhala v komůrce, navlhčené 2x SSC puftrem, po dobu 3 dnů při 37°C. Poté jsem skla 5 minut promyla v 0,1x SSC s 1% Tritonem X-100 při 62 °C, nabarvila fluorescenčním barvivem DAPI a zdokumentovala jak bylo uvedeno v kapitole 3.3.3.

Některé chromosomální preparát po BAC-FISH jsem odmyla dle protokolu v práci Shibata a kol. (2009) a opakovaně je hybridizovala s dalšími sondami. Pro uchování struktury chromosomů jsem před první hybridizací preparáty dodatečně fixovala 5 minut v 4% formaldehydu (čerstvě připraven z paraformaldehydu) v 2x SSC a poté dvakrát promyla 3 minuty v 2x SSC. Po zdokumentování

výsledků FISH jsem z preparátu odstranila krycí sklíčko a preparát promyla v destilované vodě. Poté jsem preparáty denaturovala a nanasla další hybridizační směs. Všechny sondy použité při opětovné hybridizaci klonů BAC jsem značila červeným Cy3-dUTP (GE Healthcare). Barvy jednotlivých klonů byly pro přehlednost změněny v programu Adobe Photoshop.

3.7.2. Fluorescenční *in situ* hybridizace s biotinylovanou sondou pro rDNA

FISH pro stanovení chromosomální lokalizace a počtu rDNA klastrů (rDNA-FISH) jsem provedla s drobnými obměnami podle protokolu uvedeného v práci Sahara a kol. (1999). Ve stručnosti, chromosomální preparáty jsem odvodnila v etanolové řadě a po oschnutí je inkubovala 1 hodinu při 37°C pomocí RNázy A v 2x SSC pufru (100 µg/mL). Následně jsem skla 2x promyla 15 minut v 2x SSC. Pro potlačení nespecifické hybridizace jsem preparáty ještě inkubovala 30 minut při 37°C v 5x Denhartově roztoku. Po tomto předpůsobení jsem skla denaturovala 3,5 minuty při 68°C v 70% deionizovaném formamidu v 2x SSC. Po denaturaci jsem na sklo nakápla denaturovanou hybridizační směs obsahující 30 ng biotinylované 18S rDNA sondy. Sondu jsem nechala hybridizovat 1 den při 37°C ve vlhké komůrce.

Nenavázanou sondu jsem odstranila promytím 3 x 5 minut při 46°C v 50% formamidu v 2x SSC, dále 5 x 2 minuty při 46°C v 2x SSC a nakonec 3 x 5 minut při 62°C v 0,1x SSC. Preparát byl posléze inkubován 30 minut ve tmě při pokojové teplotě v 0,1% Tween 20 v 4x SSC. Následně jsem sondu detekovala streptavidinem konjugovaným s fluorochromem Cy3 (Jackson ImmunoRes. Labs., Inc., West Grove, PA, USA). K zesílení signálu jsem navázala na streptavidin biotinylovaný antistreptavidin (Vector Labs., Inc., Burlingame, CA, USA) a ten opět detekovala pomocí streptavidinu konjugovaného s Cy3 (Jackson ImmunoRes. Labs., Inc.). Pro zamezení nespecifické vazby streptavidinu a antistreptavidinu byla skla před každou inkubací blokována 30 minut v 2,5% BSA v 4x SSC. Preparáty jsem nakonec obarvila v DAPI a zdokumentovala ve fluorescenčním mikroskopu (viz kapitola 3.3.3.).

3.8. Izolace genů

Sekvence potřebné pro srovnání rychlosti adaptivní evoluce autosomů s pohlavním chromosomem Z a ověření fylogenetických vztahů studovaných obalečů čeledi Tortricidae byly získány od kolegů (Tab. 2.) nebo byly vyizolovány z cDNA obaleče jablečného, *C.pomonella*, pomocí degenerovaných primerů (Tab. 3.). Ty jsem navrhla na základě srovnání aminokyselinových sekvencí ortologních genů vybraných zástupců třídy Insecta dostupných v databázi GenBank. Pro zakořenění fylogenetického stromu jsem použila sekvenci *elongačního faktoru 1-alfa (EF-1 α)* západníka polního, *P. xylostella*, opět vyizolovanou z příslušné cDNA.

Tab. 2. Přehled převzatých sekvencí obaleče jablečného použitých v této práci.

Název genu (zkratka)	Evol. původ ^a	Reference
<i>acetylcholinesterasa 1 (Ace-1)</i>	Bm chr. 15	Sýkorová (2011)
<i>ribosomální protein S5 (RpS5)</i>	Bm chr. 15	Sýkorová (2011)
<i>ribosomální protein L7A (RpL7A)</i>	Bm chr. 15	Sýkorová (2011)
<i>ribosomální protein P0 (RpP0)</i>	Bm chr. 15	Sýkorová (2011)
<i>isocitrát dehydrogenasa 2 (IDH2)</i>	Bm chr. 15	Sýkorová (2011)
<i>thioredoxin (Trx)</i>	Bm chr. 15	P. Nguyen, nepublikováno
<i>6-fosfogluconát dehydrogenasa (6-PGD)</i>	Bm chr. Z	P. Nguyen, nepublikováno
<i>ABC transportér F2 (ABCF2)</i>	Bm chr. Z	P. Nguyen, nepublikováno
<i>GABA receptor (GABAr)</i>	Bm chr. Z	P. Nguyen, nepublikováno
<i>fenylalanine hydroxylasa (PAH)</i>	Bm chr. Z	P. Nguyen, nepublikováno
<i>růstový faktor imaginálních disků (IDGF)</i>	Bm chr. Z	P. Nguyen, nepublikováno
<i>γ podjednotka AMP aktivované protein kinasy (Snf4agamma)</i>	Bm chr. Z	P. Nguyen, nepublikováno
<i>laktát dehydrogenasa (Ldh)</i>	Bm chr. Z	P. Nguyen, nepublikováno
<i>ribosomální protein L10 (RpL10)</i>	Bm chr. Z	P. Nguyen, nepublikováno
<i>triosofosát isomerasa (Tpi)</i>	Bm chr. Z	P. Nguyen, nepublikováno
<i>acetylcholinesterasa 2 (Ace-2)</i>	Autosomální	Sýkorová (2011)

^a Bm chr. 15 – geny ležící na chromosomu 15 bource morušového, *B. mori*, se v důsledku chromosomální fúze u *C. pomonella* dostaly na chromosom Z; Bm chr. Z – geny syntenní mezi chromosomy Z *B. mori* a *C. pomonella*.

3.8.1. Izolace RNA a syntéza cDNA

Celkovou RNA jsem izolovala u všech studovaných druhů z housenek zbavených ve fyziologickém roztoku střeva a do vlastní izolace skladovaných v RNAlater (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) v -20°C. K izolaci RNA jsem použila soupravu RNA blue (Top-Bio, Praha) dle protokolu výrobce. Pro odstranění potenciální kontaminace DNA jsem vyizolovanou RNA 15 minut inkubovala při 37°C s DNázou I (USB Corporation, Cleveland, OH, USA). RNA jsem následně přečistila fenol-chloroformovou metodou (fenol pro purifikaci RNA, pH = 4,7; Sigma-Aldrich).

V dalším kroku jsem za pomoci SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) dle manuálu výrobce nasynthetizovala první vlákno cDNA. Reverzní transkriptázu jsem inaktivovala zahřátím na 70°C po dobu 15 minut a pro odstranění templátové RNA jsem vzorky 20 minut inkubovala při 37°C s 5 U RNázy H (USB Corporation). RNázu H jsem nakonec tepelně inaktivovala zahřátím na 65°C na 20 minut.

3.8.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR o celkovém objemu 20 µl obsahovala 1x ExTaq pufru, 0,2 mM dNTP směsi, 2 µl příslušné cDNA, 5 µM degenerovaných primerů a 0,25 U Takara ExTaq Hot Start polymerázy (Takara, Otsu, Japonsko). Teplotní profil reakce se skládal z počáteční denaturace při 94°C po 2 minuty, po které následovalo 30 cyklů sestávajících z denaturace 30 s při 94°C, nasedání primeru 1

minutu při příslušné teplotě (viz Tab. 3) a prodloužení podle délky produktu 1 - 1,5 minuty při 72°C. Posledním krokem byla závěrečná syntéza 5 minut při 72°C.

Tab. 3. Seznam autosomálních genů obaleče jablečného vyzolovaných v této práci.

Název genu (zkratka)	Název ^a a sekvence primeru (5'-3')	Produkt	T _a (°C)
<i>Elongační faktor 1-alfa</i> (<i>EF-1α</i>)	EF1dF01 EF1dR02_YCT	AARGARGCNCARGARATGGG GCNACNGTYTGYCTCATRTC	1172 bp 60
<i>Dopa dekarboxylasa</i> (<i>Ddc</i>)	DDC_F01(b) DDC_R01(b)	TTYGCNAARGCNATGACNGA CCCATNGTNACYTCYTC	1190 bp 60
<i>Chaperon Hsp 70</i> (<i>Hsp70</i>)	Hsp70dF01_GAY Hsp70dR01_NGC	GARATHATHGCNAAAYGAYCA CATNACNCCNCCNGCNGTYTC	1152 bp 62
<i>NADH-ubichinon</i> <i>reduktasa</i> (<i>Nuo</i>)	Nubiq_dF01 Nubiq_dR01	ATHTAYCCNGARGGNCAAYAA TCYTCRTARTARTCRTRTT	384 bp 62
<i>Cytochrom P450</i> (<i>Cyp</i>)	P450dF02_AGR P450dR01	TTYGCNNGGNGAYAGRAAYAA GCNACRTGNGGNACDATNGG	794 bp 61
<i>Ribosomální protein L4</i> (<i>RpL4</i>)	RpL4dF01_CGN RpL4dR01	TTYAARGCNCNATHCGNCC TCNGTRTTNGCCATYTTNGG	721 bp 61

^a F – forward, R– reverse; T_a – empiricky zjištěná teplota nasedání primeru.

3.8.3. Klonování a sekvenace

Příslušné PCR produkty jsem vyzolovala z 1% agarosového gelu pomocí soupravy Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) dle doporučení výrobce. Sekvence jsem následně ligovala do plazmidu Promega pGEM T Easy Vector (Promega), kterým jsem následně transformovala chemicky kompetentní buňky *E. coli* kmene DH5α. Plazmidová DNA byla osekvenována v Laboratoři genomiky Biologického centra AV ČR pomocí univerzálních primerů M13R (5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3') a M13F (5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3').

Získané sekvence jsem zbavila plazmidových úseků pomocí programu VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>). Správnost sekvence jsem ověřila v databázi GenBank NCBI pomocí nástroje blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Takto upravené sekvence jsem použila pro další analýzy.

3.9. Vlastní zpracování sekvencí

3.9.1. Fast-Z efekt

Hlavním nástrojem pro stanovení přítomnosti efektu rychlejšího chromosomu Z (“Fast-Z effect”) je poměr nesynonymních a synonymních substitucí (d_N/d_S ; Ellegren 2009). Tyto změny jsem sledovala mezi jednotlivými autosomálními a Z-vázanými geny obaleče jablečného a bource morušového.

V prvním kroku jsem pro příslušné geny obaleče jablečného (viz Tab. 2 a 3) našla ortologní sekvence bource morušového v databázi GenBank. Jednotlivé sekvence genů jsem následně upravila do správného čtecího rámce a přiložila pomocí programu ClustalW integrovaného v sekvenčním editoru MEGA4 (Tamura a kol. 2007). Pro takto upravené sekvence jsem metodou Maximum Likelihood spočítala poměr nesynonymních a synonymních mutací pomocí codeML v programu

PAML4.4 (Yang 1997). Pro výsledný poměr d_N/d_S jsem provedla test normality a nakonec data statisticky zhodnotila Mann-Whitneyovým testem při hladinou významnosti $\alpha = 0,05$ pomocí programu GraphPad Prism verze 3.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA).

3.9.2. Fylogeneze

Pro molekulární stanovení příbuznosti vybraných obalečů jsem použila autosomální gen *elongační faktor 1-alfa (EF-1 α)* (Regier a kol. 2005, Zwick 2008). Pro zakořenění dendrogramu jsem použila sekvenci záředníčka polního, *Plutella xylostella*, z čeledi Plutellidae.

V programu MEGA4 jsem nejdříve získané sekvence přiložila a zjistila jejich základní charakteristiky, tj. zda existuje variabilita v jejich nukleotidovém složení či poměr tranzicí a transverzí. Na základě této znalosti jsem se pro fylogenetickou analýzu rozhodla použít základní metodu Neighbor-Joining (NJ) s následujícími parametry: Gaps/Missing Data: Pairwise deletion; Model: Kimura 2-parameter; Bootstrap: Replication 10 000x. Pokus jsem pro ověření správnosti dat zopakovala s použitím několika různých testů.

4. Výsledky

4.1. Karyotypy vybraných obalečů z čeledi Tortricidae

Modelovým druhem této práce je obaleč jablečný, *C. pomonella*, jehož karyotyp je dobře prostudovaný (viz Fuková a kol. 2005). Cytogenetická analýza ostatních druhů studovaných v této práci však dosud nebyla provedena. Prvním úkolem práce tedy bylo určení počtu chromosomů, stanovení přítomnosti pohlavně specifického heterochromatinu, zjištění konstituce pohlavních chromosomů a charakterizace chromosomu W. Pro interpretaci výsledků bylo také nezbytné ověřit fylogenetické vztahy studovaných druhů.

4.1.1. Obaleč východní, *Grapholita molesta*

Karyotyp samice i samce obaleče východního, *G. molesta*, se skládal z 56 chromosomů, přičemž (Obr. P1a, b). Tento počet potvrdily i meiotické metafáze I s 28 bivalenty na roztlakových preparátech z testes larev 5. instaru (Obr. P1c). Ze srovnání karyotypů obou pohlaví a z dalších cytogenetických analýz (viz dále) vyplývá, že obaleč východní má chromosomální mechanismus determinace pohlaví typu WZ/ZZ (samice/samci), typický pro motýly, a že pohlavní chromosomy Z a W jsou největšími elementy karyotypu (Obr. P1a-c). Samice obaleče východního měly v interfázních jádrech pohlavně specifický heterochromatin. Ten byl v nízko polyploidních jádrech malých larev relativně velký (Obr. P2b), ale se zvyšujícím se stupněm polyploidie se nezvětšoval (Obr. P2c). U dospělých samic pak ve vysoce polyploidních jádrech docházelo k jeho fragmentaci (Obr. P2d). Samci tohoto druhu pohlavně specifický heterochromatin postrádali (Obr. P2a).

Nevýraznému sex chromatinu odpovídala i nevýrazná heterochromatinizace pohlavního chromosomu W obaleče východního. Na orceinem obarvených preparátech pachytenních oocytů nebyl chromosom W rozlišitelný (Obr. P3a). V mitotické metafázi byl relativně dobře patrný po obarvení DAPI, které barví silně oblasti bohaté na A-T páry, typické pro heterochromatin. Podobně bylo možné identifikovat bivalent pohlavních chromosomů WZ v pachytenních oocytech podle DAPI-pozitivního zbarvení vlákna chromosomu W (Obr. P3k). V bivalenech WZ byl heterochromatin chromosomu W víceméně kontinuální, jen minimálně přerušovaný, avšak nebyl zdaleka tak výrazný jako heterochromatin u obaleče jablečného (srovnej s Obr. P3g). Při použití komparativní genomové hybridizaci (CGH) byl chromosom W spolehlivě identifikován zeleně značenou samičí gDNA (Obr. P3j-m). Signál samčí i samičí sondy však nebyl tak výrazný jako v případě obaleče jablečného (srovnej s Obr. P3f-i).

Sonda pro 18S rDNA značila terminální část dvou homologních autosomů a to v místě DAPI-pozitivního bloku (Obr. P4b). Hybridizační signál byl na pachytenních chromosomech lokalizovaný také terminálně a měl charakter sféricky roztroušených značek indikujících rozvolněnou síť rDNA v jadérku (Obr. P4a).

4.1.2. Obaleč švestkový, *Grapholita funebrana*

Diploidní mitotické sady obou pohlaví obaleče švestkového, *G. funebrana*, sestávaly také z 56 chromosomů (Obr. P1d, e). Podobně jako u obaleče východního byly pohlavní chromosomy Z největšími chromosomy karyotypu (Obr. P1e). Heterochromatinové tělísko se u tohoto druhu nacházelo rovněž pouze v interfázních jádrech samic (srovnej Obr. P2e a P2f, g) a jeho velikost rostla se stupněm polyploidizace. Preparáty z malpighických trubíc dospělců a ovárií samic se mi vzhledem k nedostatku materiálu získat nepodařilo. Po obarvení mitotických chromosomů DAPI byl chromosom W díky heterochromatinovému složení snadno rozpoznatelný (Obr. P1d). U tohoto druhu však byl v porovnání s ostatními obaleči relativně malý. Detailnější analýzy chromosomu W zahrnující CGH a barvení orceinem nebylo možné vzhledem k nedostatku materiálu provést.

