

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Analýza repetitivní DNA u píďalky podzimní

(*Operophtera brumata*)

Bakalářská práce

Tereza Vajnarová

Školitelka: RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D.

Konzultantka: RNDr. Martina Hejníčková

České Budějovice 2022

Vajnarová, T., 2022: Analýza repetitivní DNA u píďalky podzimní (*Operophtera brumata*). [Analysis of the repetitive DNA in winter moth (*Operophtera brumata*). Bc. Thesis, in Czech] – 35 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

Anotace

This thesis focuses on the analysis of satellite sequences located on the sex chromosomes of the winter moth (*Operophtera brumata*). These repetitive sequences were isolated by PCR, cloned, and localized in pachytene nuclei by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). None of the sequences tested were abundant on the sex chromosomes.

Financování práce

Tato práce byla financována z grantu číslo 20-13784S pana prof. RNDr. Františka Marce, CSc., Grantovou agenturou České republiky.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne 10. 4. 2022

.....

Tereza Vajnarová

Poděkování

V první řadě bych chtěla velice poděkovat své školitelce Magdě Zrzavé, která mě celou dobu trpělivě vedla od prvních krůčků v laboratoři až k sepsání této práce. Děkuji jí především za její podporu, čas, který si na mě vždy vyhradila, za její skvělé vedení a dodávání motivace i ve chvílích, kdy se věci zrovna nedařily. Dále bych chtěla poděkovat i ostatním členům naší laboratoře za jejich ochotu mi vždy poradit a pomoci v případě potřeby. Především bych chtěla poděkovat své konzultantce Martině Hejníčkové, která mi, kromě jiného, také poskytla základní data k této práci. Velký dík patří i Františkovi Marcovi za financování této práce a umožnění jejího vypracování v jeho laboratoři. Ráda bych poděkovala i Pavlovi Potockému za dodaný hmyz.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat i své přítelkyni Zdenče a své rodině, hlavně mamince a bratrovi Matějovi, kteří mě celou dobu podporují, zvládají mé chvíle beznaděje a dodávají mi další naději, že celé studium zvládnou.

Na závěr děkuji i své kamarádce Verče Řehové, která mě také podporovala a díky které je studium na vysoké škole o něco větší pohoda.

Obsah

1 Úvod	1
1.1 Repetitivní sekvence v eukaryotním genomu.....	1
1.2 Typy repetice	2
1.3 Evoluce pohlavních chromosomů	3
1.4 Chromosomální určení pohlaví	4
1.5 Pohlavní chromosomy motýlů.....	4
1.6 Píďalka podzimní	5
2 Cíle práce.....	7
3 Materiál a metody.....	8
3.1 Pokusný organismus.....	8
3.2 Příprava chromosomálních preparátů.....	8
3.3 Izolace DNA.....	9
3.4 Gelová elektroforéza.....	10
3.5 Získání sekvencí a navrhování primerů.....	10
3.6 PCR.....	11
3.6.1 Amplifikace satelitní DNA pomocí PCR	12
3.7 Klonování a sekvenace	13
3.7.1 Ligace	13
3.7.2 Transformace kompetentních buněk pomocí teplotního šoku (heat shock).....	13
3.7.3 Testování přítomnosti insertu pomocí PCR a přenesení na nové médium.....	14
3.7.4 Inokulace	15
3.8 Lokalizace satDNA na chromosomech pomocí FISH.....	15
3.8.1 Značení sondy pomocí PCR	15
3.8.2 Přímá FISH.....	16
3.8.3 Lokalizace satDNA na chromosomech pomocí nepřímé FISH.....	17
3.9 Analýza preparátů.....	18

4 Výsledky.....	19
4.1 Bioinformatická analýza.....	19
4.2 PCR.....	19
4.3 Lokalizace vybraných satelitů	21
5 Diskuze	24
5.1 Další postup	26
6 Závěr.....	28
7 Zdroje	29
8 Přílohy	35

1 Úvod

Řád motýli (Lepidoptera) obsahuje okolo 160 000 popsáných druhů a je značně zkoumanou skupinou hmyzu (Kristensen et al., 2007). Dnes už máme k dispozici mnoho osekvenovaných genomů, ale i přes to, že repetitivní sekvence tvoří významnou složku každého eukaryotního genomu, se toho o nich u motýlů stále moc neví. Tato bakalářská práce se zabývá studiem satelitních sekvencí v genomu herbivorního škůdce píďalky podzimní (*Operopthera brumata*, Linnaeus 1758) z čeledi Geometridae. Vybrané satelitní sekvence byly analyzovány pomocí cytogenetických a molekulárních metod.

1.1 Repetitivní sekvence v eukaryotním genomu

Repetice, nebo také repetitivní DNA, jsou takové úseky DNA, kde dochází k výskytu desítek i stovek kopií stejných jednotek. Velikost opakující se jednotky se pohybuje od jednotlivých bází až po kilobáze (Gabor a Gill, 1982). Repetitivní sekvence se mohou nacházet kdekoli v genomu, ale k jejich oblíbeným místům patří především centromery (které se u motýlů nenachází), telomerické a subtelomerické oblasti a pohlavní chromosomy W a Y. Nejvyšší koncentraci repetitivních sekvencí nalezneme v heterochromatinových blocích (Biscotti et al., 2015). Repetitivní DNA můžeme dělit na dva základní druhy, a to na mobilní elementy a tandemové repetice (Charlesworth et al., 1994).

Dříve tyto repetice byly známy pod názvy jako „junk DNA“ nebo „selfish DNA“ a myslelo se, že nemají žádnou funkci. Nyní se ukazuje, že význam mají podstatný (Kidwell a Lisch, 2001). Repetitivní sekvence hrají významnou roli při evoluci celého genomu a pohlavních chromosomů, podílejí se na chromosomálních přestavbách, jsou zdrojem nových genů a podobně. Repetitivní sekvence mohou být i záměrně využívány buňkou například k modulaci chromatinu pomocí transkriptů některých sekvencí (Kejnovsky et al., 2009; Plohl et al., 2012). Repetitivní sekvence také ovlivňují velikost genomu svými kopiemi a přispívají k takzvanému paradoxu hodnoty C, což znamená, že velikost genomu neodpovídá složitosti organismu (Biémont a Vieira, 2006).

1.2 Typy repetice

Satelitní DNA (satDNA) se skládá z tandemově se opakujících jednotek, tzv. monomerů. SatDNA mají podobu dlouhých řad a vyskytují se nejčastěji v heterochromatinu, který se akumuluje například na pohlavních chromosomech nebo na chromosomech B. Repetice jsou důležité pro správnou funkci a stavbu centromer, telomer nebo subtelomerních oblastí a mohou sloužit jako místa pro uchycení proteinů či jako místa pro epigenetické modifikace (Garrido-Ramos, 2017; Palomeque a Lorite, 2008). V genomu druhu i jedince je široká variabilita počtu a typů repetice. Mezi různými tandemovými repeticemi můžeme pozorovat rozdíly například v celkové délce, v délce jednotlivých monomerů, složení monomerů a v jejich sekundární a terciární struktuře, v pořadí bází nebo místu výskytu (Plohl et al., 2012).

Satelitní DNA byla zkoumána spíše na druzích s monocentrickými chromosomy, jelikož druhů s holokinetickými chromosomy, což jsou chromosomy, které nemají lokalizovanou centromeru, je mnohem méně. U druhů s holokinetickými chromosomy nacházíme satelitní DNA často jen v heterochromatinových blocích, pokud organismus tímto místem disponuje (Melters et al., 2012; Sahara et al., 2012). Jedna z nejrozsáhlejších studií holokinetických organismů v souvislosti s repeticemi byla provedena na rostlině *Luzula elegans* (Heckmann et al., 2013). U hmyzu s holokinetickými chromosomy byly satelitní sekvence zkoumány a nalezeny především ve skupině motýlů, ploštic a mšic. U mšic anebo například u ploštice *Triatoma infestans* (Heteroptera) se ukázalo, že satelitní sekvence jsou v těchto skupinách shromážděny právě v oblastech bohatých na heterochromatin, jako jsou například subtelomery chromosomů (Bardella et al., 2014; Palomeque a Lorite, 2008).

Situace u motýlů se oproti ostatním zkoumaným organismům liší, protože u motýlů nenacházíme téměř žádná místa bohatá na heterochromatin. Výjimkou je pohlavní chromosom W, který je u motýlů často, ne však vždy, tvořený heterochromatinem. O satelitních sekvencích máme poměrně málo informací. Z popsaných satelitů už máme k dispozici například satelit MBSAT1 u můry zelené (*Mamestra brassicae*, Noctuidae), který je abundantní na pohlavních chromosomech Z a W (Mandrioli et al., 2003). Dalším z nich je satelit CpSAT-1, objevený na obaleči jablečném (*Cydia pomonella*, Tortricidae). Ačkoliv není známa funkce tohoto satelitu, v rámci studie se ukázalo, že se transkribuje ve všech stádiích a tkáních. Zajímavé je, že po srovnání vzorků s pohlavními chromosomy Z a W se ukázalo, že CpSAT-1 byl více abundantní na chromosomu Z i přes to, že bychom ho čekali spíše

na heterochromatinem obohaceném chromosomu W (Věchtová et al., 2016). Jiným zkoumaným satelitem byl PiSat1 u *Plodia interpunctella* (Pyrallidae), který se na rozdíl od CpSAT-1 ukázal být nejvíce obohacený právě na chromosomu W (Dalíková et al., 2017) či satelit *TaqI* v genomu *Antheraea mylitta*, rozprostřeném po téměř celém genomu (Mahendran et al., 2006). Dohromady je u motýlů známo deset satelitních sekvencí. Pět z nich bylo popsáno před dostupností nástroje RepeatExplorer a pět jich bylo popsáno později. Satelity popsané s pomocí RepeatExploreru byly nalezeny u motýlů z čeledi Crambidae *Cydalima perspectalis* (Cper-Sat01), *Diatraea postlineella* (Dpos-Sat01, Dpos-Sat02) a *Ostrinia nubilalis* (Onub-Sat01, Onub-Sat02, Onub-Sat03 a Onub-Sat04) (Cabral-de-Mello et al., 2021).

Mobilní elementy či „selfish DNA“ jsou opakující se sekvence DNA, které mají schopnost se replikovat a pohybovat po genomu. Vyskytují se u většiny organismů a připisuje se jim vznik různých druhů mutací (Kidwell, 2005). Mobilní elementy tvoří například okolo 46 % lidského genomu, 90 % genomu kukuřice (Andrenacci et al., 2020) nebo 35 % genomu u bource morušového (*Bombyx mori*) (Osanai-Futahashi et al., 2008). U obratlovců bývá zpravidla větší množství mobilních elementů než u ostatních skupin živočichů. Vyplývá to z množství a délky intronů, které se nacházejí v genomech (Sela et al., 2010).

1.3 Evoluce pohlavních chromosomů

Pohlavní chromosomy se ve většině případů vyvinuly z autosomů, a to tak, že jeden z chromosomálních partnerů získal gen, který určoval pohlaví (Charlesworth, 1991). Na pohlavním chromosomu se dále shromažďovaly mutace výhodné pro jedno pohlaví a bylo vhodné, aby se tyto mutace dědily společně s genem určujícím pohlaví. Pokud na pohlavních chromosomech došlo k inverzi, selekce ji preferovala, protože se lokálně zablokovala rekombinace. Následkem byla ale i degenerace genů a šíření repetitiv (Charlesworth et al., 2005). Alternativně mohly pohlavní chromosomy vznikat z chromosomů B, a to tak, že se pohlavní chromosom buď s chromosomem B za určitých okolností pároval, nebo se z něj stal přes sex-determinující mutace (Clark a Kocher, 2019).

Na rozdíl od chromosomu W, který nemá s kým rekombinovat, u chromosomu Z v homogametickém pohlaví k rekombinacím dochází, ten se tak zbavuje nevyhovujících sekvencí, podobá se více autosomům a je konzervativnější (Sahara et al., 2012; Wright et al., 2016).

Meióza je u samic motýlů achiasmatická, to znamená, že nedochází k rekombinaci, což urychluje evoluci chromosomu W. K diferenciaci W a Z může tedy docházet ihned po jejich vzniku (Marec a Traut, 1993; Traut a Marec, 1997).