Samčí pachytenní jádra obaleče švestkového obsahovala jeden autosomální bivalent nesoucí organizátor jadérka. Sonda pro 18S rDNA lokalizovala rDNA klastr v intersticiální poloze ve dvou třetinách bivalentu (Obr. P4c). Signály opět ležely v DAPI-pozitivním místě.

4.1.3. Obaleč mramorovaný, *Lobesia botrana*

Preparáty mitotických a pachytenních jader stejně jako roztlkové preparáty potvrdily, že diploidní karyotyp obou pohlaví obaleče mramorovaného, *L. botrana*, sestává z 56 chromosomů (Obr. P1f-h). Pohlavní chromosomy Z a W u tohoto druhu převyšovaly svojí velikostí ostatní chromosomy (Obr. P1f). Chromosom W tvořil v interfázních jádrech samic pohlavně specifický heterochromatin. Ten byl podobně jako u obaleče východního v málo polyploidních jádrech relativně velký (Obr. P2i), ale s rostoucí velikostí jádra se nezvětšoval. Jak je patrné z Obr. P2j, larvy 5. instaru měly heterochromatinové tělísko miniaturní. Vysoce polyploidní buňky dospělých samic pak obsahovaly fragmentovaný sex chromatin (Obr. P2k).

Chromosom W obaleče mramorovaného byl snadno identifikovatelný ve fázovém kontrastu po barvení orceinem (Obr. P3b, c) i po aplikaci CGH s fluorescenčně značenými sondami (Obr. P3n-q). Orcein zvýraznil chromosom W v pachytenním bivalentu WZ po celé jeho délce, zatímco zelené i červené signály samičí a samčí gDNA byly po chromosomu nerovnoměrně rozptýleny. Obě fluorescenční sondy vykazovaly podobný vzor značení s výraznou hybridizací na větší polovině pohlavního chromosomu W (Obr. P3p, q).

Sonda pro 18S rDNA označila v pachytenním jádře jeden z menších autosomálních bivalentů. Rozptýlené hybridizační signály byly lokalizovány v terminální části tohoto bivalentu (Obr. P4d).

4.1.4. Obalečik jednopásný, *Eupoecilia ambiguella*

Samčí i samičí mitotická jádra obalečika jednopásného sestávala z $2n = 30$ chromosomů (Obr. P1i, j). Tento počet byl souběžně potvrzen na roztlkových preparátech připravených z varlat (Obr. P1l). Chromosomy Z a W byly snadno rozpoznatelné nejen svojí velikostí, ale též podle silnějšího barvení fluorochromem DAPI (Obr. P1i-k). U chromosomu Z byl v terminální části lokalizován

DAPI-pozitivní blok (Obr. 1k), zatímco jeho párovací partner, chromosom W, byl celý zvýrazněn DAPI ve srovnání s ostatními chromosomy (Obr. P1i). Sex chromatin byl přítomný v interfázních jádrech samic a jeho velikost se zvětšovala se stupněm polyploidie (Obr. P2m-o). Samci heterochromatinové tělísko postrádali (Obr. P2l).

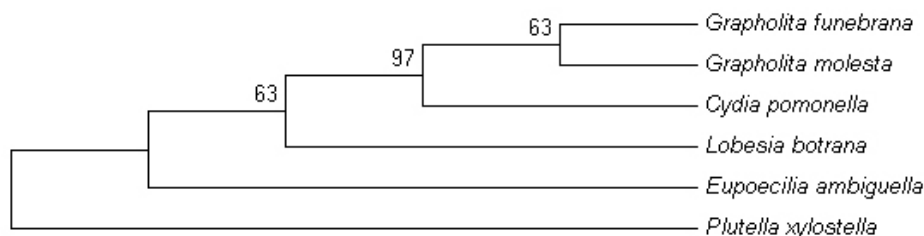
V pachytenních oocytech byl po obarvení orceinem pohlavní bivalent WZ snadno identifikovatelný podle výrazně zbarveného chromosomu W (Obr. P3d, e). Orcein zvýraznil chromosom W po celé jeho délce. Jak je patrné z Obr. P3e, zvýrazněna byla i terminální část univalentu Z. Tato část stejně jako část W chromosomu zasahovala do struktury jadérka. Chromosom W byl jednoznačně identifikován i při použití CGH (Obr. P3r-u). Podobně jako u obaleče mramorovaného obě genomové sondy výrazně označily větší polovinu chromosomu W; intenzivní hybridizační signály jsem pozorovala i na obou jeho koncích (Obr. P3t, u).

Hybridizační signály 18S rDNA sondy byly na pachytenních preparátech obalečika lokalizovány v terminální části největšího bivalentu, tedy samců na bivalentu pohlavních chromosomů ZZ (Obr. P4e) a u samic na bivalentu WZ (Obr. P4f). Hybridizace sondy na pohlavní chromosomy Z a W byla zároveň potvrzena na samčích i samičích mitotických jádrech (Obr. P4g, h). Signály ribosomální sondy odpovídaly poloze koncového DAPI-pozitivního místa.

4.1.5. **Fylogenetické vztahy vybraných obalečů podle sekvence genu *EF-1α***

Sekvence *elongačního faktoru 1-alfa (EF-1α)* měly u všech analyzovaných druhů motýlů srovnatelné zastoupení jednotlivých nukleotidů a relativně nízký poměr tranzicí a transverzí ($R = 2,543$). Proto jsem se rozhodla použít pro fylogenetickou analýzu základní test Neighbor-Joining s parametry uvedenými v kapitole 3.9.2.

Výsledný kladogram je znázorněn na Obr. 2. Jednotlivé evoluční větve kladogramu mají vysokou podporu a fylogenetické vztahy studovaných druhů souhlasí se vztahy odvozenými z morfologických znaků (Komai 1999, Horak 2006, Mutanen a kol. 2010). Analýzu jsem pro ověření správnosti dat několikrát zopakovala s použitím několika různých testů. Výsledné fylogenetické vztahy byly vždy totožné.



Obr. 2. Kladogram vybraných obalečů vytvořený metodou Neighbor-Joining (NJ), model Kimura 2-parameter, Pairwise deletion, Bootstrap 10 000x. Fylogenetický strom byl zakořeněn západníčkem polním, *P. xylostella*. Čísla u jednotlivých větví značí míru podpory daných vztahů.

4.2. Studium divergence genomu pomocí malovacích sond

4.2.1. Příprava a testování celochromosomových sond

Pomocí laserové mikrodisekce jsem získala vzorky vyřezaných heterochromatinových tělísek tvořených mnohonásodnými kopiemi chromosomu W, chromosomů Z a autosomů obaleče jablečného, *C. pomonella*. Vzorky obsahovaly 1 až 10 vyřezaných chromosomů Z, po jednom autosomu a vždy několik polyploidních heterochromatinových tělísek. Pro autosomální sondy byl vyříznut nejmenší nebo největší autosom v komplementu. Vyřezané chromosomy a pohlavně specifický heterochromatin jsem nejdříve amplifikovala pomocí soupravy WGA4; pro zvýšení výtěžku u chromosomů Z a autosomů jsem vzorky ještě reamplifikovala soupravou WGA3. Připravené sondy DNA jsem nakonec naznačila fluorochromem Cy3-dUTP opět pomocí reamplifikační soupravy WGA3.

Specifitu takto připravených sond jsem následně testovala na chromosomálních preparátech obaleče jablečného, *C. pomonella*. Na pachytenních chromosomech byl signál sond odvozených z chromosomů Z a autosomů rovnoměrně rozptýlen po všech chromosomech komplementu (neukázáno). Po hybridizaci na mitotická jádra připravená z křídelních disků však sondy označily pár chromosomů Z nebo příslušných autosomů (Obr. P5a, b, d, e). Na přípravu chromosomálně specifické sondy postačoval i jediný vyřezaný chromosom. Kompetitorová DNA neměla na účinnost sond výrazný vliv, pouze mírně snižovala intenzitu hybridizačních signálů (Obr. P5b). Sonda připravená z heterochromatinových tělísek samic označila chromosom W ve všech pozorovaných typech jader, tj. v mitotických (Obr. P5c), meiotických i interfázních jádrech (neukázáno).

4.2.2. Zoo-FISH s použitím celochromosomových sond

Sondy specifické pro pohlavní chromosomy Z, W a autosomy obaleče jablečného jsem hybridizovala na chromosomální preparáty ostatních studovaných druhů motýlů z čeledi Tortricidae, jmenovitě *G. funebrana*, *G. molesta*, *L. botrana* a *E. ambiguella*. Chromosomy Z ani příslušné autosomy nebyly v mitotických jádrech křídelních disků žádného z druhů sondami zvýrazněny. Hybridizační signály byly rovnoměrně roztroušeny po celém jádře (neukázáno). Specifita malovacích sond se nezvýšila ani použitím samičí kompetitorové gDNA.

Sonda odvozená z pohlavně specifického heterochromatinu obaleče jablečného částečně hybridizovala s chromosomem W obaleče východního, *G. molesta* (Obr. P5f) a překvapivě i fylogeneticky vzdálenějšího obaleče mramorovaného, *L. botrana* (Obr. P5g, h). Naopak sonda z *C. pomonella* nehybridizovala na chromosom W blízkého příbuzného obaleče švestkového, *C. funebrana* (Obr. P5i), u kterého byly hybridizační signály rovnoměrně roztroušeny po všech chromosomech s výjimkou chromosomu W. Sonda nebyla specifická ani pro chromosom W evolučně nejvzdálenějšího obalečika jednopásého, *E. ambiguella* (Obr. P5j).

4.2.3. Zoo-FISH s použitím sond odvozených z klonů BAC

Další možný postup jak zjistit rychlost divergence genomů byla Zoo-FISH se sondami odvozenými z umělých bakteriálních chromosomů (BAC). Příslušné klony BAC (viz Tab. 1) byly vyselektovány podle 3 genů lokalizovaných na chromosomu Z (*Shaker*, *IDH2*, *Notch*) a 2 autosomálních genů (*Ard1*, *EF-1 α*). Dva klony BAC odvozené z chromosomu W obsahovaly buď na W obohacenou repetici (klon W27-1) nebo W-specifickou sekvenci (klon 23N12). Značenou BAC DNA jsem hybridizovala na preparáty pachytenních oocytů studovaných motýlů, přičemž preparáty obaleče jablečného sloužily jako pozitivní kontrola. U obaleče švestkového se mi z důvodu nedostatku materiálu nepodařilo získat preparáty z ovárií samic. Proto jsem klony BAC odvozené z chromosomu W testovala na mitotických chromosomech křídelních disků.

Sonda připravená z klonu BAC nesoucího repetici W27-1 obohacenou na chromosomu W *C. pomonella* označila v pachytenním komplementu obaleče jablečného nerovnoměrně celý chromosom W s hustší akumulací signálu na jednom z jeho konců (Obr. P6a). Při mezidruhové hybridizaci této sondy jsem však žádný specifický signál nezaznamenala (Obr. P6b-e). Zajímavější však byla situace u klonu 23N12 obsahujícího sekvenci specifickou pro chromosom W *C. pomonella*. Tento klon poskytl na chromosomu W obaleče jablečného několik rozmístěných signálů. Dva z nich byly lokalizované poblíž konců chromosomu W a dalších 4 - 6 signálů, v závislosti na stupni kondenzace chromosomu, se nacházelo v jeho středové části (Obr. P6f). Z ostatních studovaných motýlů sonda hybridizovala pouze s chromosomem W obaleče mramorovaného, *L. botrana*. Na pohlavním bivalentu byl patrný diskrétní hybridizační signál lokalizovaný v jeho koncové části (Obr. P6i, j). U ostatních druhů nebyl chromosom W sondou detekován (Obr. P6g, h, k).

Klony BAC selektované podle genů *Shaker*, *IDH2* a *Notch* jsem nejdříve hybridizovala na pachytenní chromosomy obaleče jablečného. Klony nesoucí geny *Shaker* a *IDH2* vykazovaly silné diskrétní signály na chromosomu Z přibližně v jeho dvou třetinách (Obr. P7a, d), zatímco klon nesoucí gen *Notch* v jeho distální části (Obr. P7h). Všechny tři sondy hybridizovaly v podobných místech i na chromosom Z obaleče východního a obaleče švestkového (Obr. P7b, c, e-g, i, j). U evolučně vzdálenějšího obaleče mramorovaného a obalečika jednopásného sonda nevykazovala žádné hybridizační signály (neukázáno). Abych potvrdila, že sondy značí pohlavní bivalent a vyloučila tak možnost nespecifické hybridizace, všechny 3 klony BAC jsem postupně hybridizovala na jedno sklo. Všechny sondy vykazovaly hybridizační signály u obaleče východního (Obr. P9b, c) i u obaleče švestkového (Obr. P9d) na stejném pachytenním bivalentu. Jejich pořadí bylo shodné s pořadím u obaleče jablečného (Obr. P9a).

Klon BAC nesoucí autosomální gen *Ard1* hybridizoval u obaleče jablečného přibližně v polovině jednoho z menších bivalentů (Obr. P8a), zatímco klon nesoucí autosomální gen *EF-1 α* v terminální části jiného bivalentu (Obr. P8e). Při mezidruhové hybridizaci klonu pro gen *Ard1* jsem pozorovala výrazné hybridizační signály u obaleče východního (Obr. P8b), švestkového (Obr. P8c) a

dokonce i u vzdálenějšího obaleče mramorovaného (Obr. P8d). Sonda pro *EF-1α* hybridizovala v terminálních oblastech jednoho z bivalentů u všech studovaných obalečů (Obr. P8e-i). Klon selektovaný podle genu *EF-1α* jsem pro dokázání jeho autosomální lokalizace hybridizovala u obaleče jablečného, východního i švestkového s klony BAC odvozenými z pohlavního chromosomu Z. Sonda pro *EF-1α* u žádného z těchto druhů nehybridizovala na chromosom Z (Obr. P9a, b, e).

4.3. Stanovení “Fast-Z” efektu na základě srovnání d_N/d_S

K porovnání rychlosti divergence sekvencí z autosomů a chromosomu Z bylo vedle celochromosomových sond použito vlastní stanovení poměru nesynonymních a synonymních substitucí mezi sekvencemi obaleče jablečného, *C. pomonella*, a bource morušového, *B. mori*. Pro tyto účely jsem z cDNA obaleče jablečného vyizolovala 6 autosomálních genů (viz Tab. 3). Sekvence genů z pohlavního chromosomu byly dvojího typu: (1) geny původem z chromosomu Z a (2) geny translokované na chromosom Z z chromosomu 15. Pro všechny geny jsem získala ortologní sekvence bource morušového v databázi NCBI a výsledné příložením sekvencí upravila do správného čtecího rámce. Poměr nesynonymních a synonymních substitucí jsem spočítala pomocí codeML v programu PAML4.4. Konečné výsledky pro jednotlivé geny jsou shrnuty v Tab. 4.

Tab. 4. Hodnoty d_N/d_S pro jednotlivé autosomální pohlavně vázané geny.

Autosomální	d_N/d_S	Z (Bm chr. Z) ^a	d_N/d_S	Z (Bm chr. 15) ^b	d_N/d_S
<i>Ace-2</i>	0,0142	<i>6-PGD</i>	0,0352	<i>Trx</i>	0,0057
<i>Ddc</i>	0,0141	<i>Tpi</i>	0,0102	<i>Ace-1</i>	0,0141
<i>Hsp70</i>	0,0068	<i>ABCF2</i>	0,0036	<i>RpS5</i>	0,0013
<i>Nuo</i>	0,0384	<i>GABAr</i>	0,0092	<i>RpL7A</i>	0,0168
<i>Cyp</i>	0,0083	<i>Henna</i>	0,0047	<i>RpP0</i>	0,0421
<i>RpL4</i>	0,0447	<i>IDGF</i>	0,0346	<i>IDH2</i>	0,0085
<i>efla</i>	0,0093	<i>Snf4agamma</i>	0,0074		
		<i>Ldh</i>	0,0225		
		<i>RpL10</i>	0,0173		

^a Z (Bm chr. Z) – geny syntenní mezi chromosomy Z *B. mori* a *C. pomonella*;

^b Z (Bm chr. 15) – geny ležící na chromosomu 15 bource morušového, *B. mori*, které se na chromosom Z *C. pomonella* dostaly v důsledku chromosomální fúze.

Testem normality jsem ověřila, že se výsledné hodnoty d_N/d_S neodchylují od normálního rozložení. Statistické vyhodnocení jsem provedla Mann-Whitneyovým testem pomocí programu GraphPad Prism verze 3.0 při hladině významnosti $\alpha = 0,05$. Průměrné hodnoty d_N/d_S spolu se směrodatnou odchylkou a hodnotou *P* jsou uvedeny v Tab. 5. Hodnoty *P* byly pro všechny testované kategorie genů vyšší než zvolená hladina významnosti. Z toho vyplývá, že rychlost divergence sekvencí pro studované autosomální a pohlavně vázané geny není statisticky průkazně odlišná.

Tab. 5. Průměrné hodnoty d_N/d_S pro jednotlivé kategorie genů spolu se směrodatnými odchylkami (SD) a hodnotou P zjištěnou pomocí Mann-Whitneyova testu.