1.4 Chromosomální určení pohlaví

Pohlavní určení živočichů dělíme na více typů. Určení pohlaví u většiny živočichů determinuje jeden pár pohlavních chromosomů. Chromosomální typ určení pohlaví spočívá buď v homogametické samici a heterogametickém samci (XX/XY), nebo naopak (WZ/ZZ). Systém určení pohlaví pohlavními chromosomy vznikl v historii několikrát nezávisle na sobě (Bachtrog, 2006). V extrémních případech degenerace dochází i k tomu, že chromosom Y/W zcela vymizí a pohlaví je pak u těchto živočichů determinováno systémem Z0/ZZ a X0/XX (Blackmon a Demuth, 2014). Motýli jsou největší skupinou organismů, které mají samičí heterogamii. Během evoluce u nich došlo ke změně determinace pohlaví z původního systému Z/ZZ (samice/samec) na systém WZ/ZZ (Traut et al., 2007).

1.5 Pohlavní chromosomy motýlů

Počet motýlích chromosomů může být variabilní v rámci skupiny, ale za ancestrální stav se považuje $n = 31$. U motýlů občas dochází k fúzím chromosomů, či naopak rozpadům, a tudíž k redukci, nebo narůstání jejich počtu (Dasmahapatra et al., 2012). Chromosomy motýlů bývají většinou malé, mohou být od sebe těžko odlišitelné, obsahují heterochromatické bloky na chromosomu W a nemají lokalizované centromery (Sahara et al., 2012).

Dříve bylo studium chromosomů a repetitivních sekvencí náročné a drahé. Nebyla možnost sekvenovat dlouhé sekvence a skládání krátkých sekvencí bylo téměř nemožné. Dnes máme již nové, často levnější nástroje, které nám tuto práci usnadňují. Jedním z nich je nástroj NGS (next generation sequencing), díky kterému jsme schopni v krátkém časovém horizontu osekvenovat celé genomy. V případě repetice můžeme sekvenovat na nízkou úroveň pokrytí genomu („coverage“), což činí studování repetice cenově velmi dostupné. Po získání dat z NGS bývají data zpracována dalšími bioinformatickými nástroji, které umožňují identifikovat konkrétní sekvence repetitivní DNA. Takovým nástrojem je například RepeatExplorer, který nám pomáhá hlavně identifikovat a charakterizovat právě repetitivní sekvence DNA. Tyto nástroje nám otevírají cestu pro zkoumání přesnějšího složení chromosomu W, a to nejen u modelových organismů (Novák et al., 2013; Treangen a Salzberg, 2012).

Chromosom W se vyskytuje u 98 % samic motýlů a u většiny druhů je tvořen především heterochromatinem. V polyploidních interfázních jádrech tvoří mnohočetné kopie chromosomu W útvar zvaný sex chromatin (W chromatin) (Traut a Marec, 1996). Repetitivní sekvence, které již byly prokázány na chromosomu W, jsou například non-long terminal repeat (LTR) retrotransposony u bource morušového (*Bombyx mori*) a *Samia cynthia* (Kubo et al., 2001) či LTR a non-LTR retrotransposony u obaleče jablečného (*Cydia pomonella*) (Fuková et al., 2007). Ze satelitů jsou na chromosomu W přítomné například PiSAT1 (výhradně na chromosomu W), MBSAT1 (výhradně na chromosomech W a Z) nebo FR satDNA zkoumaný u *Spodoptera frugiperda* (Dalíková et al., 2017; Lu et al., 1994; Mandrioli et al., 2003).

Chromosom W nese málo genů. Příkladem těch, které se zde nachází, je feminizační faktor *Fem*, který byl zkoumán u *Bombyx mori* (Abe et al., 2010). Dalším příkladem je protein kódující gen *period* (*per*) u martináče *Antheraea pernyi*, ovlivňující cirkadiální rytmy. Gen má funkční kopii na chromosomu Z, ale homology na chromosomu W jsou transkripčně aktivní místa (Gotter et al., 1999).

Chromosomy Z a W se mohou lišit tvarem, velikostí a přítomností repetitivních sekvencí, ať už mobilních elementů nebo satelitů. Chromosom Z je na rozdíl od W tvořen především euchromatinem (Traut et al., 2013). Rozdíl mezi těmito chromosomy je také v rychlosti evoluce/degenerace. Chromosomy W se díky nemožnosti rekombinace v důsledku achiasmatické meiózy vyvíjejí mnohem rychleji než chromosomy Z. Bylo to zkoumáno a prokázáno například mezi druhy zavíječů, kdy se mezi nimi ukázala jen malá podobnost chromosomu W. Jako metoda sloužící k výzkumu byla použita CGH a FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) s malovací sondou na chromosom W (Vítková et al., 2007). Podobný experiment tuto skutečnost prokázal i mezi druhy skvrnopásníka jilmového (*Abraxas sylvata*) a skvrnopásníka angreštového (*Abraxas grossularita*) (Zrzavá et al., 2018).

1.6 Píd'alka podzimní

Jako zkoumaný organismus v této práci byl použit motýl píďalka podzimní (*Operophtera brumata*, Linnaeus 1758) z čeledi Geometridae. Píďalka podzimní je holoarktický herbivorní druh, který je rozšířen nejen po celé Evropě, ale také už se objevuje například v severní Africe a v Tunisku (Hausmann a Viidalepp, 2012; Mannai et al., 2017).

Píd'alka je běžným škůdcem a její larvy mohou způsobovat i rozsáhlou defoliaci vegetace, a to především u dubů (Vindstad et al., 2011).

Dospělá samice (viz obrázek číslo 1), která se vylíhne z kukly v půdě, vylézá v pozdním podzimu v noci na strom, kde kopuluje s okřídleným samcem (viz obrázek číslo 1). Po kopulaci vylézá do výšky, kde klade vajíčka, která se líhnou až na jaře (Briggs, 1957; Van Dongen et al., 1999). Po vylíhnutí se larvy (viz obrázek číslo 1) ihned živí listy stromů. Larvy se mohou spouštět na hedvábném vlákne, které si produkují. Vylíhnuté larvy mohou být přenášeny větrem na okolní stromy, tím se jejich lokalita rozšiřuje a může docházet k defoliaci velkých prostorů. Nakonec se spustí na zem, kde se zakuklí pomocí hedvábných vláken a přečkávají až do doby vhodné k páření (Varley et al., 1973).