Kategorie genů	Počet genů n	d_N/d_S^c x ± SD
Autosomální	7	0,0194 ± 0,0154
Z (Bm chr. Z) ^a	9	0,0160 ± 0,0122
Z (Bm chr. 15) ^b	6	0,0147 ± 0,0145

^a Z (Bm chr. Z) – geny syntenní mezi chromosomy Z *B. mori* a *C. pomonella*;

^b Z (Bm chr. 15) – geny ležící na chromosomu 15 bource morušového, *B. mori*, které se na chromosom Z *C. pomonella* dostaly v důsledku chromosomální fúze;

^c Hodnoty d_N/d_S jednotlivých kategorií se od sebe vzájemně statisticky nelišily ($P > 0,05$).

5. Diskuze

5.1. Karyotypy zástupců čeledi Tortricidae

Cílem této práce bylo srovnat divergenci pohlavních chromosomů a autosomů u vybraných zástupců čeledi Tortricidae. Mezi studované druhy patřily čtyři zástupci podčeledi Olethreutinae, jmenovitě *C. pomonella*, *G. molesta*, *G. funebrana*, *L. botrana*, a jeden zástupce podčeledi Tortricinae, *E. ambiguella*. Jejich fylogenetické vztahy byly již dříve sestaveny na základě morfologických charakteristik (viz Obr. 1). Kladogram vytvořený v této práci molekulárně-fylogenetickým srovnáním divergence osekvenovaného úseku autosomálního genu *EF-1 α* tyto vztahy potvrdil. Jedinou nevýhodou těchto druhů bylo to, že u nich s výjimkou obaleče jablečného (Fuková a kol. 2005) doposud nebyly provedeny žádné karyotypové analýzy. V následujících kapitolách jsou proto shrnuty základní cytogenetické charakteristiky vybraných obalečů, které předcházely vlastnímu srovnání divergence genomů.

5.1.1. Mitotické komplementy vybraných obalečů

Pro motýly (Lepidoptera) je charakteristický velký počet malých uniformních chromosomů holokinetického typu, tzn. bez jasně definované centromery (Suomalainen 1969). Za modální a pravděpodobně také ancestrální karyotyp je považován haploidní počet chromosomů $n = 31$. To potvrzují i počty chromosomů u primitivních druhů motýlů (shrnuto v práci Lukhtanov 2000). U čeledi Tortricidae je modální počet chromosomů o něco málo nižší, $n = 30$. Tento počet chromosomů byl sledován u většiny z 27 karyotypovaných druhů a až na jednu výjimku je zcela typický pro podčeleď Tortricinae (shrnuto v práci Fuková a kol. 2005). Výsledky *E. ambiguella*, dalšího zástupce této podčeledi, jsou v souladu s modálním karyotypem této skupiny. U podčeledi Olethreutinae, do které patří všichni ostatní studovaní obaleči, není počet chromosomů jednotný a pohybuje se v rozmezí od $n = 22$ do $n = 28$ (Emelianov a kol. 2004, Fuková a kol. 2005). Mitotické komplementy obaleče východního, švestkového a mramorovaného sestávaly stejně jako u obaleče jablečného z $n = 28$ chromosomů.

Všichni vybraní obaleči měly stejně jako většina motýlů chromosomální určení pohlaví typu WZ/ZZ (Traut a kol. 2007). U samců a samic patřily chromosomy Z a W mezi ty vůbec největší elementy karyotypu. Nápadně velké pohlavní chromosomy jsou typické pro všechny cytogeneticky prozkoumané zástupce čeledi Tortricidae (Emelianov a kol. 2004, Fuková a kol. 2005). Tento fakt vedl k domněnce, že se na pohlavní chromosom Z translokoval kus nebo dokonce celý autosom. Fúzi jednoho z autosomů, konkrétně autosomu odpovídajícímu chromosomu 15 bource morušového, s pohlavním chromosomem Z vůbec poprvé potvrdila Sýkorová (2011) u obaleče jablečného. Osud homologního autosomu však doposud zůstává nejasný. Jednou z možností je fúze tohoto autosomu s pohlavním chromosomem W. To by také mohlo vysvětlit jeho nápadnou velikost. Chromosom W spolu se svým párovacím partnerem vyčníval svojí velikostí u všech obalečů zahrnutých v této práci.

Výjimku tvořil pouze pohlavní chromosom W obaleče švestkového, *G. funebrana*. Ten byl v porovnání s ostatními druhy relativně malý. Důvodem může být to, že homolog autosomu 15 s chromosomem W nesfúzoval a buď došlo k jeho ztrátě, nebo v genomu zůstal jako pohlavní chromosom W₂. Druhá možnost by byla snadno zjištělná z pachytenních preparátů ovárií, kde by pohlavní chromosomy tvořily trivalent. Haploidní počet chromosomů $n = 28$ obaleče švestkového nasvědčuje spíše ztrátě chromosomu, ale z důvodu nedostatku materiálu nemůžeme vyloučit ani druhou variantu. Alternativními možnostmi malé velikosti chromosomu W u *G. funebrana* by byla prostá degenerace či delece části chromosomu W způsobená například ektopickou rekombinací (Novara a kol. 2009, Hughes a kol. 2010). Malá velikost heteromorfního chromosomu je obecnou vlastností organismů s heterogametickými samci, savců, kde chromosom Y některých vačnatců dosahuje velikosti pouhých 10 Mb. V extrémním případě se dá očekávat jeho úplná ztráta spojená se vznikem nového systému určení pohlaví (Graves 2000). To už se v průběhu evoluce stalo například u rypoše rodu *Ellobius* (Graves 2000, Just a kol. 2002). Lidský Y chromosom by pak podle nejnovějších předpokladů mohl zaniknout v časovém horizontu 7 milionů let (Veyrunes a kol. 2008). U motýlů je však malý pohlavní chromosom W výjimkou, která byla popsána pouze u dvou studovaných druhů, *Bicyclus anynana* a *Artaxa subflava* (shrnuto v práci Marec a kol. 2010)

5.1.2. Distribuce a lokalizace rDNA

Nejnovější poznatky u bazálních skupin motýlů z čeledi Yponomeutidae a Gracillariidae naznačují, že haploidní ancestrální karyotyp $n = 31$ obsahoval původně jeden chromosom nesoucí NOR lokalizovaný terminálně (P. Nguyen, nepublikováno). Výsledky u obaleče východního, mramorovaného a obalečika jednopásného jsou v souladu s těmito zjištěními. V genomu obaleče švestkového se také vyskytoval jeden klast rDNA. Ten byl však situován v intersticiální poloze bivalentu, přibližně v jeho dvou třetinách. Změna lokalizace v porovnání s ostatními druhy mohla být způsobena inverzí zahrnující tento klast rDNA. Ta byla nedávno popsána u dvou parazitických vrtejšů rodu *Pomphorhynchus laevis* a *Pomphorhynchus tereticollis*, kde zjištěná rozdílná lokalizace jadérka podpořila jejich rozdělení do dvou samostatných druhů (Bombarová a kol. 2007). U obaleče jablečného se rDNA klast vyskytoval na obou koncích jediného bivalentu. Fuková a kol. (2005) předpokládali, že tento bivalent vznikl fúzí dvou NOR nesoucích chromosomů. Na základě dat o rDNA příbuzných druhů a jejich počtu chromosomů je však pravděpodobnější zmnožení jednoho původního klastu rDNA na dva ektopickou rekombinací mechanismem navrženým v práci Nguyen a kol. (2010).

U obalečika jednopásného, *E. ambiguella*, byla na mitotických jádrech potvrzena hybridizace 18S rDNA sondy na pohlavní chromosomy Z a W. To potvrdilo i zakotvení pohlavních chromosomů v jadérku na preparátech pachytenních bivalentů obarvených orceinem. Lokalizace rDNA (čili NOR) na pohlavních chromosomech je u motýlů naprosto unikátní a byla doposud popsána pouze u štětconoše *Orgyia thyellina* (Lymantriidae), kde však došlo ke značné redukci počtu chromosomů

mnohonásobnými fúzemi (Traut a Marec 1997, Yoshido a kol. 2005b). Vzhledem k haploidnímu počtu chromosomů $n = 30$ se zdá, že se na pohlavní chromosomy translokovala část autosomu nesoucího NOR. Tomu by nasvědčovala i abnormální velikost pohlavních chromosomů.

Kompaktní signály rDNA sondy byly u všech čtyř druhů obalečů vyšetřených na distribuci rDNA v této práci lokalizovány v místě DAPI-pozitivního heterochromatinového bloku. Podobná kolokalizace je u eukaryotických organismů poměrně častá a jednou z příčin by mohla být tvorba heterochromatinu rDNA samotnou (Carmo-Fonseca a kol. 2000). U obaleče jablečného však nebyl žádný ze dvou terminálních klastrů rDNA doprovázen blokem heterochromatinu (Fuková a kol. 2005)

5.1.3. “Sex chromatin”, základní charakteristika chromosomu W

Samice všech obalečů obsahovaly v interfázních polyploidních jádrech heterochromatinové tělísko, tzv. “sex chromatin”, tvořený mnohonásobnými kopiemi chromosomu W. Toto tělísko bylo v polyploidních jádrech obaleče švestkového, *G. funebrana*, a obalečika jednopásného, *E. ambiguella*, velké a jeho velikost rostla se stupněm polyploidizace. V polyploidních jádrech obaleče východního a mramorovaného se však jeho velikost s rostoucí velikostí buňky neměnila. Naopak, u samičích larev 5. instaru byl tento pohlavně specifický heterochromatin zanedbatelný a u dospělců docházelo dokonce k jeho fragmentaci. Podobný rozpad sex chromatinu byl typický i pro W chromosom štetconoše trnkového, *Orgyia antiqua* (Traut a Marec 1997, Yoshido a kol. 2005b) či pro W-chromosomální mutantní linie zavíječe moučného, *Ephestia kuehniella* (Traut a kol. 1986, Marec a Traut 1994), u kterých byla na chromosom W translokována část autosomu nebo chromosomu Z. Jedním z možných vysvětlení fragmentace sex chromatinu může být transkripční aktivita translokované euchromatinové části na chromosomu W, která u vysoce polyploidních buněk rozvolňuje heterochromatin a brání tak jeho shlukování (Marec a Traut 1994).

Přítomnosti euchromatinu na pohlavním chromosomu W nasvědčovaly i výsledky komparativní genomové hybridizace (CGH). Po obarvení chromosomů DAPI bylo patrné, že se chromosom W vybraných obalečů skládá převážně z heterochromatinu. To je typické pro naprostou většinu studovaných motýlů (Traut a Marec 1997). U obaleče východního a mramorovaného tvořil heterochromatin pachytenního bivalentu WZ kontinuální vlákno, jen minimálně přerušované méně barvitelými úseky. Avšak u obalečika jednopásného byl heterochromatin patrný pouze do poloviny chromosomu. To by samo o sobě mohlo být nepřímým důkazem fúze či translokace autosomu na chromosom W. Po hybridizaci se samičí a samčí značenou genomovou DNA byl chromosom W obalečů zvýrazněn pouze částečně, což bylo nejvíce markantní u obaleče mramorovaného a obalečika jednopásného. Vzor značení obou sond se naprosto lišil od spojitých hybridizačních signálů obaleče jablečného (Fuková a kol. 2005). Z těchto výsledků vyplývá, že chromosom W obaleče východního, mramorovaného a obalečika jednopásného obsahuje vedle heterochromatinových, tj. vysoce repetitivních nekódujících sekvencí také úseky euchromatinové, typické pro chromosomy Z a autosomy.

Tyto úseky pak mohou u *G. molesta* a *L. botrana* zapříčinit rozpad sex chromatinu u vysoce polyploidních jader.

5.2. Divergence genomů zástupců čeledi Tortricidae

Pohlavní chromosomy vznikly v průběhu evoluce několikrát nezávisle u různých skupin organismů pravděpodobně z homologního páru autosomů (Bergero a Charlesworth 2009). Zatímco u pohlavně specifických chromosomů Y a W došlo v důsledku restrikce rekombinace k degeneraci a genetické erozi (Bachtrog 2006), homogametické pohlavní chromosomy X a Z si podobnost s jejich autosomálními předky ve velké míře zachovaly. Hemizygotní stav v heterogametickém pohlaví a odlišná efektivní velikost populace chromosomů X a Z však mohou ovlivnit rychlost adaptivní evoluce sekvencí vazaných na tyto chromosomy. Předchozí výsledky práce Vítková a kol. (2007) potvrdily zrychlenou divergenci pohlavního chromosomu W motýlů, ale doposud nám chybělo srovnání s chromosomy Z a autosomy. Cílem této práce bylo zjistit rychlost divergence u pohlavních chromosomů a autosomů vybraných zástupců čeledi Tortricidae, a to pomocí dvou metodických přístupů. Prvním z nich byl vývoj celochromosomových malovacích sond obaleče jablečného a jejich aplikace na příbuzné druhy pomocí Zoo-FISH. Alternativní možností bylo využití sond odvozených z umělých bakteriálních chromosomů. Druhý přístup spočíval ve stanovení existence “Fast-Z” efektu vyjádřeným poměrem nesynonymních ku synonymních substitucí (d_N/d_S) u sekvencí genů pohlavního chromosomu Z a autosomů obaleče jablečného a bource morušového.

5.2.1. Zoo-FISH s použitím celochromosomových sond a sond odvozených z klonů BAC

Příprava malovacích sond z pohlavně specifického heterochromatinu polyploidních buněk pomocí laserové mikrodisekce a následné DOP-PCR se velice osvědčila u různých druhů motýlů (Fuková a kol. 2007, Vítková a kol. 2007). Předchozí pokusy o výrobu sond specifických pro pohlavní chromosom Z se však vinou metodických překážek nedařily (Šíchová 2009). V této práci jsem proto využila nový způsob amplifikace a značení soupravami WGA3/WGA4 s úspěchem použitého u sarančete stěhovavého, *Locusta migratoria* (Teruel a kol. 2009), a drápatky *Xenopus tropicalis* (Krylov a kol. 2010). Takto vyrobené sondy odvozené z pohlavního chromosomu Z a autosomů nebyly na preparátech pachytenních oocytů obaleče jablečného specifické, ale po hybridizaci na mitotické komplementy křídelních disků příslušnou dvojici chromosomů obarvily. Zajímavé bylo, že pro přípravu specifické sondy postačoval jediný vyřezaný chromosom, dokonce i ten nejmenší autosom. Tento fakt vylučuje kontaminaci vzorku jinými chromosomy a v budoucnu by tak mohl být velice přínosný například při konstrukci chromosomálních knihoven různých druhů.

Sondy specifické pro pohlavní chromosomy W a Z a pro autosomy obaleče jablečného jsem v dalším kroku hybridizovala na mitotická jádra příbuzných druhů obalečů metodou Zoo-FISH. Avšak hybridizační signály Z-chromosomálních a autosomálních sond byly u všech testovaných druhů rovnoměrně rozptýlené po celém genomu, bez známek specifické hybridizace. Tyto výsledky jsou

v kontrastu s publikovanými údaji u obratlovců, kde sondy při mezidruhových hybridizacích fungují i na tak vzdálené druhy, jako jsou například kuře a želva *Pelodiscus sinensis* (Matsuda a kol. 2005) nebo kuře a vačice *Monodelphis domestica* (Robinson a Ruiz-Herrera 2008). Rozdílné výsledky jsou nejspíše způsobeny charakterem repetitivních sekvencí. Ty jsou u obratlovců chromosomálně specifické (Schmidt a Heslop-Harrison 1998), zatímco u motýlů se zdá, že jsou stejně jako u rostlin (Hobza a kol. 2004) rovnoměrně roztroušené po genomu. Tomu by odpovídal i charakter hybridizačních signálů pozorovaný u všech druhů obalečů.

Mezidruhová hybridizace sond odvozených od chromosomu W obaleče jablečného přinesla zajímavější výsledky. Sonda hybridizovala na pohlavní chromosom W u obaleče východního, *G. molesta*, i evolučně vzdálenějšího obaleče mramorovaného, *L. botrana*. Na fylogeneticky nejvzdálenějšího obalečika jednopásného, *E. ambiguella*, a překvapivě na blízce příbuzného obaleče švestkového, *G. funebrana*, však nikoliv. Tyto výsledky podporují hypotézu o rychlé divergenci pohlavního chromosomu W motýlů, uvedenou v práci Vítková a kol. (2007). Nespecifita sond u blízce příbuzného druhu *G. funebrana* a pozitivní hybridizace u druhu vzdálenějšího *L. botrana* navíc svědčí o tom, že degenerace chromosomu W je čistě stochastický proces, který probíhá druh od druhu jinak. Tyto předpoklady potvrdily i výsledky mezidruhových hybridizací sond odvozených z klonů W-BAC obaleče jablečného. Sonda selektovaná podle W specifické sekvence *C. pomonella* poskytla hybridizační signály na chromosomu W pouze u evolučně vzdáleného obaleče mramorovaného, zatímco u ostatních druhů nebyl chromosom W sondou označen podobně jako v případě druhé sondy, selektované podle repetice akumulované na chromosomu W. Provedené Zoo-FISH experimenty bohužel potvrdily výsledky dřívějších studií, že se W-specifické malovací sondy ani sondy připravené z klonů W-BAC nehodí pro studium evoluce pohlavních chromosomů motýlů (Vítková a kol. 2007, Yoshido a kol. 2007, F. Marec, nepublikované výsledky).

Z této práce vyplývá, že jsou pro srovnávací karyotypové analýzy blízce příbuzných druhů motýlů mnohem vhodnější klony BAC odvozené z pohlavního chromosomu Z a autosomů. To už naznačila práce Yasukochi a kol. (2009) při mezidruhové hybridizaci sond lišaje tabákového, *Manduca sexta*, na chromosomální preparáty lišaje svlačcového, *Agrius convolvuli*. V mé práci tři sondy BAC selektované podle Z lokalizovaných genů *Shaker*, *IDH2* a *Notch* obaleče jablečného hybridizovaly na dva evolučně nejbližší druhy obaleče východního, *G. molesta*, a švestkového, *G. funebrana*, zatímco autosomální klon *Ard1* značil i jeden z bivalentů obaleče mramorovaného, *L. botrana*. Klon BAC *EF-1a* hybridizoval dokonce až na evolučně nejvzdálenějšího zástupce z čeledi Olethreutinae obalečika jednopásného, *E. ambiuella*. Tyto výsledky ukazují na zrychlenou evoluci sekvencí lokalizovaných na chromosomu Z v porovnání se sekvencemi autosomálními a vůbec poprvé tak poukazují na existenci efektu rychlejšího chromosomu Z ("Fast-Z effect") u motýlů, fenoménu nedávno popsaného u dalších živočichů se systémem určení WZ/ZZ, ptáků (Mank a kol. 2007).

Možnost mezidruhové hybridizace klonů BAC také skýtá unikátní možnost pro fyzické mapování genů blízce příbuzných druhů. Vybrané geny, podle kterých byly selektovány klony BAC,

IDH2 a *Notch*, byly u bource morušového, *B. mori*, lokalizované na chromosomu 15 a bylo prokázáno, že se u obaleče jablečného v průběhu evoluce translokovaly na pohlavní chromosom Z společně s genem pro acetylcholinesterázu (*Ace1*) zapojeným do rezistence ke xenobiotikům (Kůta 2011, Sýkorová 2011). Výsledky fyzického mapování potvrdily, že výše zmíněné geny se nacházejí i na chromosomu Z obaleče východního a švestkového. Jejich pořadí, společně s klonem BAC odvozeným od genu *Shaker*, odpovídalo pořadí genů na chromosomu Z obaleče jablečného. Tyto výsledky podporují hypotézu, že k chromosomální přestavbě, která měla za následek přesun genu *Ace1* na chromosom Z, došlo u společného předka skupiny Grapholitini (P. Nguyen, nepublikováno).

5.2.2. Stanovení poměru d_N/d_S u sekvencí *C. pomonella* a *B. mori*

Druhou z možností pro srovnání rychlosti divergence genomů motýlů bylo vedle použití malovacích sond a sond odvozených z umělých bakteriálních chromosomů určení poměru nesynonymních a synonymních substitucí (d_N/d_S) u genů pohlavního chromosomu Z a autosomů. Pro srovnání jsem zvolila obaleče jablečného *C. pomonella*, u kterého jsem kromě mnou získaných sekvencí mohla využít i sekvence genů izolovaných dříve členy naší laboratoře, a bource morušového *B. mori*, druhu s osekvenovaným a částečně anotovaným genomem. Pro vlastní stanovení jsem použila sekvence 7 autosomálních genů, 9 genů z původní části chromosomu Z a 6 genů translokovaných během evoluce z autonomu odpovídajícímu chromosomu 15 bource. Poměr d_N/d_S byl stanoven pro každou sekvenci zvlášť a průměrné hodnoty jednotlivých kategorií genů byly porovnány statistickým testem. Ani v jedné kategorii genů se výsledná průměrná hodnota nijak významně neodlišovala; u použitých souborů genů je tedy adaptivní evoluce sekvencí chromosomu Z vůči autosomům neprůkazná. Jinými slovy řečeno, data naznačují, že se geny vázané na pohlavní chromosom Z nevyvíjejí rychleji než sekvence autosomální a poukazují tak na nepřítomnost “Fast-Z” efektu u motýlů. Z průměrných hodnot d_N/d_S se dokonce zdá, že rychlost funkční evoluce by mohla být vyšší pro autosomální geny. Toto zjištění je v souladu s některými výsledky získanými u octomilky (Betancourt a kol. 2002, Thornton a kol. 2006), avšak je v příkrém rozporu s výsledky získanými u ptáků se stejným systémem určení pohlaví typu WZ/ZZ (Mank a kol. 2007).

Důvodů pro odlišné výsledky však může být hned několik. Prvním a nejdůležitějším z nich je malý vzorek použitých ortologních genů. Rychlost evoluce pohlavního chromosomu X/Z a autosomů se nejčastěji sleduje u organismů s osekvenovaným genomem, a tudíž není problém do analýz zahrnout stovky až tisíce genů, které stačí pouze stáhnout z příslušné databáze (Betancourt a kol. 2002, Thornton a kol. 2006, Mank a kol. 2007, Mank a kol. 2010). U octomilky však různé studie vychází rozporuplně, a to nezávisle na počtu genů (shrnutí v práci Presgraves 2008). Geny chromosomu Z použité v tomto experimentu byly v předchozích pokusech využity pro sestavení fyzické mapy obaleče jablečného (P. Nguyen a kol., nepublikováno) a byly vybrány na základě jejich vysoké konzervovanosti. Nenáhodný testovaný soubor tedy mohl být dalším z důvodů jejich pomalejší

funkční evoluce. Jednou z příčin by také mohl být neutrální charakter zjištěných substitucí (Betancourt a kol. 2002).

Mank a kol. (2010) předpokládali, že zrychlená divergence pohlavního chromosomu Z u ptáků není důsledkem selekce ale spíše genetického driftu. Ten je mnohem účinnější v malých populacích. Motýli však mají stejně jako octomilka velkou efektivní velikost populace (N_e). S rostoucí N_e chromosomu X/Z pak dochází ke snížení vlivu efektu rychlejšího chromosomu X/Z (Mank a kol. 2009). To je v souladu s výsledky této práce u zástupců čeledi Tortricidae i u různých druhů octomilek, které podporují hypotézu, že za zrychlenou funkční evolucí pohlavních chromosomů stojí právě genetický drift.

Pro prokázání existence “Fast-Z” efektu u motýlů však budou muset být provedeny detailnější studie zahrnující více ortologních genů. Pokud i tehdy vyjdou rychlosti funkční evoluce pro Z vázané a autosomální geny srovnatelné, bude to důkazem toho, že u motýlů nedochází k rychlejší adaptivní evoluci pohlavně vázaných genů a že velký vliv chromosomu Z na plodnost a životaschopnost hybridů (Naisbit a kol. 2002) nemůže být sám o sobě vysvětlen efektem rychlejšího chromosomu Z.

5.2.3. Srovnání přístupů pro studium rychlosti divergence genomu motýlů

V této práci bylo použito několik metodických přístupů pro zjištění, zda se v evoluci genomů motýlů uplatňuje efekt rychlejšího chromosomu Z podobně jako u ptáků (Mank et al. 2007). Zatímco klasické určení poměru synonymních a nesynonymních substitucí (d_N/d_S) neprokázalo zrychlenou funkční evoluci pohlavně vázaných sekvencí ve srovnání s autosomálními sekvencemi, výsledky mezidruhové hybridizace sond odvozených z klonů BAC existenci rychlejší divergence chromosomu Z potvrdily. Použití celochromosomových sond se při komparativních hybridizacích neosvědčilo. Co je však příčinou rozdílných výsledků a jaký metodický přístup má větší vypovídající hodnotu?

Přístup založený na *in situ* hybridizaci závisí na teplotě tání duplexu sondy a cílové sekvence. Ta se dá spočítat podle vzorce $T_m = 16,6 \log M + 0,41(GC) + 81,5$, kde M je koncentrace sodných iontů v roztoku a GC procentuální obsah příslušných nukleotidů v sekvenci. S každým procentem nespárovaných bazí navíc teplota tání klesá přibližně o 1°C (DIG Application Manual for Nonradioactive *In Situ* Hybridization; Roche Applied Science). Z výše uvedeného vztahu vyplývá, že při stringentním praní v 0,1x SSC pufru při 62°C a předpokládaném 50% zastoupení GC musí mít sonda s cílovou sekvencí identitu alespoň 88%, aby nebyla odmyta. Srovnáním kódujících sekvencí genů *EF-1a*, *Shaker* a *Notch* obaleče jablečného s příslušnými sekvencemi obaleče východního, mramorovaného a obalečika jednopásného jsem zjistila, že se identita daných sekvencí pohybuje v rozmezí 85 až 95%. Za předpokladu, že repetitivní sekvence divergují rychleji než kódující, byly repetitivní komponenty sondy při odmývání nespecificky navázané sondy patrně odmyty. Výsledky mezidruhových hybridizací tedy pravděpodobně odpovídají stupni divergence kódujících sekvencí.

Sekvenační studie umělých bakteriálních chromosomů u motýlů *B. mori*, *Helicoverpa armigera* a *Spodoptera frugiperda* ukazují, že na úseky velikosti 3 Mb, 1,963 Mb a 2,042 Mb připadá

502, 201 a 274 genů (d'Alençon a kol. 2010). Vezmeme-li v úvahu odpovídající hustoty genů a průměrnou velikost klonů v BAC knihovně obaleče jablečného, jež je 140 kb, může jeden klon BAC obaleče obsahovat 14 až 23 kódujících sekvencí. Pro mezidruhové hybridizace jsem použila 3 klony BAC odvozené z pohlavního chromosomu Z a 2 selektované podle autosomálních genů. To znamená, že mnou použitý hybridizační přístup mohl testovat 42 až 69 kódujících sekvencí chromosomu Z a 28 až 46 sekvencí autosomálních. Tento počet významně převyšuje množství genů použitých pro určení poměru d_N/d_S a Zoo-FISH se sondami odvozenými z klonů BAC je tak robustnější metodou pro stanovení přítomnosti "Fast-Z" efektu u motýlů. Na základě výše zmíněné argumentace se tedy domnívám, že u motýlů skutečně existuje rychlejší adaptivní evoluce sekvencí vázaných na pohlavní chromosom Z, a že neprůkazné výsledky při stanovení poměru synonymních a nesynonymních substitucí byly způsobeny malým testovaným vzorkem ortologních genů.

6. Souhrn

Tato práce se zabývala studiem molekulární divergence pohlavních chromosomů a autosomů vybraných druhů obalečů z čeledi Tortricidae s použitím dvou metodických přístupů. Prvním z nich byla mezidruhová komparativní hybridizace (Zoo-FISH) celochromosomových sond a sond odvozených z umělých bakteriálních chromosomů *C. pomonella*, zatímco druhý přístup spočíval ve stanovení poměru nesynonymních a synonymních substitucí (d_N/d_S) u sekvencí genů obaleče jablečného a bource morušového. Výsledky také poskytly vůbec první náhled do karyotypu čtyř druhů obalečovitých, obaleče východního (*Grapholita molesta*), obaleče švestkového (*G. funebrana*), obaleče mramorového (*Lobesia botrana*) a obalečika jednopásného (*Eupoecilia ambiguella*).

Sondy specifické pro pohlavní chromosomy Z a W a pro autosomy byly připraveny pomocí laserové mikrodisekce a následné amplifikace a značení soupravami WGA3/WGA4. Zajímavé bylo, že pro výrobu sond postačoval jediný vyřezaný chromosom, dokonce i ten nejmenší autosom. Sondy byly nejdříve testovány na preparátech křídelních disků obaleče jablečného a poté byly hybridizovány na mitotické komplementy vybraných obalečů. Zatímco sondy vytvořené z chromosomu Z a autosomů v mezidruhových hybridizacích nefungovaly, sonda odvozená z chromosomu W částečně hybridizovala s odpovídajícím chromosomem blízké příbuzného obaleče východního a vzdálenějšího obaleče mramorovaného, avšak nikoliv blízké příbuzného obaleče švestkového a vzdáleného obalečika jednopásného. Výsledky svědčí o rychlé divergenci chromosomu W a o náhodnosti jeho degenerace. To bylo potvrzeno i při komparativní hybridizaci klonů BAC odvozených od unikátní sekvence chromosomu W, kdy sonda označila příslušný chromosom pouze u obaleče mramorovaného.

Mezidruhová hybridizace klonů BAC selektovaných podle sekvencí z chromosomu Z a autosomálních sekvencí přinesla vůbec první nepřímé důkazy o existenci efektu rychlejšího Z ("Fast-Z effect") u motýlů a ukázala se jako vynikající nástroj pro fyzické mapování genů blízké příbuzných druhů. Sondy pohlavního chromosomu Z, selektované podle genů *Shaker*, *IDH2* a *Notch*, hybridizovaly na příslušné bivalenty u obaleče východního a švestkového, zatímco autosomální klon *Ard1* i u obaleče mramorovaného. Klon BAC obsahující gen *EF-1 α* hybridizoval dokonce i u nejvzdálenějšího obalečika jednopásného. Hybridizace klonů BAC obsahujících geny *IDH2* a *Notch* na pohlavní chromosom Z obaleče východního a švestkového navíc potvrdila domněnku o translokaci chromosomu 15 na pohlavní chromosom Z, již dříve popsanou u obaleče jablečného.

Stanovení poměru nesynonymních a synonymních substitucí u sekvencí lokalizovaných na chromosomu Z a u autosomálních sekvencí obaleče jablečného a bource morušového však důkazy o zrychlené evoluci Z-vázaných genů nepřinesly. Výsledné poměry byly pro všechny kategorie genů podobné a statisticky se neodlišovaly.

Výsledky mé práce významně přispívají k detailnímu poznání molekulární divergence pohlavních chromosomů a autosomů motýlů a přinášejí nové zásadní informace o karyotypu vybraných zástupců čeledi Tortricidae. Získané údaje jsou též základem pro další samostatné studie.

7. Literatura

- Albert AYK, Otto SP (2005) Sexual selection can resolve sex-linked sexual antagonism. *Science* **310**: 119-121.
- Arunkumar KP, Mita K, Nagaraju J (2009) The silkworm Z chromosome is enriched in testis-specific genes. *Genetics* **182**: 493-501.
- Bachtrog D (2004) Evidence that positive selection drives Y-chromosome degeneration in *Drosophila miranda*. *Nat. Genet.* **36**: 518-522.
- Bachtrog D (2006) A dynamic view of sex chromosome evolution. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**: 578-585.
- Bachtrog D, Gordo I (2004) Adaptive evolution of asexual populations under Muller's ratchet. *Evolution* **58**: 1403-1413.
- Baines JF, Harr B (2007) Reduced X-linked diversity in derived populations of house mice. *Genetics* **175**: 1911-1921.
- Baker B, Gorman M, Marin I (1994) Dosage compensation in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* **28**: 491-521.
- Bean CJ, Schaner CE, Kelly WG (2004) Meiotic pairing and imprinted X chromatin assembly in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Genet.* **36**: 100-105.
- Bellott DW, Skaletsky H, Pyntikova T, Mardis ER, Graves T a kol. (2010) Convergent evolution of chicken Z and human X chromosomes by expansion and gene acquisition. *Nature* **466**: 612-616.
- Bergero R, Charlesworth D (2009) The evolution of restricted recombination in sex chromosomes. *Trends Ecol. Evol.* **24**: 94-102.
- Betancourt AJ, Presgraves DC, Swanson WJ (2002) A test for faster X evolution in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 1816-1819.
- Betrán E, Emerson JJ, Kaessmann H, Long M (2004) Sex chromosomes and male function: where do new genes go? *Cell Cycle* **3**: 873-875.
- Betrán E, Thornton K, Long M (2002) Retroposed new genes out of the X in *Drosophila*. *Genome Res.* **12**: 1854-1859.
- Blin N, Stafford DW (1976) A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **3**: 2303-2308.
- Bombarová M, Marec F, Nguyen P, 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.
- Borge T, Webster MT, Andersson G, Saetre GP (2005) Contrasting patterns of polymorphism and divergence on the Z chromosome and autosomes in two *Ficedula* flycatcher species. *Genetics* **171**: 1861-1873.
- Cabrero J, Teruel M, Carmona FD, Jimenez R, Camacho JP (2007) Histone H3 lysine 9 acetylation pattern suggests that X and B chromosomes are silenced during entire male meiosis in a grasshopper. *Cytogenet. Genome Res.* **119**: 135-142.
- Carmo-Fonseca M, Mendes-Soares L, Campos I (2000) To be or not to be in the nucleolus. *Nat. Cell Biol.* **2**: E107-E112.
- Charlesworth B (1994) The effect of background selection against deleterious mutations on weakly selected, linked variants. *Genet. Res.* **63**: 213-227.