Obr. 1: **a** - Okřídlený samec (autor neznámý), **b** - larva (autor: Patrick Clement), **c** - samice (autor: Patrick Clement) píd'alky podzimní (*Operophtera brumata*). Obrázky staženy z webové stránky: <https://commons.wikimedia.org/> dne 7.3.2022.

Heterochromatinové bloky jsou u píd'alky podzimní přítomné pouze u samic, a to na pohlavním chromosomu W_1 , zatímco u samců se s nimi neseťkáváme. Sex chromatin u píd'alky podzimní byl v některých kuklách zdvojený a u jiných vykazoval normální podobu, což, jak se ukázalo při pozdějším výzkumu, bylo způsobeno přítomností vícečetných pohlavních chromosomů ($W_1W_2W_3Z/ZZ$). Chromosom W_1 je u píd'alky podzimní původní a je tvořen heterochromatinem, zatímco W_2 a W_3 pravděpodobně ještě donedávna byly autosomy, u kterých ale následně došlo ke spojení jejich homologů s chromosomem Z , tudíž jsou tvořeny euchromatinem (Hejníčková et al., 2021). Obě pohlaví se tak liší v počtu chromosomů, u samice je počet chromosomů $2n = 30$ a u samců $2n = 28$.

2 Cíle práce

Cílem této práce bylo identifikovat a lokalizovat vybrané satelitní sekvence, které měly potenciál se vyskytovat na degenerovaném chromosomu W u píďalky podzimní (*Operophtera brumata*), o jejímž genomu prozatím není mnoho informací. Dílčí kroky zahrnovaly navržení primerů bioinformatickou analýzou k vybraným sekvencím, jejich následnou PCR amplifikaci, klonování a osekvenování PCR produktů, a nakonec jejich mapování na chromosomech píďalky podzimní.

3 Materiál a metody

3.1 Pokusný organismus

Dospělé samice píďalky podzimní byly nachytány Pavlem Potockým v Branišovském lese v Českých Budějovicích a následně ponechány v plastových krabičkách na vykladení. Vajíčka byla uložena do lednice, kde přezimovala. Následující rok v dubnu byla vajíčka přenesena do pokojové teploty. Po vylíhnutí byly housenky chovány na listech dubu letního (*Quercus robur*) a dubu zimního (*Q. petraea*) až do zakuklení. Z pohlavních orgánů kukel byly následně připraveny meiotické chromosomální preparáty.

3.2 Příprava chromosomálních preparátů

Většinou se u motýlů k přípravě meiotických chromosomálních preparátů používají larvy, u tohoto druhu je ale nutné použít kukly, protože u samičích i samčích larev se nenacházejí buňky ve stádiu pachytene, které se nejlépe hodí k lokalizaci zkoumaných sekvencí.

Kukla byla připevněna pomocí entomologického špendlíku k Petriho misce zalité parafínem, do které byl nalit vychlazený fyziologický roztok (0,9% NaCl, 0,042% KCl, 0,025% CaCl₂, 0,02% NaHCO₃). Následně byla kukla otevřena pomocí nástrojů tak, aby bylo možné odstranit střevo a tukovou tkáň. Z otevřené kukly byly vyjmuty ovarioly či testes, podle pohlaví jedince. Ovarioly byly následně přesunuty do fixačního roztoku. Testes byly nejprve 8 minut hypotonizovány v hypotonickém roztoku (0,075 M KCl) a následně přeneseny do fixáže Carnoy (směs ethanolu, chloroformu a kyseliny octové v poměru 6:3:1).

Mezitím byla připravena podložní skla (Superfrost, Menzel-Gläser, Německo), na která byly později vzorky přesouvány. Podložní sklo bylo namočeno do kyselého ethanolu (roztok 1% HCl v 96% ethanolu). Po vytažení bylo sklo dočištěno ubrouskem.

Ovarioly či testes byly ve fixáži po dobu 15 minut, a poté byly přeneseny na vyčištěné podložní sklo, na kterém byla připravena kapka vychlazené 60% kyseliny octové. V kapce kyseliny octové byly následně vzorky macerovány pomocí wolframových jehel tak, aby nebyly pod mikroskopem vidět žádné větší kusy tkání. Po macerování byla skla se vzorkem přenesena na histologickou plotýnku vyhřátou na 45 °C. Na skle byla popotahována kapka kyseliny octové s rozmacerovaným vzorkem rovnoměrně až do té doby, dokud kapka téměř nezmizela. Takto připravený preparát byl zkontrolován pod mikroskopem,

odvodněn v ethanolové řadě (70%, 80% a 100% ethanol) a po uschnutí uložen do -20 °C. Zbytek tkání byl zmražen v tekutém dusíku a později uchováván při teplotě -20 °C na následnou izolaci DNA.

3.3 Izolace DNA

Pro získání celkové DNA z organismů byla použita metoda založená na extrakci DNA pomocí hexadecyltrimethylammonium bromidu (CTAB) (Winnepenninckx et al., 1993). K získání DNA byly použity kukly či zbytky kukel po pitvě.

Nejdříve byl připraven extrakční pufr podle tabulky I. Tělo jedince bylo pomocí tloučku rozmělněno v 800 µl roztoku v 1,5ml zkumavce. Vzorek byl přes noc ponechán při 60 °C při třepání 300 rpm, aby došlo k degradaci bílkovin.

Tabulka I: Přehled chemikálií v extrakčním pufru.

Chemikálie	Výchozí koncentrace	Množství/10 ml
H ₂ O		5,33 ml
1 M Tris	100 mM	1 ml
5 M NaCl	1,4 M	2,8 ml
0.5 M EDTA, pH 8	40 mM	0,8 ml
CTAB	2%	0,2 g
Mercapthoethanol	0,2%	20 µl
Proteináza K (Macherey-Nagel, Německo)	0,1 mg/ml	50 µl

Po rozpuštění materiálu byl obsah zkumavky přenesen do větší zkumavky (2ml). Do zkumavky byl přidán stejný objem (800 µl) chloroformu. Vzorky byly následně míchány otáčením zkumavek po dobu 2 minut, a poté stočeny v centrifuze (10 minut, 14 000 rpm, 4 °C).

Po stočení zkumavek byla přepipetována horní fáze, obsahující DNA, do čisté zkumavky a krok s chloroformem byl zopakován. Nakonec byla horní fáze přepipetována do čisté 1,5ml zkumavky, následně bylo přidáno 5 µl RNAzy A (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a vzorek byl inkubován při 37 °C 30 minut. Po inkubaci byly ke vzorku

přidány 2/3 objemu isopropanolu a vše bylo lehce promícháno. Vzorek byl později ponechán zhruba 30 minut při pokojové teplotě, dokud se nevytvořila viditelná vysrážená DNA. Vzorek byl poté centrifugován 15 minut (14 000 rpm, 4 °C), aby se vytvořil pelet. Supernatant byl opatrně odstraněn a pelet byl pomocí centrifugace dvakrát promyt v 500 µl 70% ethanolu. Následně byl ethanol odebrán a osušený pelet byl rozpuštěn v MilliQ (20-50 µl podle velikosti peletu). Získané množství DNA bylo změřeno pomocí spektrofotometru Nanodrop 2000 a fluorimetru Qubit 3.0 (oba ThermoFischer Scientific, Waltham, USA) a případná fragmentace byla zkontrolována pomocí metody elektroforetické separace.

3.4 Gelová elektroforéza

Vzorky DNA, které byly získány pomocí popsaných metod, byly kontrolovány za pomoci gelové elektroforézy. Koncentrace použitých gelů byla, podle potřeby, 1% nebo 1,5% agaróza v TAE (Tris-Acetate-EDTA: 40 mM Tris, 20 mM kyseliny octové, 1 mM EDTA; pH 8). Do vzniklých jamek byl napipetován nejprve velikostní marker (100 bp – DNA ladder 50 µg) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Německo) a následně vzorky s barvou Gel Loading Dye Blue (New England BioLabs, USA). Doba, po kterou elektroforéza běžela, závisela na velikosti fragmentů vzorků. Obvykle se pohybovala mezi 30 až 45 minutami při 100 V.

Po skončení elektroforézy byl agarózový gel obarven v roztoku ethidium bromidu po dobu 15 minut. Po skončení tohoto procesu byl gel vyfocen pod UV zářením a velikost fragmentů byla následně změřena porovnáním proužků v PCR produktu s velikostním markerem, složeného z fragmentů o známé velikosti.

3.5 Získání sekvencí a navrhování primerů

Sekvence satelitní DNA mi byly poskytnuty kolegyní RNDr. Martinou Hejníčkovou, která prováděla jejich analýzu pomocí programu RepeatExplorer (Novák et al., 2013). První satelitní sekvence byly získány analýzou veřejně dostupného genomu pídalky podzimní (SRA: SRP049098). Následně byly analyzovány naše genomy píd'alek, a to genomy tří samečů a tří samic z různých rodin sekvenovaných na 1x pokrytí genomu na platformě Illumina firmou Novogene (Peking, Čínská lidová republika).

Primery byly navrženy programem Geneious (verze 11.1.4) (Biomatters, Auckland, Nový Zéland), a to tak, že konsensus sekvence daného satelitu byl nejprve zkopírován, aby tvořil dimer, a pak byly vybrány primery, které amplifikovaly oblast přes hranici monomeru. Díky tomu se mohly tvořit jen produkty, které pocházely z tandemové repetice. Syntézu primerů prováděla firma Generi Biotech (Hradec Králové).

3.6 PCR

Metoda PCR slouží k amplifikaci vybraných úseků DNA za pomoci krátkých úseků DNA (primerů) a termostabilní DNA polymerázy, která během 30 cyklů sestávajících z denaturace, nasednutí primerů a elongace syntetizuje nové kopie vybraného úseku. PCR byla použita k amplifikaci vybraných satelitů z genomové DNA (gDNA), k ověření přítomnosti insertu v plasmidech po klonování PCR produktů a ke značení sond pro FISH.

K amplifikaci jednotlivých satelitů byly použity specifické primery, pro ověření přítomnosti a velikosti insertů po klonování byly použity univerzální primery M13 (Generi Biotech, Hradec Králové). Složení primerů můžeme vidět v tabulce číslo II.

Tabulka II: Použité primery.

Název primeru	Sekvence	Nasedací teplota	Očekávaná velikost produktu
Primer M13 F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	60 °C	Dle insertu
Primer M13 R	CAGGAAACAGC TATGAC	60 °C	Dle insertu
Primer CL49 F	CTCTCCAGTCGACCTGCAAC	60 °C	374 bp
Primer CL49 R	GGGATGGTGTTCGGCTACA	60 °C	374 bp
Primer CL175 F	TCATGTCCGAAAGTTTGAAAAGT	60 °C	152 bp
Primer CL175 R	TCTGCTGGCATTTTAACGTGAG	60 °C	152 bp
Primer CL219 F	AGGCAATCAAAAGGGAGGGC	60 °C	171 bp
Primer CL219 R	CAAAAATGCTTGTGGACATCAACT	60 °C	171 bp

3.6.1 Amplifikace satelitní DNA pomocí PCR

PCR reakce pro amplifikaci satelitní DNA z gDNA byla smíchána z látek uvedených v tabulce číslo III.

Tabulka III: Přehled chemikálií v PCR reakci.

Látky	1 reakce (25 μ l)
Voda	12,8 - x
ExTaq pufr (10x)	2,5 μ l
Primer F (10 μ M)	2,5 μ l
Primer R (10 μ M)	2,5 μ l
dNTPs (0,5 nM dATP, dCTP, dGTP; 0,1 mM dTTP) (TaKaRa, Japonsko)	2 μ l
ExTaq polymeráza (10 U/ μ l) (TaKaRa, Japonsko)	0,2 μ l
gDNA templát	x (1 ng)

Kvůli odhalení případné kontaminace byla vždy spolu s jednotlivými vzorky namíchána i negativní kontrola, která neobsahovala templátovou DNA. Po namíchání všech reakcí byly PCR zkumavky vloženy do cycleru (Biometra, Německo). Profil PCR byl pro všechny tři satelitní sekvence stejný (viz tabulka IV).

Tabulka IV: Program PCR pro amplifikaci satelitní DNA z gDNA.