- Charlesworth B (1996) The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Curr. Biol.* **6**: 149-162.
- Charlesworth B, Charlesworth D (1997) Rapid fixation of deleterious alleles can be caused by Muller's ratchet. *Genet. Res.* **70**: 63-73.
- Charlesworth B, Charlesworth D (2000) The degeneration of Y chromosomes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci* **355**: 1563-1572.
- Charlesworth B, Coyne JA, Barton NH (1987) The relative rates of evolution of sex-chromosomes and autosomes. *Am. Nat.* **130**: 113-146.
- Cooper DW, Johnston PG, Watson JM, Graves JAM (1993) X-inactivation in marsupials and monotremes. *Dev. Biol.* **4**: 117-128.
- Counterman BA, Ortiz-Barrientos D, Noor MA (2004) Using comparative genomic data to test for fast-X evolution. *Evolution* **58**: 656-660.
- Coyne JA (1984) Genetic basis of male sterility in hybrids between two closely related species of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 4444-4447.
- Coyne JA (1992) Genetics and speciation. *Nature* **355**: 511-515.
- Coyne JA, Orr HA (1998) The evolutionary genetics of speciation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **353**: 287-305.
- d'Alençon, Sezutsu H, Legeai F, Permal E, Bernard-Samain S a kol. (2010) Extensive synteny conservation of holocentric chromosomes in Lepidoptera despite high rates of local genome rearrangements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 7680-7685.
- Dalíková (2009) Využití BAC klonů při studiu pohlavního chromosomu W obaleče jablečného *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). Magisterská práce, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Česká republika.
- Ellegren H (2009) Genomic evidence for large-Z effect. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **276**: 361-366.
- Ellegren H (2011) Sex-chromosome evolution: recent progress and the influence of male and female heterogamety. *Nat. Rev. Genet.* Epub 8 February 2011. DOI:10.1038/nrg2948.
- Ellegren H, Parch J (2007) The evolution of sex-biased genes and sex-biased gene expression. *Nat. Rev. Genet.* **8**: 689-698.
- Emelianov I, Marec F, Mallet J (2004) Genomic evidence for divergence with gene flow in host races of the larch budmoth. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **271**: 97-105.
- Emerson JJ, Kaessmann H, Betran E, Long M (2004) Extensive gene traffic on the mammalian X chromosome. *Science* **303**: 537-540.
- Fuková I, Nguyen P, Marec F (2005) Codling moth cytogenetics: karyotype, chromosomal location of rDNA, and molecular differentiation of sex chromosomes. *Genome* **48**: 1083-1092.
- Fuková I, Traut W, Vítková M, Nguyen P, Kubičková S a kol. (2007) Probing the W chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin. *Chromosoma* **116**: 135-145.
- Good JM, Dean MD a Nachman MW (2008) A complex genetic basis to X-linked hybrid male sterility between two species of house mice. *Genetics* **179**: 2213-2228.
- Graves JAM (2000) Human Y chromosome, sex determination, and spermatogenesis - A feminist view. *Biol. Reprod.* **63**: 667-676.
- Haldane JBS (1922) Sex ratio and unisexual sterility in animal hybrids. *J. Genet.* **12**: 101-109.
- Hense W, Baines JF, Parsch J (2007) X chromosome inactivation during *Drosophila* spermatogenesis. *PLoS Biol.* **5**: 2288-2295.

- Hobza R, Lengerová M, Černohorská H, Rubeš J, Vyskot B (2004) FAST-FISH with laser beam microdissected DOP-PCR probe distinguishes the sex chromosomes of *Silene latifolia*. *Chromosome Res.* **12**: 245-250.
- Horak M (2006) Olethreutinae moths of Australia (Lepidoptera: Tortricidae). *Monographs on Australian Lepidoptera*, Vol. 10, 522 pp.
- Hornecker JL, Samollow PB, Robinson ES, Vandeberg JL, McCarrey JR (2007) Meiotic sex chromosome inactivation in the marsupial *Monodelphis domestica*. *Genesis* **45**: 696-708.
- Hughes JF, Skaletsky H, Pyntikova T, Graves TA, van Daalen SKM (2010) Chimpanzee and human Y chromosomes are remarkably divergent in structure and gene content. *Nature* **463**: 536-539.
- Itoh, Y., Melamed, E., Yang, X., Kampf, K., Wang, S. a kol. (2007) Dosage compensation is less effective in birds than in mammals. *J. Biol.* **6**: 2.
- Iyengar VK, Reeve HK, Eisner T (2002) Paternal inheritance of a female moth's mating preference. *Nature* **419**: 830-832.
- Jauch A, Wienberg J, Stanyon R, Arnold N, Tofanelli S a kol. (1992) Reconstruction of genomic rearrangement in great apes and gibbons by chromosome painting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 8611-8615.
- Johnson MS, Turner JRG (1979) Absence of dosage compensation for a sex-linked enzyme in butterflies (*Heliconius*). *Heredity* **43**: 71-77.
- Just W, Baumstark A, Hameister H, Schreiner B, Reisert I, Hakhverdyan M, Vogel W (2002) The sex determination in *Ellobius lutescens* remains bizarre. *Cytogenet. Genome Res.* **96**: 146-153.
- Kaiser VB, Ellegren H (2006) Nonrandom distribution of genes with sex-biased expression in the chicken genome. *Evolution* **60**: 1945-1951.
- Khil PP, Smirnova NA, Romanienko PJ, Camerini-Otero RD (2004) The mouse X chromosome is enriched for sex-biased genes not subject to selection by meiotic sex chromosome inactivation. *Nat. Genet.* **36**: 642-646.
- Koerich LB, Wang X, Clark AG, Carvalho AB (2008) Low conservation of gene content in the *Drosophila* Y chromosome. *Nature* **456**: 949-951.
- Komai F (1999) A Taxonomic review of the genus *Grapholita* and allied genera (Lepidoptera: Tortricidae) in the Palearctic region. *Entomologica Scandinavica* Suppl. 55: 1-226.
- Krylov V, Kubíčková S, Rubeš J, Mácha J, Tlapáková T a kol. (2010) Preparation of *Xenopus tropicalis* whole chromosome painting probes using laser microdissection and reconstruction of *X. laevis* tetraploid karyotype by Zoo-FISH. *Chromosome Res.* **18**: 431-439.
- Kůta V (2011) Izolace, charakterizace a lokalizace ortologní sekvence genu *Notch* (*Drosophila*) u obaleče jablečného, *Cydia pomonella*. Magisterská práce, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Česká republika.
- Laurie (1997) The weaker sex is heterogametic: 75 years of Haldane's rule. *Genetics* **147**: 937-951.
- Lockwood APM (1961) "Ringer" solutions and some notes on the physiological basis of their ionic composition. *Comp. Biochem. Physiol.* **2**: 241-289.
- Lu J, Wu CI (2005) Weak selection revealed by the whole-genome comparison of the X chromosome and autosomes of human and chimpanzee. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**: 4063-4067.
- Lukhtanov VA (2000) Sex chromatin and sex chromosome systems in nonditrysian Lepidoptera (Insecta). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **38**: 73-79.
- Lyon MF (1961) Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* **190**: 372-373.

- Mank JE (2009) The W, X, Y, and Z of sex-chromosome dosage compensation. *Trends Genet.* **25**: 226-233.
- Mank JE, Axelsson E, Ellegren H (2007) Fast-X on the Z: Rapid evolution of sex-linked genes in birds. *Genome Res.* **17**: 618-624.
- Mank JE, Ellegren H (2009) All dosage compensation is local: Gene-by-gene regulation of sex-biased expression on the chicken Z chromosome. *Heredity* **102**: 312-320.
- Mank JE, Nam K, Ellegren H (2010) Faster-Z evolution is predominantly due to genetic drift. *Mol. Biol. Evol.* **27**: 661-670.
- Marec F, Sahara K, Traut W (2010) Rise and fall of the W chromosome in Lepidoptera. In: Goldsmith MR, Marec F (eds) *Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 49-63.
- Marec F, Traut W (1994) Sex chromosome pairing and sex chromatin bodies in W-Z translocation strains of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). *Genome* **37**: 426-435.
- Marques AC, Dupanloup I, Vinckenbosch N, Reymond A, Kaessmann H (2005) Emergence of young human genes after a burst of retroposition in primates. *PLoS Biol.* **3**: 1970-1979.
- Masly JP, Presgraves DC (2007) High-resolution genome-wide dissection of the two rules of speciation in *Drosophila*. *PLoS Biol.* **5**: 1890-1898.
- Matsuda Y, Nishida-Umehara C, Tarui H, Kuroiwa A, Yamada K a kol. (2005) Highly conserved linkage homology between birds and turtles: Bird and turtle chromosomes are precise counterparts of each other. *Chromosome Res.* **13**: 601-615.
- Mediouni J, Fuková I, Frydrychová R, Dhoubi MH, Marec F (2004) Karyotype, sex chromatin and sex chromosome differentiation in the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae). *Caryologia* **57**: 184-194.
- Mořkovský L, Štorchová R, Plachý J, Ivánek R, Divina P a kol. (2010) The chicken Z chromosome is enriched for genes with preferential expression in ovarian somatic cells. *J. Mol. Evol.* **70**: 129-136.
- Mutanen M, Wahlberg N, Kaila L (2010) Comprehensive gene and taxon coverage elucidates radiation patterns in moths and butterflies. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **277**: 2839-2848.
- Naisbit RE, Jiggins CD, Linares M, Salazar C, Mallet J (2002) Hybrid sterility, Haldane's rule and speciation in *Heliconius cydno* and *H. melpomene*. *Genetics* **161**: 1517-1526.
- Namekawa SH, Lee JT (2009) XY and ZW: Is meiotic sex chromosome inactivation the rule in evolution? *PLoS Genet.* **5**: e1000493.
- Namekawa SH, Park PJ, Zhang LF, Shima JE, McCarrey JR a kol. (2006) Postmeiotic sex chromatin in the male germline of mice. *Curr. Biol.* **16**: 660-667.
- Nguyen P, Sahara K, Yoshido A, Marec F (2010) Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica* **138**: 343-354.
- Notter-Hausmann C, Dorn S (2010) Relationship between behavior and physiology in an invasive pest species: oviposition site selection and temperature-dependent development of the Oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Environ. Entomol.* **39**: 561-569.
- Novara F, Beri S, Bernardo ME, Bellazzi R, Malovini A a kol. (2009) Different molecular mechanisms causing 9p21 deletions in acute lymphoblastic leukemia of childhood. *Hum. Genet.* **126**: 511-520.
- Oka A, Mita A, Sakurai-Yamatani N, Yamamoto H, Takagi N a kol. (2004) Hybrid breakdown caused by substitutions of the X chromosome between two mouse subspecies. *Genetics* **166**: 913-924.

- Ostertag EM a Kazazian HH (2001): Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu. Rev. Genet.* **35**: 501-38.
- Parisi M, Nuttall R, Naiman D, Bouffard G, Malley J a kol. (2003) Paucity of genes on the *Drosophila* X chromosome showing male-biased expression. *Science* **299**: 697-700.
- Potrzebowski L, Vinckenbosch N, Kaessmann H (2010) The emergence of new genes on the young therian X. *Trends Genet.* **26**: 1-4.
- Presgraves DC (2002) Patterns of postzygotic isolation in Lepidoptera. *Evolution* **56**: 1168-1183.
- Presgraves DC (2008) Sex chromosomes and speciation in *Drosophila*. *Trends Genet.* **24**: 336-343.
- Price TD, Bouvier MM (2002) The evolution of F₁ postzygotic incompatibilities in birds. *Evolution* **56**: 2083-2089.
- Qvarnström A, Bailey RI (2009) Speciation through evolution of sex-linked genes. *Heredity* **102**: 4-15.
- Ranz JM, Castillo-Davis CI, Meiklejohn CD, Hartl DL (2003) Sex-dependent gene expression and evolution of the *Drosophila* transcriptome. *Science* **300**: 1742-1745.
- Regier JC, Paukstadt U, Paukstadt LH, Mitter C, Peigler RS (2005) Phylogenetics of eggshell morphogenesis in Antheraea (Lepidoptera: Saturniidae): unique origin and repeated reduction of the aeropyle crown. *Syst. Biol.* **54**: 254-267.
- Reinhold K (1998) Sex linkage among genes controlling sexually selected traits. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **44**: 1-7.
- Reinke V, Gil IS, Ward S, Kazmer K (2004) Genome-wide germline-enriched and sex-biased expression profiles in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **131**: 311-323.
- Rice WR (1984) Sex chromosomes and the evolution of sexual dimorphism. *Evolution* **38**: 735-742.
- Rice WR (1987) Genetic hitchhiking and the evolution of reduced genetic activity of the Y sex chromosome. *Genetics* **116**: 161-167.
- Robinson TJ, Ruiz-Herrera A (2008) Defining the ancestral eutherian karyotype: A cladistic interpretation of chromosome painting and genome sequence assembly data. *Chromosome Res.* **16**: 1133-1141.
- Rozen S, Skaletsky H, Marszalek JD, Minx PJ, Cordum HS a kol. (2003) Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and apes Y chromosomes. *Nature* **423**: 873-876.
- Saetre GP, Borge T, Lindroos K, Haavie J, Sheldon BC a kol. (2003) Sex chromosome evolution and speciation in *Ficedula* flycatchers. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **270**: 53-59.
- Saether SA, Saetre GP, Borge T, Wiley C, Svedin N a kol. (2007) Sex chromosome-linked species recognition and evolution of reproductive isolation in flycatchers. *Science* **318**: 95-97.
- Sahara K, Marec F, Traut W (1999) TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Res.* **7**: 449-460.
- Sahara K, Yoshido A, Kawamura N, Ohnuma A, Abe H a kol. (2003) W-derived BAC probes as a new tool for identification of the W chromosome and its aberrations in *Bombyx mori*. *Chromosoma* **112**: 48-55.
- Sahara K, Yoshido A, Marec F, Fuková I, Zhang HB a kol. (2007) Conserved synteny of genes between chromosome 15 of *Bombyx mori* and a chromosome of *Manduca sexta* shown by five-color BAC-FISH. *Genome* **50**: 1061-1065.
- Scherthan H, Cremer T, Arnason U, Weier HU, Lima-de-Faria a kol. (1994) Comparative chromosome painting discloses homologous segments in distantly related mammals. *Nat. Genet.* **6**: 342-347.

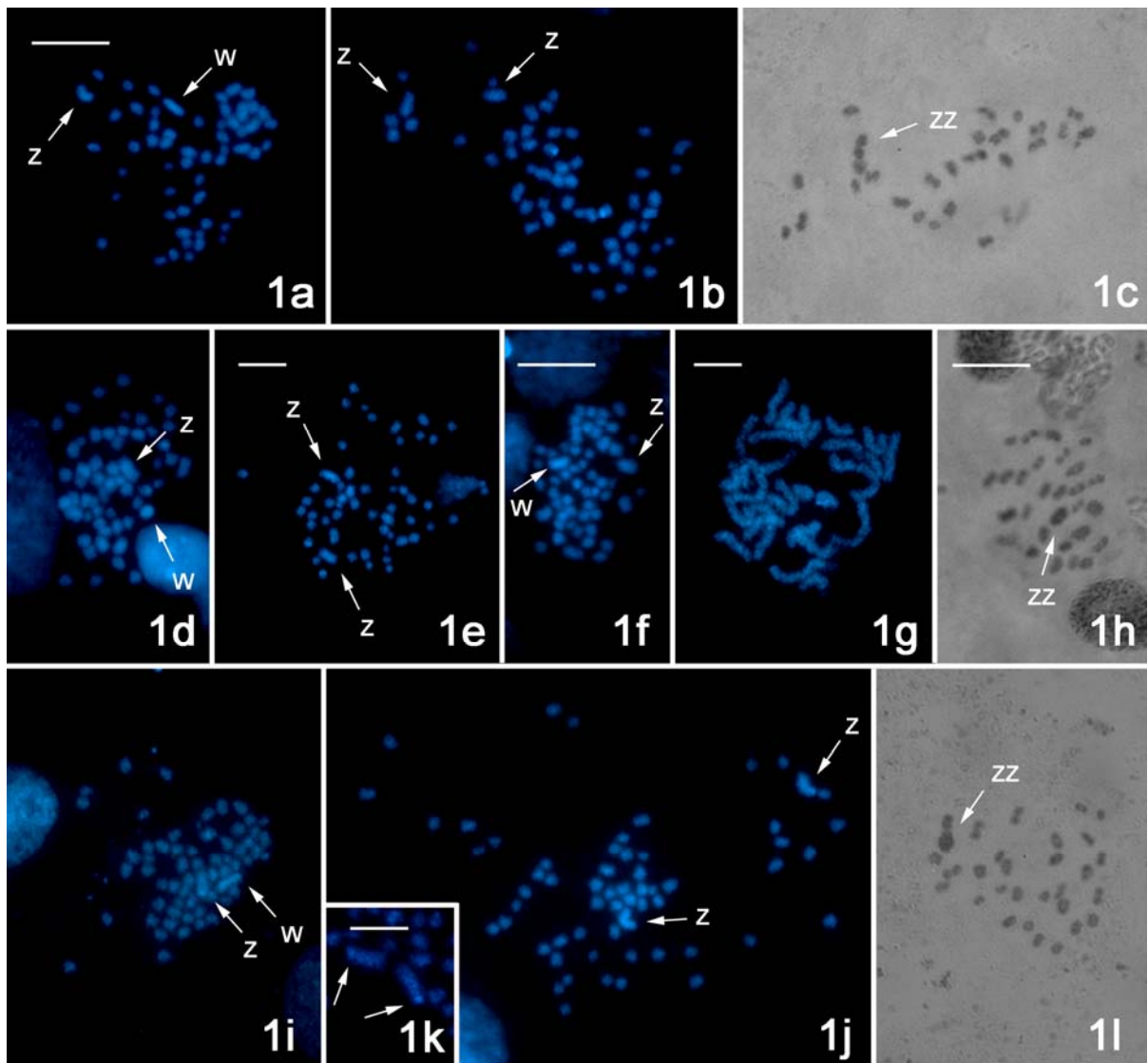
- Schmidt T, Heslop-Harrison JS (1998) Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes. *Trends Plant Sci.* **3**: 195-199.
- Schoenmakers S, Wassenaar E, Hoogerbrugge JW, Laven JSE, Grootegoed JA a kol. (2009) Female Meiotic Sex Chromosome Inactivation in Chicken. *PLoS Genet.* **5**: e1000466.
- Shibata F, Sahara K, Naito Y, Yasukochi Y (2009) Reprobing multicolor FISH preparations in Lepidopteran chromosome. *Zool. Sci.* **26**: 187-190.
- Singh ND, Larracuenta AM, Clark AG (2008) Contrasting the efficacy of selection on the X and autosomes in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* **25**: 454–467.
- Singh ND, Petrov DA (2007) Evolution of gene function on the X chromosome versus the autosomes. *Genome Dyn.* **3**: 101-118.
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L a kol. (2003) The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* **423**: 825-837.
- Sperling FAH (1994) Sex-linked genes and species-differences in Lepidoptera. *Can. Entomol.* **126**: 807-818.
- Steinmann M, Steinmann S (2005) Y chromosomes: born to be destroyed. *BioEssays* **27**: 1076-1083.
- Suomalainen E (1969) Chromosome evolution in the Lepidoptera. *In*: Darlington CD, Lewis KR (eds) *Chromosomes Today* **2**: 132-138. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Suzuki MG, Shimada T, Kobayashi M (1998) Absence of dosage compensation at the transcription level of a sex-linked gene in a female heterogametic insect, *Bombyx mori*. *Heredity* **81**: 275-283.
- Suzuki MG, Shimada T, Kobayashi M (1999) *Bmkettin*, homologue of the *Drosophila kettin* gene, is located on the Z chromosome in *Bombyx mori* and is not dosage compensated. *Heredity* **82**: 170-179.
- Sýkorová M (2011) Izolace a chromosomální lokalizace genů pro acetylcholinesterázu u obaleče jablečného (*Cydia pomonella*). Magisterská práce, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Česká republika.
- Šichová J (2009) Analýza pohlavního chromosomu Z obaleče jablečného (*Cydia pomonella*) pomocí laserové mikrodisekce. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Česká republika.
- Štorchová R, Divina P (2006) Nonrandom representation of sex-biased genes on chicken Z chromosome. *J. Mol. Evol.* **63**: 676-681.
- Štorchová R, Gregorová S, Buckiová D, Kyselová V, Divina P a kol. (2004) Genetic analysis of X-linked hybrid sterility in the house mouse. *Mamm. Genome* **15**: 515-524.
- Štorchová R, Reif J, Nachman MW (2010) Female heterogamety and speciation: Reduced introgression of the Z chromosome between two species of nightingales. *Evolution* **64**: 456-471.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 1596-1599.
- Teruel M, Cabrero J, Montiel EE, Acosta MJ, Sánchez A a kol. (2009) Microdissection and chromosome painting of X and B chromosomes in *Locusta migratoria*. *Chromosome Res.* **17**: 11-18.

- Thornton K, Bachtrog D, Andolfatto P (2006) X chromosomes and autosomes evolve at similar rates in *Drosophila*: no evidence for faster-X protein evolution. *Genome Res.* **16**: 498-504.
- Thornton K, Long M (2002) Rapid divergence of gene duplicates on the *Drosophila melanogaster* X chromosome. *Mol. Biol. Evol.* **19**: 918-925.
- Torgerson DG, Singh RS (2003) Sex-linked mammalian sperm proteins evolve faster than autosomal ones. *Mol. Biol. Evol.* **20**: 1705-1709.
- Traut W (1976) Pachytene mapping in the female silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera). *Chromosoma* **58**: 275-284.
- Traut W, Marec F (1996) Sex chromatin in Lepidoptera. *Q. Rev. Biol.* **71**: 239-256.
- Traut W, Marec F (1997) Sex chromosome differentiation in some species of Lepidoptera (Insecta). *Chromosome Res.* **5**: 283-291.
- Traut W, Sahara K, Marec F (2007) Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sex. Dev.* **1**: 332-346.
- Traut W, Sahara K, Otto TD, Marec F (1999) Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma* **108**: 173-180.
- Traut W, Weith A, Traut G (1986) Structural mutants of the W chromosome in *Ephesia* (Insecta, Lepidoptera). *Genetica* **70**: 69-79.
- Turelli M, Orr HA (1995) The dominance theory of Haldane's rule. *Genetics* **140**: 389-402.
- Turelli M, Orr HA (2000) Dominance, epistasis and the genetics of postzygotic isolation. *Genetics* **154**: 1663-1679.
- Veyrunes F, Waters PD, Miethke P, Rens W, McMillan D a kol. (2008) Bird-like sex chromosomes of platypus imply recent origin of mammal sex chromosomes. *Genome Res.* **18**: 965-973.
- Vicoso B, Charlesworth B (2006) Evolution on the X chromosome: unusual patterns and processes. *Nat. Rev. Genet.* **7**: 645-653.
- Vicoso B, Charlesworth B (2009) Effective population size and Faster-X effect: an extended model. *Evolution* **63**: 2413-2426.
- Vinckenbosch N, Dupanloup I, Kaessmann H (2006) Evolutionary fate of retroposed gene copies in the human genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 3220-3225.
- Vítková M, Fuková I, Kubíčková S, Marec F (2007) Molecular divergence of the W chromosomes in pyralid moths (Lepidoptera). *Chromosome Res.* **15**: 917-930.
- Wang PJ, McCarrey JR, Yang F, Page DC (2001) An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat. Genet.* **27**: 422-426.
- Wu CI, Xu EY (2003) Sexual antagonism and X inactivation – the SAXI hypothesis. *Trends Genet.* **19**: 243-247.
- Yang Z (1997) PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Comput. Appl. Biosci.* **13**: 555-556.
- Yasukochi Y, Tanaka-Okuyama M, Shibata F, Yoshido A, Marec F a kol. (2009) Extensive conserved synteny of genes between the karyotypes of *Manduca sexta* and *Bombyx mori* revealed by BAC-FISH mapping. *PLoS ONE* **4**: e7465.
- Yoshido A, Bando H, Yasukochi Y, Sahara K (2005a) The *Bombyx mori* karyotype and the assignment of linkage groups. *Genetics* **170**: 675-685.
- Yoshido A, Marec F, Sahara K (2005b) Resolution of sex chromosome constitution by genomic *in situ* hybridization with (TTAGG)_n telomeric probe in some species of Lepidoptera. *Chromosoma* **114**: 193-202.

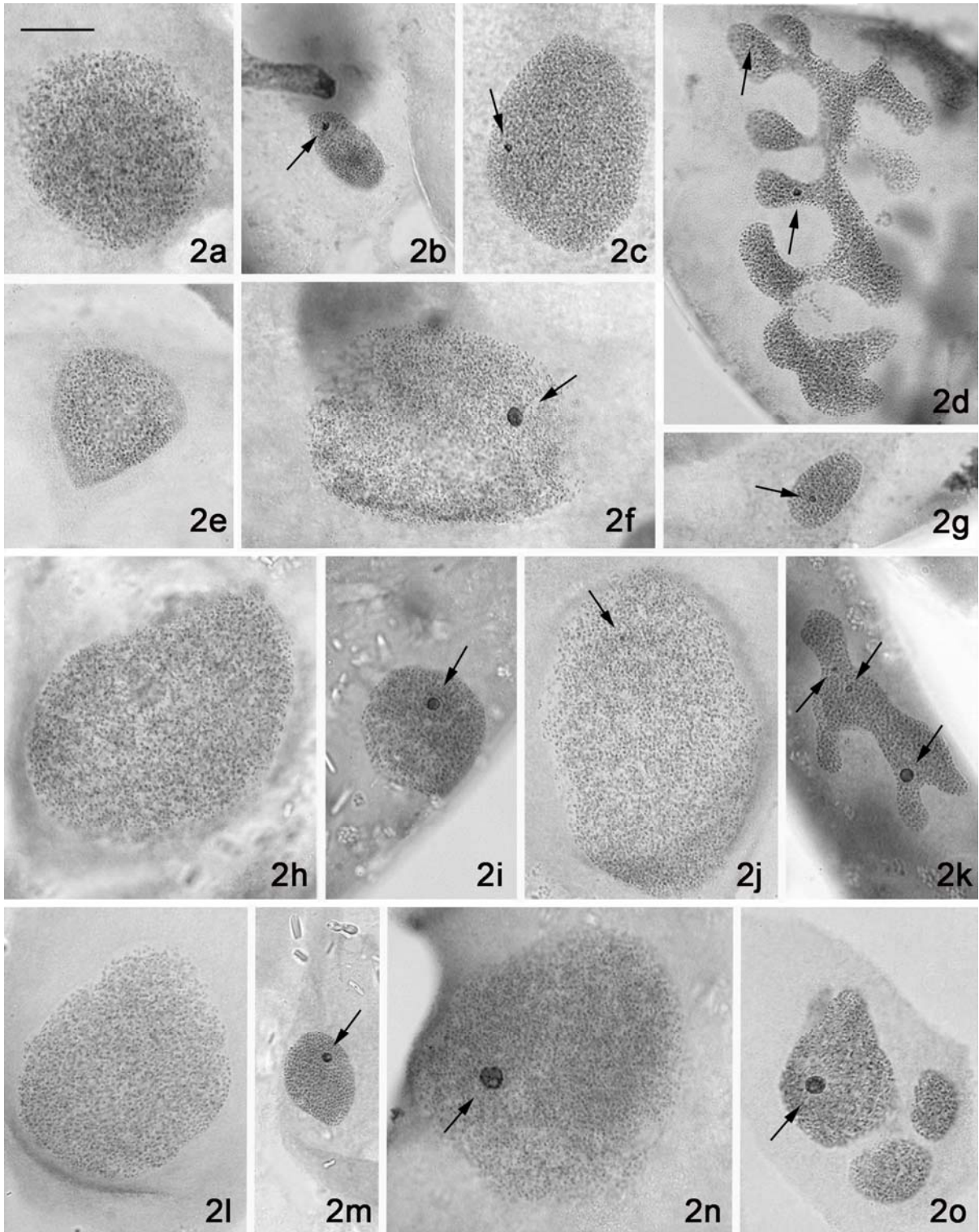
- Yoshido A, Yasukochi Y, Marec F, Abe H, Sahara K (2007) FISH analysis of the W chromosome in *Bombyx mandarina* and several other species of Lepidoptera by means of *B. mori* W-BAC probes. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* **76**: 1-7.
- Zha X, Xia Q, Duan J, Wang C, He N a kol. (2009) Dosage analysis of Z chromosome genes using microarray in silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39**: 315-321.
- Zwick A (2008) Molecular phylogeny of Anthelidae and other bombycoid taxa (Lepidoptera: Bombycoidea). *Syst. Entomol.* **33**: 190-209.

8. Přílohy

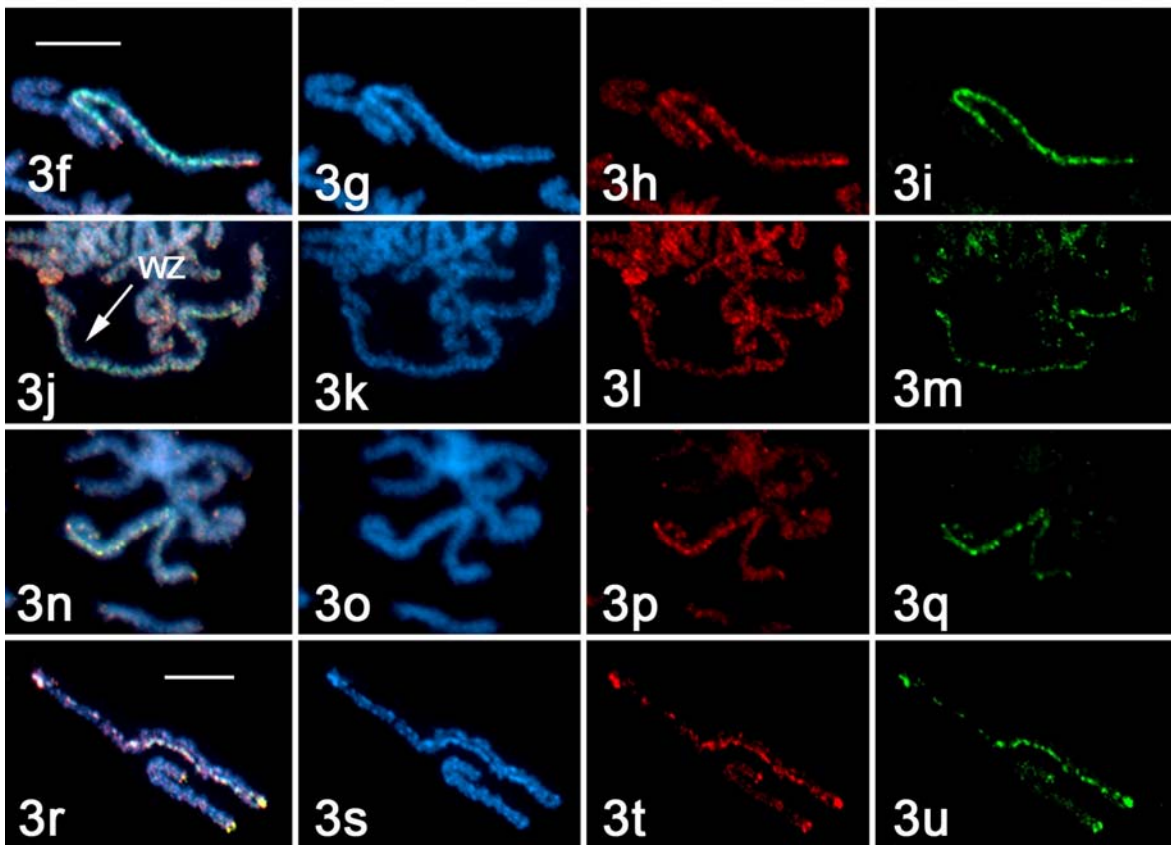
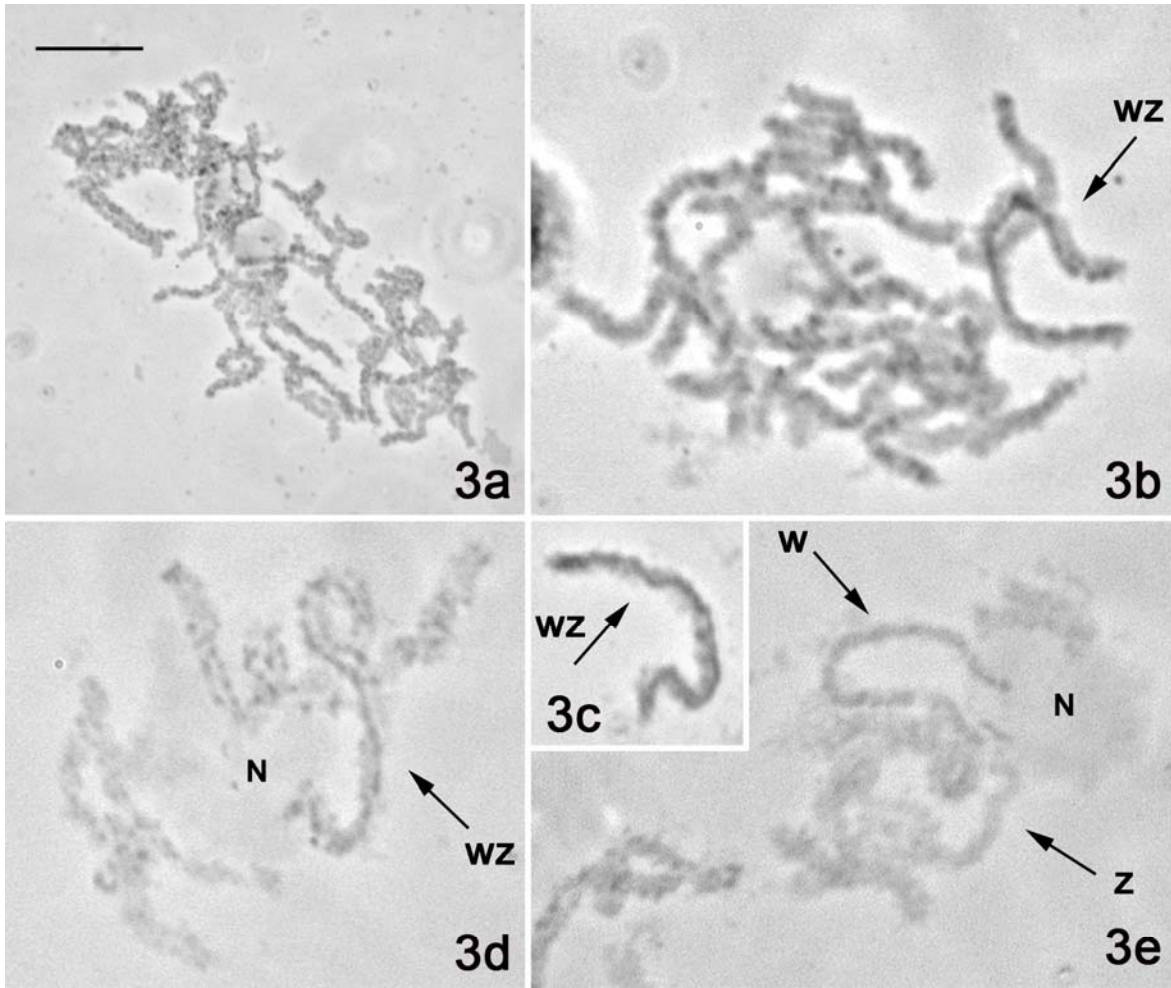
Obr. P1. Mitotické a meiotické chromosomální sady studovaných druhů čeledi Tortricidae. Preparáty připravené “spreading” technikou byly barveny DAPI a pořízené digitální snímky obarveny modře (**a**, **b**, **d-g**, **i-k**), roztlakové preparáty byly barveny orceinem (**c**, **h**, **l**). Šipky ukazují na pohlavní chromosomy Z a W, největší elementy karyotypu. Chromosom W je u všech druhů obalečů díky svému heterochromatinovému složení dobře rozpoznatelný. Obaleč východní, *Grapholita molesta* (**a-c**): **a** – mitotická sada samice ($2n = 56$); **b** – mitotická sada samce ($2n = 56$); **c** – metafáze I samce s 28 bivalenty. Obaleč švestkový, *G. funebrana* (**d**, **e**): **d** – mitotický komplement samice ($2n = 56$) s relativně malým chromosomem W v porovnání s ostatními druhy obalečů; **e** – mitotický komplement samce ($2n = 56$). Obaleč mramorovaný, *Lobesia botrana* (**f-h**): **f** – mitotické jádro samice ($2n = 56$); **g** – samčí pachytenní jádro obsahující 28 bivalentů; **h** – metafáze I samce s 28 bivalenty. Obalečik jednopásný, *Eupoecilia ambiguella* (**i-l**): **i** – samičí mitotické chromosomy ($2n = 30$); **j** – samčí mitotické chromosomy ($2n = 30$); **k** – detail pohlavních chromosomů Z s šipkami ukazujícími na DAPI-pozitivní terminální segmenty; **l** – metafáze I s 30 bivalenty. Obrázek **k** měřítko = 5 μm ; ostatní obrázky měřítko = 10 μm ; obrázky **a-d** a **h-l** mají stejné měřítko.