Denaturace 94 °C	3 minuty
Denaturace 94 °C	30 sekund
Annealing 60 °C	30 sekund
Extenze 72 °C	30 sekund – zpět na krok 2 (29x)
Finální extenze	3 minuty
4 °C	pořád

Po skončení PCR reakce byly vzorky kontrolovány pomocí gelové elektroforézy a případné měření koncentrace probíhalo na fluorimetru Qubit 3.0 či Nanodropu 2000. Po amplifikaci byla DNA o očekávané délce získána metodou izolování DNA z agarózového gelu pomocí kitu ZymocleanTM Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, USA), kdy bylo postupováno

podle přiloženého návodu výrobce, nebo byla z gelu přímo vymačkána pomocí parafilmu, přenesena pipetou (2 μ l) a následně použita jako templát do reamplifikační PCR reakce.

3.7 Klonování a sekvenace

Klonování a následné osekvenování bylo použito, abychom přesně věděly, s jakou sekvencí pracujeme. Ke klonování byly použity kompetentní buňky bakterie *E. coli*, kmen DH5 α . Získané plasmidy s integrovaným insertem byly poté použity na sekvenování a jako templát pro PCR značení sond pro FISH.

Živné médium pro bakterie bylo připraveno z práškového LB média (20 g/l) (Duchefa Biochemie, Nizozemsko), agaru (20 g/l) (VWR Life Science, USA) a MilliQ vody. Po autoklávování a ochlazení bylo přidáno antibiotikum ampicilin na finální koncentraci 100 μ g/ml. Po ztuhnutí bylo na každou misku s živným médiem napipetováno 20 μ l 122mM X-Galu (5-bromo-4-chloro-3-indonyl- β -D-galactoside) a 70 μ l 100mM IPTG (isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid). Vše bylo rozetřeno sterilní zahnutou skleněnou tyčinkou (tzv. hokejkou) a ponecháno k utuhnutí.

3.7.1 Ligace

K ligaci byl využit kit pGEM-T Easy Vector Systems (Promega, USA). Bylo pracováno podle návodu výrobce, množství DNA v ligační reakci bylo 50 ng. Reakční směs byla inkubována přes noc v lednici (4 $^{\circ}$ C).

3.7.2 Transformace kompetentních buněk pomocí teplotního šoku (heat shock)

Kompetentní buňky (50 μ l) byly vyndány z -80 $^{\circ}$ C a rozehráty v ruce. Poté byly uloženy na dobu zhruba 10 minut na led. Následně k nim bylo napipetováno 2,5 μ l ligační reakce. Po promíchání byla zkumavka s bakteriemi opět umístěna na led na dobu 30 minut. Poté byly buňky po dobu 90 sekund inkubovány při 42 $^{\circ}$ C a pak znovu přesunuty na led na 1-2 minuty. Následně bylo do směsi přidáno 800 μ l sterilního LB a směs byla zahřívána v termobloku při třepání na 37 $^{\circ}$ C po dobu 45 minut. Pak byla směs centrifugována při 7 500 rpm 30 sekund, většina supernatantu byla odstraněna a pelet byl resuspendován ve zbytku LB média. Získaná směs byla rozdělena na poloviny, které byly napipetovány na dvě misky s potravou, rozetřeny sterilní hokejkou a ponechány ve 37 $^{\circ}$ C do druhého dne.

3.7.3 Testování přítomnosti insertu pomocí PCR a přenesení na nové médium

Po vyndání misek ze 37 °C byly narostlé kolonie se zaklonovaným insertem vyhodnoceny a nadějně samostatné bílé klony (tj. klony patrně obsahující insert) byly pomocí sterilního párátko přeneseny na připravené čisté misky s LB médiem a ampicilinem. Z každé misky, pokud zde bylo dostatek klonů, bylo vybráno zhruba 10 kolonií. Misky byly utěsněny parafilmem a byly vloženy do 37 °C do druhého dne.

Pro ověření délky insertu byla provedena amplifikační PCR reakce s univerzálními primery M13 a OneTaq polymerázou (New England BioLabs, USA) (složení reakce v tabulce číslo V). DNA do reakce byla přidána omytím párátko s nabranou kolonií v PCR reakci. Následovala kontrola gelovou elektroforézou. Program PCR je v tabulce číslo VI.

Tabulka V: Složení PCR reakce s OneTag polymerázou.

Látky	1 reakce (25 µl)
H ₂ O	12,7 µl
1x OneTaq pufr (New England BioLabs, USA)	5 µl
dNTPs	2 µl
Primer M13 F (10 µM)	2,5 µl
Primer M13 R (10 µM)	2,5 µl
OneTaq polymeráza (0,04 U)	0,2 µl
DNA	variabilní

Tabulka VI: Program PCR reakce pro testování klonů na přítomnost a velikost insertu.

94 °C	3 minuty
94 °C	30 sekund
57 °C	30 sekund
72 °C	1 minutu (od kroku 2 - 29x)
72 °C	5 minut
4 °C	Pořád

3.7.4 Inokulace

Další den byly vybrané kolonie z přeočkovaných misek inokulovány do 2 ml tekutého LB média se 200 µg ampicilinu. Zkumavky byly přes noc inkubovány a třepány při 37 °C.

Plasmidy byly izolovány kitem NucleoSpinPlasmid (MACHEREY-NAGEL, Německo). Bylo postupováno podle protokolu výrobce a konečný produkt byl rozpuštěn do 50 µl elučního pufru. Vzorky byly odeslány na sekvenaci (Seqme, Dobříš). Sekvenování bylo provedeno s využitím univerzálních primerů M13 ve směru forward i reverse.

3.8 Lokalizace satDNA na chromosomech pomocí FISH

3.8.1 Značení sondy pomocí PCR

Sondy, značené v případě přímé FISH fluorochromem Cy3, byly připraveny pomocí PCR, kdy jako templát byla použita plasmidová DNA s vloženou sekvencí příslušného satelitu. Primery byly použity specifické, podle toho, jaký satelit jsme chtěly mapovat. PCR byla provedena podle protokolu z tabulky VII. Složení PCR reakcí je uvedeno v tabulce číslo VIII.

Tabulka VII: Program PCR pro značení sond.

Denaturace 94 °C	30 sekund
Annealing 60 °C	30 sekund
Extenze 72 °C	1 minuta 15 sekund – zpět na krok 2 (29x)
Finální extenze 72 °C	3 minuty
4 °C	pořád

Tabulka VIII: Složení PCR reakce.

Látky	1 reakce (25 µl)
H ₂ O	13,4 – x
ExTaq pufr	2,5 µl
dNTPs pro značení (0,25 mM dATP, dCTP, dGTP a 0,09 mM dTTP, 0,16 mM dUTP – Cy3) (Jena Bioscience, Německo)	4 µl
Primer R	2,5 µl
Primer F	2,5 µl
ExTaq polymeráza	0,125 µl
Plasmid DNA	x

3.8.2 Přímá FISH

Přímá FISH je metoda, která slouží k lokalizaci satelitů přímo na chromosomech za pomoci sond značených fluorochromem se Cy3. Práce byla, kvůli fotosenzitivě sondy, prováděna v přitmě. Přímá FISH byla použita jen v případě satelitu CL49 pro získání předběžných výsledků.

Po získání sond následovala centrifugace hybridizačních mixů (300 ng sondy + 25 µg DNA z lososích spermíí + 1/10 objemu 3M octanu sodného + 2,5x objemu 100% studeného ethanolu) při 14 000 rpm, při 4 °C 15 minut. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant. Do zkumavky bylo přidáno 400 µl 70% studeného ethanolu a centrifugace byla následně opakována za stejných podmínek po dobu pěti minut. Po druhé centrifugaci byl supernatant opět odpipetován a pelet byl ponechán na vzduchu k úplnému vysušení. Poté byl pelet rozpuštěn v 5 µl deionizovaného formamidu (FA) a ponechán v termobloku při 37 °C na 30 minut s konstantním třepáním. Po rozpuštění peletu bylo do mixu přidáno 5 µl 20% dextran sulfátu v 4x SSC ohřátého na 37 °C a směs byla vortexována. Následovalo pětiminutové denaturování mixu při 90 °C, po kterém byly zkumavky urychleně přeneseny na led.

Mezitím probíhala příprava skel s preparáty. Po vytažení z mrazáku (-20 °C) byly preparáty nejprve za pomoci ethanolové řady odvodněny. Každé sklo bylo na dobu 30 sekund vloženo do 70% ethanolu a následně do ethanolů 80% a 100% pokojové teploty. Po odvodnění

byly preparáty ponechány na vzduchu, dokud nebyly úplně suché. Poté byly preparáty zapečeny při 65 °C 30 minut.

Na každý preparát bylo naneseno 100 µl 70% deionizovaného formamidu v 2x SSC. Preparáty byly přikryty krycím sklem 24x50 mm a denaturovány 3,5 minuty v termobloku při 68 °C. Po denuraci byla krycí skla odstraněna a preparáty byly vloženy na 1 minutu do kyvety s vychlazeným 70% ethanolem (-20 °C). Následně byly preparáty odvodněny v 80% a 100% ethanolu pokojové teploty po dobu 30 sekund a ponechány k oschnutí.

Na každý preparát bylo naneseno 10 µl zdenaturované hybridizační směsi a následně bylo vše opatrně přikryto krycím sklem o velikosti 24x32 mm. Byly vytlačeny bubliny a okraje krycích skel byly překryty lepidlem Rubber cement (Marabu, Německo). Následovala třídenní inkubace při 37 °C ve vlhké komůrce (krabička s papírovým ubrouskem namočeným do 2x SSC).

Po třech dnech byly preparáty vytaženy a lepidlo bylo odstraněno. Následně byly preparáty při teplotě 25 °C promývány 2x 5 minut ve 2x SSC, 2x 5 minut v 1x SSC, 1x 1 minutu v 1x PBS a 1x 1 minutu v MilliQ vodě s 1% Kodak PhotoFlo. Po uschnutí bylo na každý preparát naneseno 25 µl DABCO (Sigma-Aldrich, USA) s DAPI (o finální koncentraci 1 µg/µl) (Sigma-Aldrich, USA). Preparát byl opatrně přikryt krycím sklem o velikosti 25x40 mm tak, aby nevznikly bubliny. Přebytečná kapalina byla vymačkána pomocí filtračního papíru a okraje krycího skla byly zalepeny lakem na nehty.

3.8.3 Lokalizace satDNA na chromosomech pomocí nepřímé FISH

FISH s nepřímo značenou sondou používáme na lokalizaci satelitů přímo na chromosomech. Neznačenou sondu je potřeba detekovat látkou, která má afinitu k sondě. V tomto případě byla použita sonda značená biotinem, na kterou byl později navázán streptavidin značený Cy3.

Nejprve byly připraveny hybridizační směsi se sondami, které obsahovaly 50 ng sondy, 2,5 µl DNA z lososích spermií, 1/10 objemu octanu sodného a 2,5x objemu studeného 100% ethanolu. Další postup prvního dne byl stejný, jako u přímé FISH.

Na konci, po přípravě preparátů a hybridizačních roztoků se sondami, bylo na každé sklo napipetováno 10 µl tohoto roztoku a vše bylo zakryto krycím sklem. Okraje krycích skel

byly zalepeny lepidlem Rubber cement, aby nedocházelo k odpařování. Takto připravené preparáty byly vloženy do vlhké komůrky a přes noc byly ponechány k hybridizaci při 37 °C.

Druhý den byla skla s preparáty vyndána ze 37 °C, opatrně bylo sundáno lepidlo Rubber cement a krycí skla byla odstraněna. Ihned poté byly preparáty vloženy na 5 minut do kyvety s prvním roztokem, a to do 2x SSC, který byl vyhřátý na 42 °C. Následně byly přesunuty do druhé kyvety s 2x SSC za těch samých podmínek. Poté byly preparáty přesunuty postupně do kyvet s roztoky vyhřátými na 42 °C a za stálého míchání byly promývány v následujících krocích: dvakrát byly promyty v 0,1x SSC po dobu 5 minut a jednou ve 2x SSC po dobu 5 minut. Následně v roztocích za pokojové teploty: jednou v 2x SSC po dobu 10 minut za stálého míchání a poté v roztoku WBB (0,1% Tween, 1% odtučněné mléko (Difco™ Skim Milk, Becton Dickson and company, Francie), 2x SSC) po dobu 15 minut. Poté bylo 100 µl WBB se streptavidinem/Cy3 (9 ng/µl) napipetováno na připravená skla, zakryto krycím sklem a ve vlhké komůrce ponecháno při 37 °C po dobu 1 hodiny, aby došlo k vazbě proteinů. Po hybridizaci byla krycí skla odstraněna, 3x promyta v roztoku WBB při 45 °C a míchání.