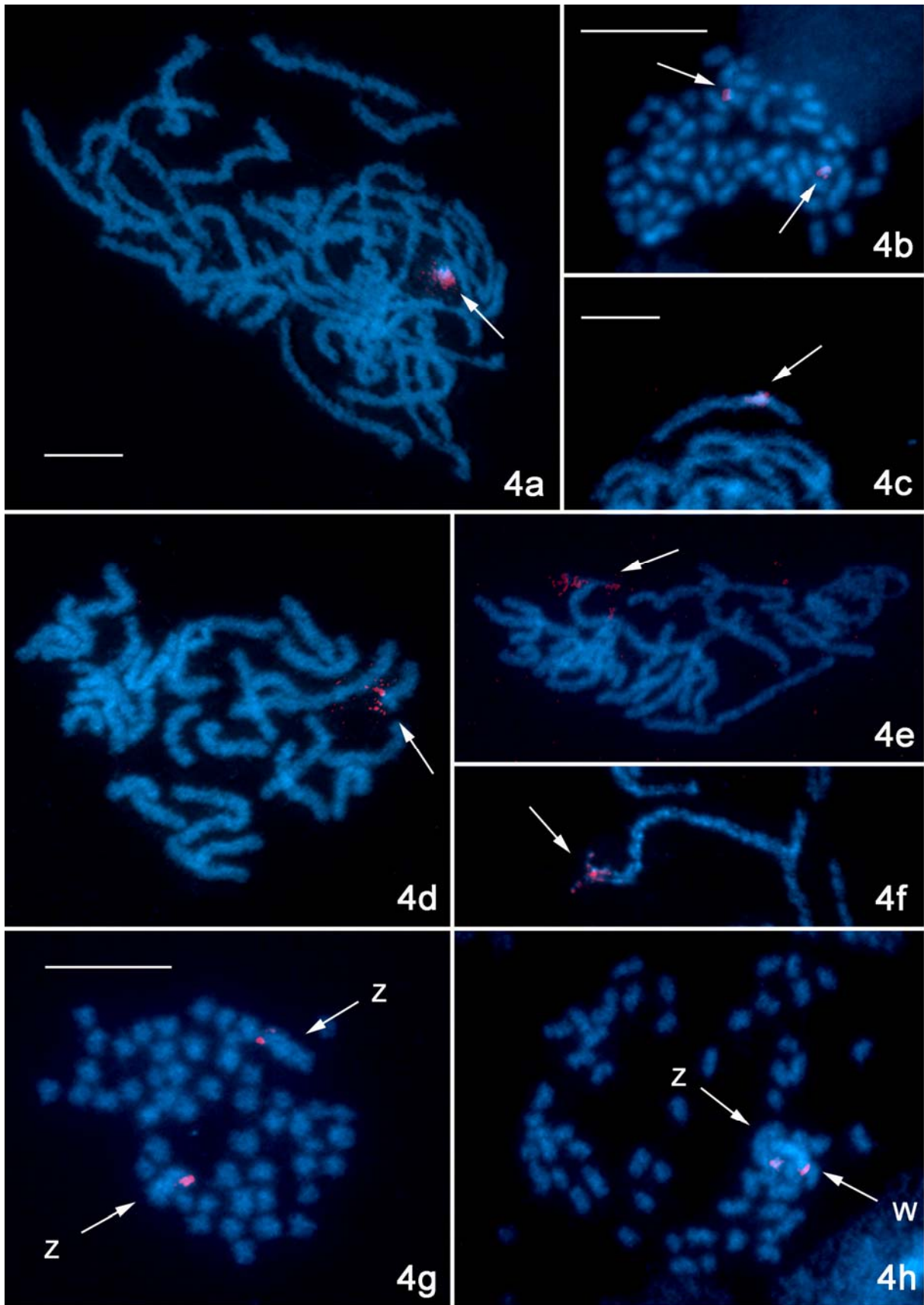
Obr. P2. Interfázní jádra studovaných druhů čeledi Tortricidae připravené z malpighických trubic samců (**a, e, h, l**), samičích larev 3. instaru (**b, g, i, m**), samičích larev 5. instaru (**c, f, j, n**) a samičích dospělců (**d, k, o**). Šipky ukazují na heterochromatinové tělísko, tzv. “sex chromatin”. Obaleč východní, *G. molesta* (**a-d**): **a** – interfázní jádro samce; **b** – málo polyploidní jádro samice s relativně velkým heterochromatinem; **c** – více polyploidní jádro samice; při srovnání s Obr. **2b** je patrné, že heterochromatinové tělísko neroste proporcionálně k velikosti (tj. stupni ploidie) jádra **d** – vysoce polyploidní jádro samice s fragmentovaným heterochromatinem. Obaleč švestkový, *G. funebrana* (**e-g**): **e** – interfázní jádro samce; **f** – interfázní jádro samice; **g** – jádro samice s nízkou úrovní polyploidizace. Obaleč mramorovaný, *L. botrana* (**h-k**): **h** – interfázní jádro samce; **i** – málo polyploidní jádro samice s velkým heterochromatinem; **j** – miniaturní heterochromatinové tělísko více polyploidních samičích jader; **k** – fragmentovaný heterochromatin dospělé samice. Obalečík jednopásný, *E. ambiguella* (**l-o**): **l** – samčí interfázní jádro; **m** – jádro samice s nízkým stupněm polyploidie; **n** – více polyploidní jádro samice; **o** – interfázní jádro dospělé samice. Měřítka = 20 µm.



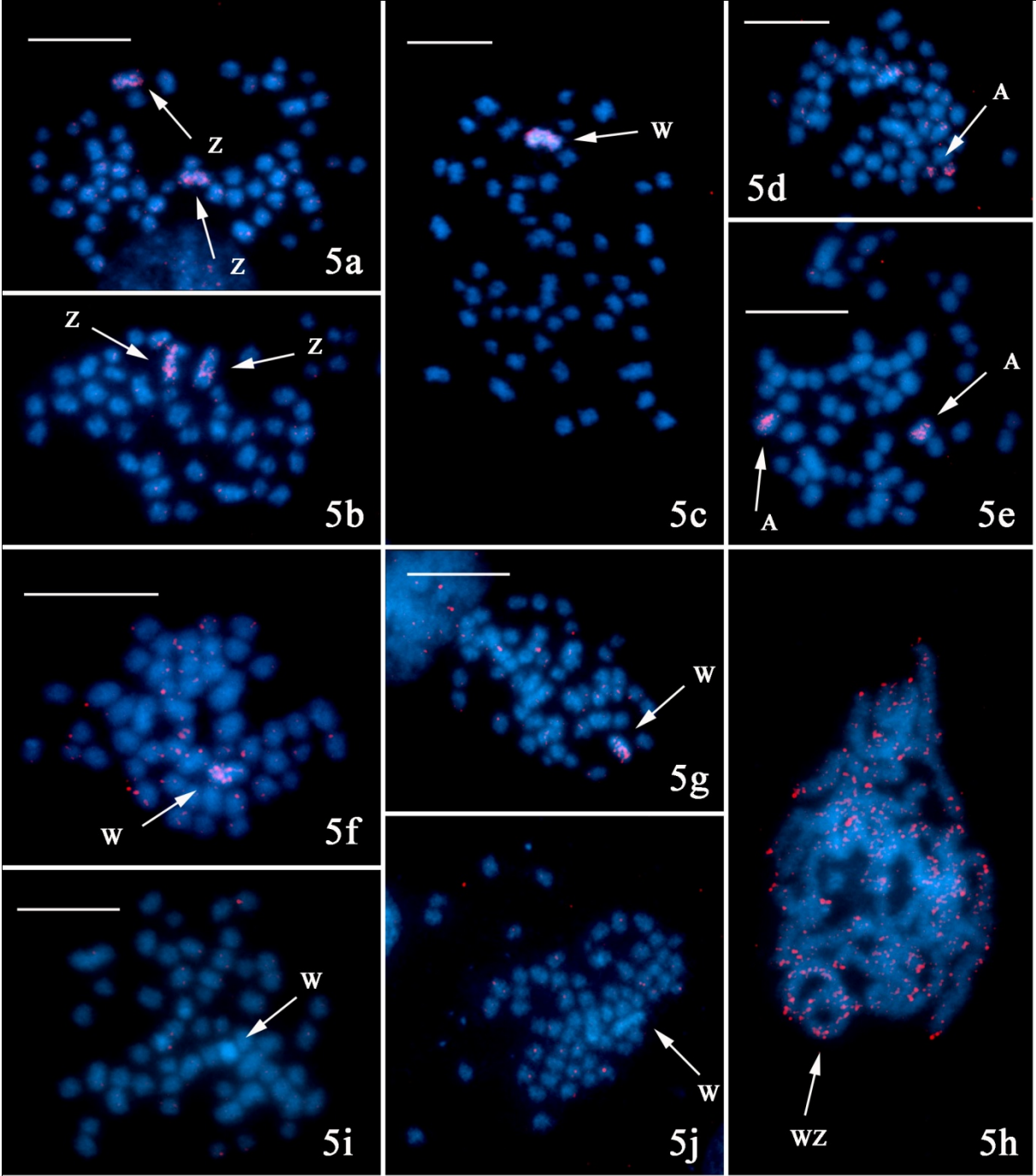
Obr. P3. Identifikace chromosomu W u studovaných druhů obalečů z čeledi Tortricidae. Samičí preparáty připravené “spreading” technikou byly barveny orceinem (**a-e**) nebo na nich byla provedena komparativní genomová hybridizace (**f-u**). **a** – pachytenní jádro obaleče východního, *G. molesta*. **b** – pachytenní komplement obaleče mramorovaného, *L. botrana*; šipka ukazuje na zvýrazněný WZ bivalent. **c** – detail pohlavního bivalentu *L. botrana*. **d** – pohlavní bivalent WZ obalečička jednopásného, *E. ambiguella*, ukotvený v jadérku (N = “nucleolus”); šipka ukazuje na zvýrazněný WZ bivalent. **e** – samičí pachytenní chromosomy *E. ambiguella*; šipky ukazují na univalenty W a Z ukotvené v jadérku (N = “nucleolus”); orcein zvýraznil chromosom W a terminální část univalentu Z. Komparativní genomová hybridizace (CGH) na pohlavním bivalentu samic obaleče jablečného (**f-i**), obaleče východního (**j-m**), obaleče mramorovaného (**n-q**) a obalečička jednopásného (**r-u**). Samičí gDNA byla značena fluorescein-12-dUTP (zelená) a samčí gDNA Cy3-dUTP (červená). Chromosomy byly podbarveny DAPI (modrá). Obrázky **f, j, n, r** – ukazují na výraznou akumulaci signálu obou značených sond na vláknech chromosomu W v pohlavních bivalentech WZ studovaných druhů. Všechny ostatní obrázky představují snímky těchto WZ bivalentů v jednotlivých fluorescenčních pásmech: **g, k, o, s** – bivalenty podbarvené DAPI; **h, l, p, t** – hybridizační signály červeně značené samčí gDNA; **i, m, q, u** – signály zeleně značené samičí gDNA. Obrázky **a-e** měřítko = 20 μm ; obrázky **f-q** měřítko = 10 μm ; obrázky **r-u** měřítko = 10 μm .



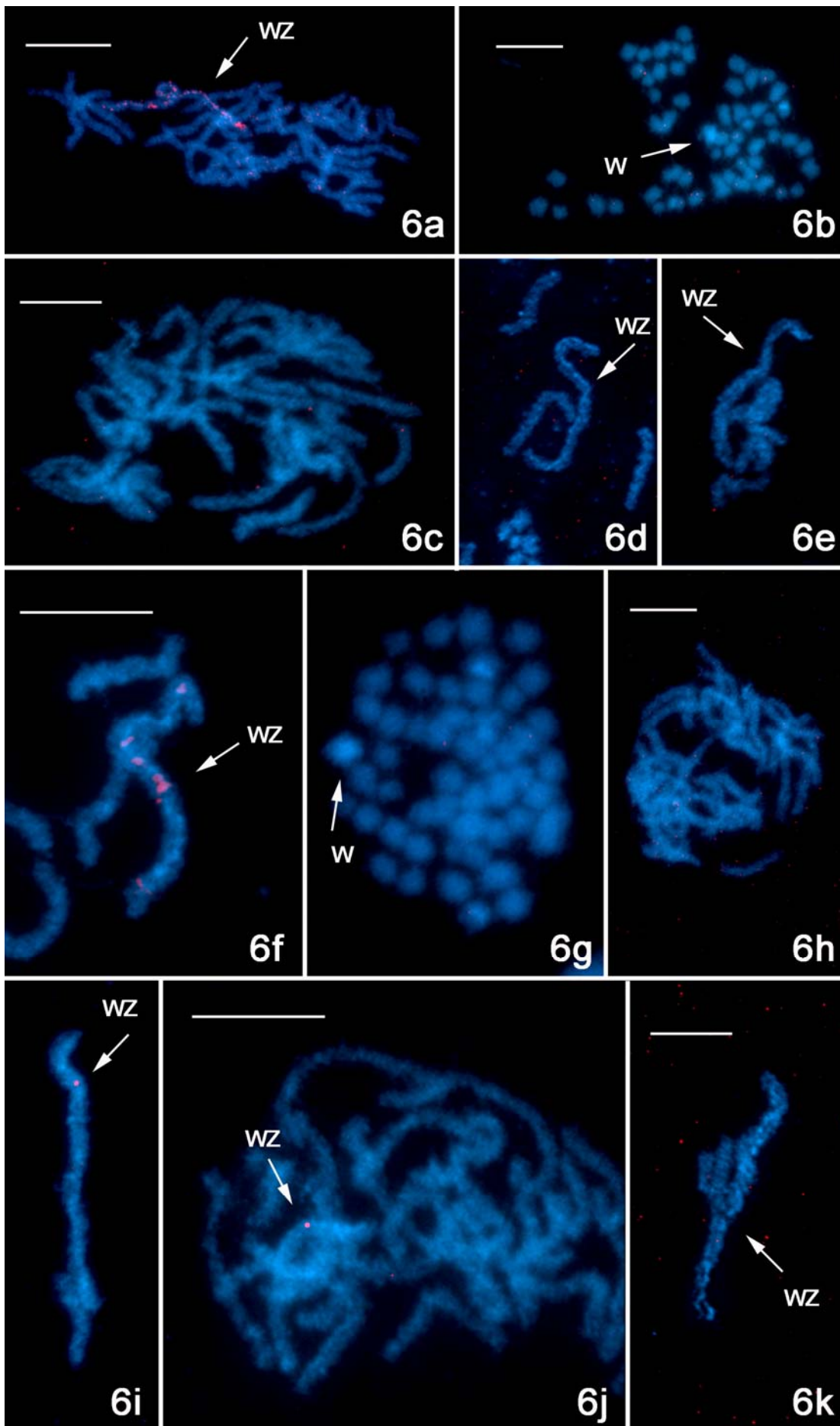
Obr. P4. Lokalizace organizátorů jadérka (NOR) na chromosomech vybraných druhů motýlů z čeledi Tortricidae fluorescenční *in situ* hybridizací s biotinylovanou 18S rDNA sondou, detekovanou fluorochromem Cy3 (červená; hybridizační signály označeny šipkami). Chromosomy byly podbarveny DAPI (modrá). Obaleč východní, *G. molesta* (**a, b**): **a** – pachytenní jádro samce; **b** – mitotická sada samce ($2n = 56$). Obaleč švestkový, *G. funebrana* (**c**): **c** – bivalent nesoucí NOR. Obaleč mramorovaný, *L. botrana* (**d**): **d** – pachytenní komplement samce. Obalečík jednopásý, *E. ambiguella* (**e-h**): **e** – samčí pachytenní jádro; **f** – samičí pohlavní bivalent WZ; **g** – mitotické jádro samce; šipky ukazují na oba chromosomy Z nesoucí terminální klastr rDNA; **h** – samičí mitotické jádro; šipky ukazují na pohlavní chromosomy Z a W nesoucí NOR. Měřítka = 10 μm ; obrázky **c-f** mají stejné měřítko; obrázky **g-h** mají stejné měřítko.



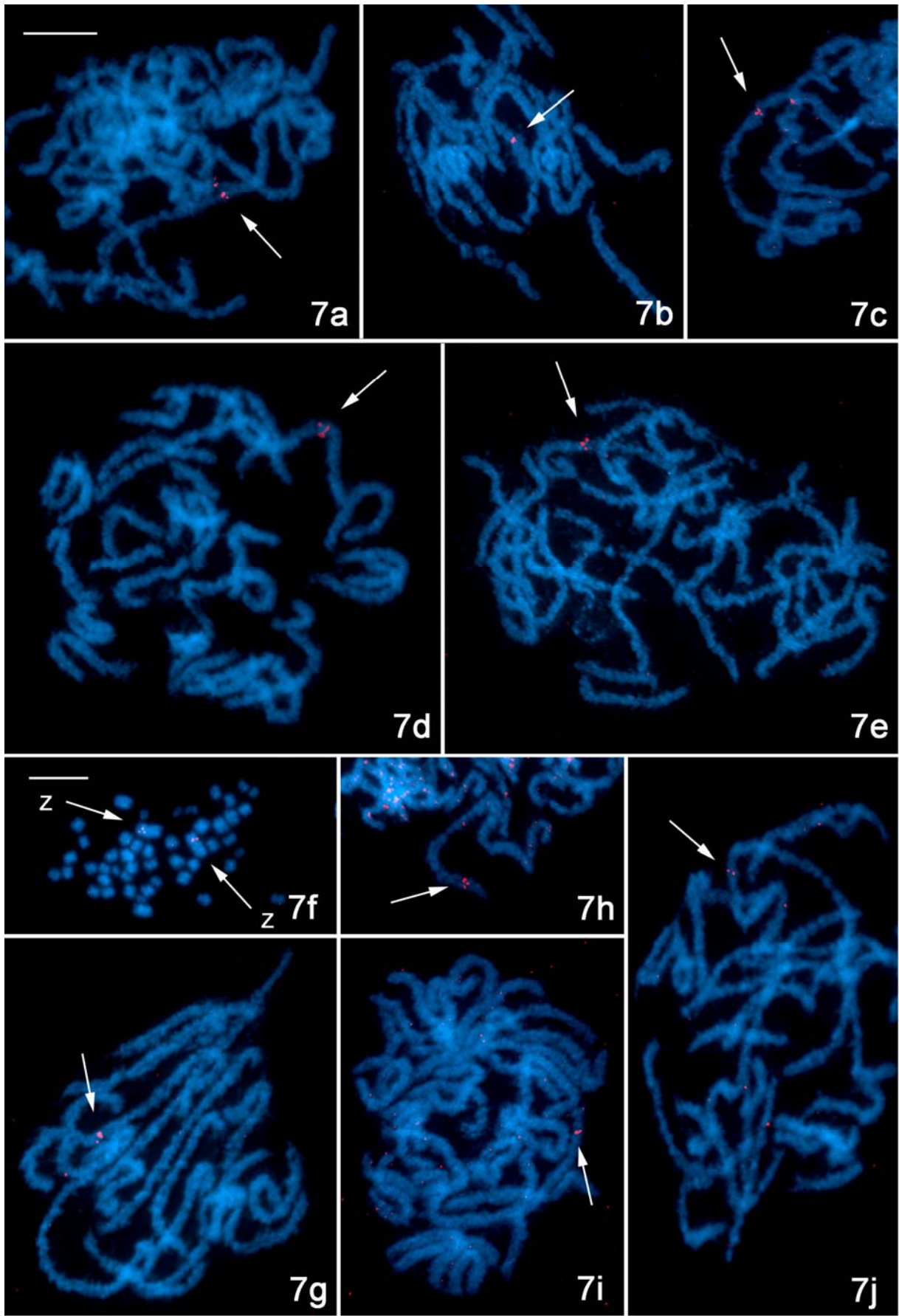
Obr. P5. Fluorescenční *in situ* hybridizace s použitím celochromosomových malovacích sond odvozených z pohlavního chromosomu Z (**a**, **b**), chromosomu W (**c**) a autosomů (**d**, **e**) obaleče jablečného, *C. pomonella*, a Zoo-FISH W-specifické malovací sondy *C. pomonella* na preparátech ostatních druhů čeledi Tortricidae (**f-h**). Sonden byly značeny fluorochromem Cy3-dUTP (červená) a chromosomy byly podbarveny DAPI (modrá). Obaleč jablečný, *C. pomonella* (**a-e**): **a** – samčí mitotická sada; šipky ukazují na oba zvýrazněné chromosomy Z; **b** – mitotická spermatogoniální metafáze s použitím samičí kompetitorové gDNA; šipky ukazují na pohlavní chromosomy Z; **c** – samičí mitotické jádro; šipka ukazuje na sondou značený chromosom W; **d** – samičí mitotické chromosomy; šipka ukazuje na akumulaci signálu na dvou malých autosomech; **e** – mitotická metafáze samce; šipky ukazují na sondou značené homologní autosomy. **f** – samičí mitotická sada obaleče východního, *G. molesta*; šipka ukazuje na částečně značený pohlavní chromosom W. **g** – mitotický komplement samic obaleče mramorovaného, *L. botrana*; šipka ukazuje na částečně značený chromosom W. **h** – samičí pachytenní jádro *L. botrana*; WZ označuje pohlavní bivalent, jehož chromosom W je dekorován mírně akumulovanými roztroušenými hybridizačními signály. **i** – sada mitotických chromosomů obaleče švestkového, *G. molesta*; šipka ukazuje na sondou neznačený chromosom W. **j** – samičí mitotická metafáze obalečika jednopásného, *E. ambiguella*; šipka ukazuje na sondou neznačený chromosom W. Měřítka = 10 μ m; obrázky **a-b** mají stejné měřítko; obrázky **g-h, j** mají stejné měřítko.



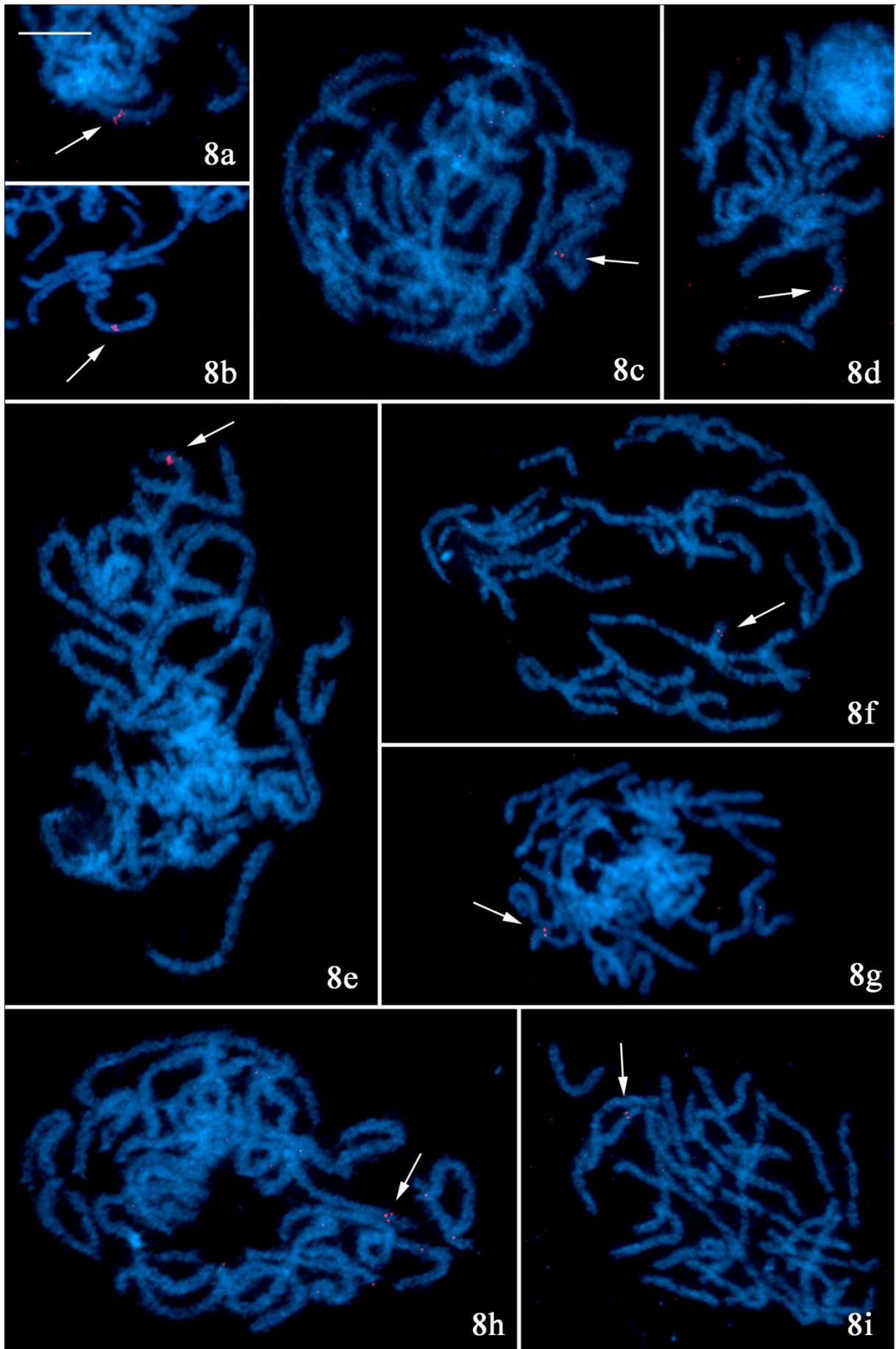
Obr. P6. Mezidruhová hybridizace klonů BAC W27-1 (**a-e**) a 23N12 (**f-k**) odvozených z pohlavního chromosomu W na chromosomální preparáty studovaných obalečů fluorescenční *in situ* hybridizací. Sondy byly značeny Cy3-dUTP (červená) a chromosomy byly podbarveny DAPI (modrá). **a** – samičí pachytenní komplement obaleče jablečného, *C. pomonella*, s hybridizačními signály klonu W27-1, roztroušenými po celé délce chromosomu W bivalentu WZ (šipka). **b** – mitotická sada obaleče švestkového, *G. funebrana*; šipka míří na pohlavní chromosom W. **c** – pachytenní jádro obaleče východního, *G. molesta*; bivalent pohlavních chromosomů WZ nebyl rozpoznatelný. **d** – pohlavní bivalent obaleče mramorovaného, *L. botrana*. **e** – pohlavní bivalent obalečika jednopásného, *E. ambiguella*. **f** – bivalent WZ (šipka) *C. pomonella* s několika roztroušenými hybridizačními signály klonu 23N12. **g** – mitotický komplement *G. funebrana*; šipka ukazuje na sondou neznačený chromosom W. **h** – pachytenní jádro *G. molesta*; WZ bivalent nebyl rozpoznatelný. **i** – pohlavní bivalent *L. botrana*; v terminální části chromosomu W je patrný diskrétní signál. **j** – pachytenní komplement *L. botrana* s diskrétním signálem sondy na chromosomu W bivalentu WZ (šipka). **k** – pohlavní bivalent WZ *E. ambiguella* bez hybridizačních signálů. Obrázek **a** měřítko = 20 μm ; obrázky **b-k** měřítko = 10 μm ; obrázky **c-e** stejné měřítko; obrázky **f-g** stejné měřítko; měřítko **i-j** stejné měřítko.



Obr. P7. Mezidruhová hybridizace klonů BAC selektovaných podle genů lokalizovaných na chromosomu Z *C. pomonella*, jmenovitě *Shaker*, *IDH2* a *Notch*, na chromosomální preparáty vybraných obalečů pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace. Sondy byly značeny Cy3-dUTP (červená; označeny šipkou) a chromosomy byly podbarvené DAPI (modrá). **a-c** – hybridizace klonu obsahujícího gen *Shaker* na pachytenní preparáty obaleče jablečného (**a**), obaleče východního (**b**) a obaleče švestkového (**c**); sonda poskytla diskrétní dvojitý signál vždy na jednom dlouhém bivalentu, přibližně v jeho dvou třetinách. **d-g** – mezidruhová hybridizace klonu BAC selektovaného dle genu *IDH2* na chromosomální komplementy obaleče jablečného (**d**), obaleče východního (**e**) a obaleče švestkového (**f**, **g**); hybridizační signály byly lokalizovány ve dvou třetinách dlouhého bivalentu (**d**, **e**, **g**) nebo dvou největších chromosomů mitotického komplementu (**f**). **h-j** – hybridizace klonu BAC selektovaného podle genu *Notch* na pachytenní chromosomy obaleče jablečného (**h**), obaleče východního (**i**) a obaleče švestkového (**j**); sonda hybridizovala v distální části bivalentu. Měřítko = 10 μm; obrázky **a-e**, **g-j** mají stejné měřítko.



Obr. P8. Mezidruhová hybridizace klonů BAC selektovaných podle autosomálních genů *Ard1* a *EF-1α* *C. pomonella* na chromosomální preparáty vybraných obalečů pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace. Sondy byly značeny Cy3-dUTP (červená; viz šipky) a chromosomy byly podbarvené DAPI (modrá). **a-d** – hybridizace autosomálního klonu *Ard1* na pachytenní preparáty obaleče jablečného (**a**), obaleče východního (**b**), obaleče švestkového (**c**) a obaleče mramorovaného (**d**); u všech druhů sonda poskytla diskretní dvojitý signál vždy na jednom menším bivalentu přibližně v jeho polovině. **e-i** – mezidruhová hybridizace klonu BAC odvozeného z genu *EF-1α* na chromosomální komplementy obaleče jablečného (**e**), obaleče východního (**f**), obaleče švestkového (**h**), obaleče mramorovaného (**i**) a obalečika jednopásného (**g**); diskretní dvojité hybridizační signály byly lokalizovány v terminální části středně dlouhého bivalentu. Měřítko = 10 μm.



Obr. P9. Výsledky fyzického mapování klonů BAC obaleče jablečného, *C. pomonella*, metodou “reprobing”. Sondy byly značeny Cy3-dUTP (červená) a v programu Adobe Photoshop k nim byly přiřazeny odlišné barvy, aby odlišily jednotlivé re-hybridizace, takto; Z-lokalizované klony *IDH2* (červená), *Shaker* (zelená) a *Notch* (fialová); autosomální klon *EF-1α* (žlutá). Chromosomy byly podbarveny DAPI (modrá). **a** – samčí pachytenní jádro obaleče jablečného, *C. pomonella*, se signály klonů *IDH2*, *Shaker* a *Notch* lokalizovanými na pohlavním chromosomu Z a signálem klonu *EF-1α* na autosomálním bivalentu. **b** – hybridizace klonů odvozených z genů *IDH2*, *Shaker*, *Notch* a *EF-1α* na samčí pachytenní jádro obaleče východního, *G. molesta*, **c** – kolokalizace hybridizačních signálů genů *IDH2*, *Shaker*, *Notch* na bivalentu pohlavních chromosomů Z v pachytene *G. molesta*. **d** – detail pachytenního bivalentu samce obaleče švestkového, *G. funebrana*, nesoucího geny *IDH2*, *Shaker* a *Notch*; signál sondy *IDH2* se nachází v oblasti, kde nejsou pohlavní chromosomy spárovány. **e** – důkaz autosomální lokace klonu *EF-1α* hybridizací se sondami *IDH2* a *Shaker* odvozenými z pohlavního chromosomu Z na pachytenním komplementu *G. funebrana*. Měřítka = 10 μm.