Následně bylo doprostřed preparátu napipetováno 25 µl roztoku DAPI + DABCO a opatrně překryto krycím sklem 25x40 mm tak, aby nevznikly bubliny. Přebytečná kapalina byla vymačkána pomocí filtračního papíru a kraje krycího skla byly zalepeny vrstvou laku na nehty. Po skončení byly vzorky buď ihned mikroskopovány, nebo byly uloženy do zatemněné krabičky do lednice (4 °C).

3.9 Analýza preparátů

Všechny preparáty byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem Zeiss Axioplan 2 pod objektivy 63x a 100x. Po vyfocení preparátů černobílou kamerou Olympus CCD XM10 za pomoci programu cellSence Standart 1.9 (Olympus, Německo), byly jednotlivé fotografie skládány a upravovány v programu Adobe Photoshop CS4 (verze 11.0).

4 Výsledky

4.1 Bioinformatická analýza

Komparativní analýza provedená pomocí RepeatExploreru mou kolegyní RNDr. Martinou Hejníčkovou ukázala pět dosud neznámých satelitů (viz tabulka číslo IX). Tři z těchto satelitů byly v této práci zaklonovány a lokalizovány v genomu píďalky podzimní, a to satelity CL49, CL175 a CL219.

Tabulka IX: Výsledky komparativní analýzy RepeatExploreru (RE).

Klastr	Klasifikace RE*	Délka monomeru	% genomu	Poměr samice/samec **	Očekávané umístění
CL49	Satelit LC	374 bp	0,140	0,822	Obohacené na Z
CL55	Satelit HC	62 bp	0,130	0,776	Obohacené na Z
CL156	Satelit LC	38 bp	0,032	1,535	Obohacené na W
CL175	Satelit LC	152 bp	0,026	0,875	Obohacené na Z
CL219	Satelit LC	171 bp	0,019	1,516	Obohacené na W

*LC = low confidence, HC = high confidence, klasifikace programu TAREAN v Repeat Exploreru

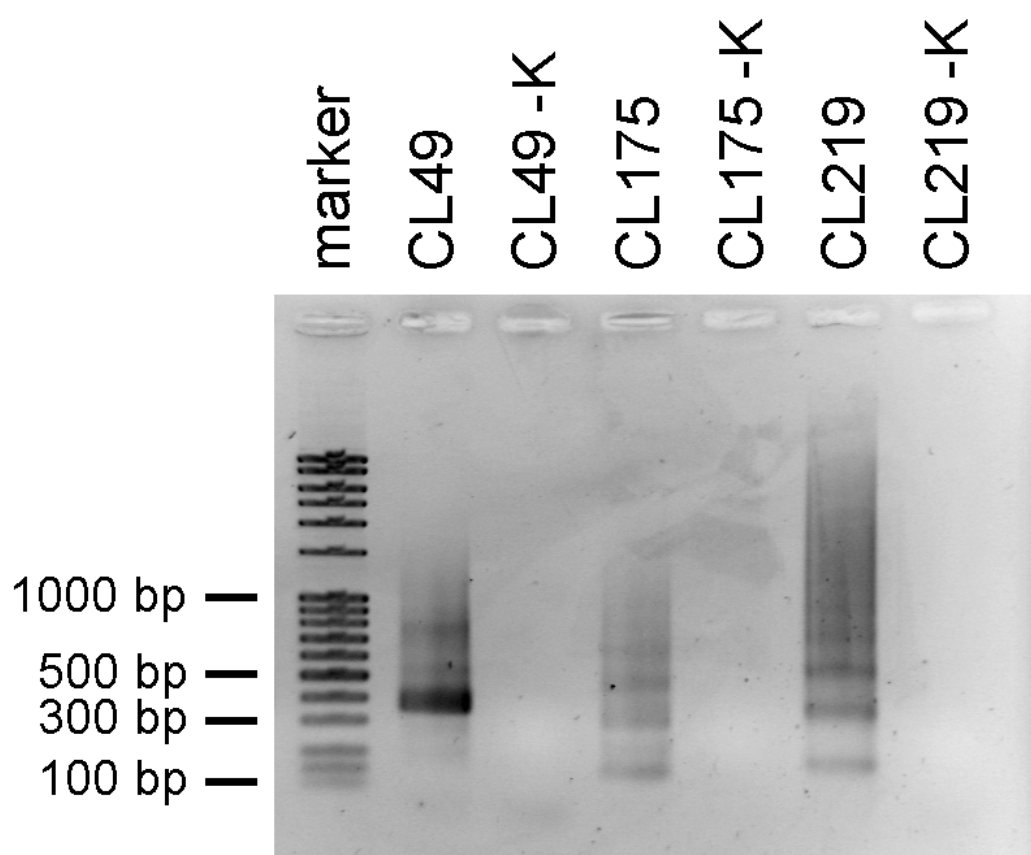
** poměr počtu čtení (readů) obsahujících sekvenci daného satelitu

4.2 PCR

Nejprve byly získány primery, které byly následně použity do PCR reakcí. Pro ověření správnosti a přítomnosti daných satelitních sekvencí byla použita metoda PCR, přičemž pokaždé byla provedena také negativní kontrola bez DNA. PCR byla prováděna u všech primerů na více vzorcích za jiné nasedací teploty, která byla postupně upravována na nejvíce vyhovující pro každý satelit zvlášť (viz tabulka X). Kromě teploty bylo upravováno i množství templátové gDNA, které bylo do reakce pipetováno od 0,1 ng do 1 ng. Nakonec bylo použito množství 1 ng (obrázek číslo 2).

Tabulka X: Satelity a ideální nasedací teplota jejich primerů.

Název satelitu	Nasedací teplota	Očekávaná velikost PCR produktu
CL49	60 °C	374 bp
CL175	60 °C	152 bp
CL219	60 °C	171 bp



Obr. 2: Výsledky PCR amplifikace vybraných satelitů. **-K** označuje negativní kontrolu.

Po extrakci z gelu, zaklonování a kontrolní sekvenaci byly plasmidy se správnými inserty použity na výrobu značených sond pro metodu FISH.

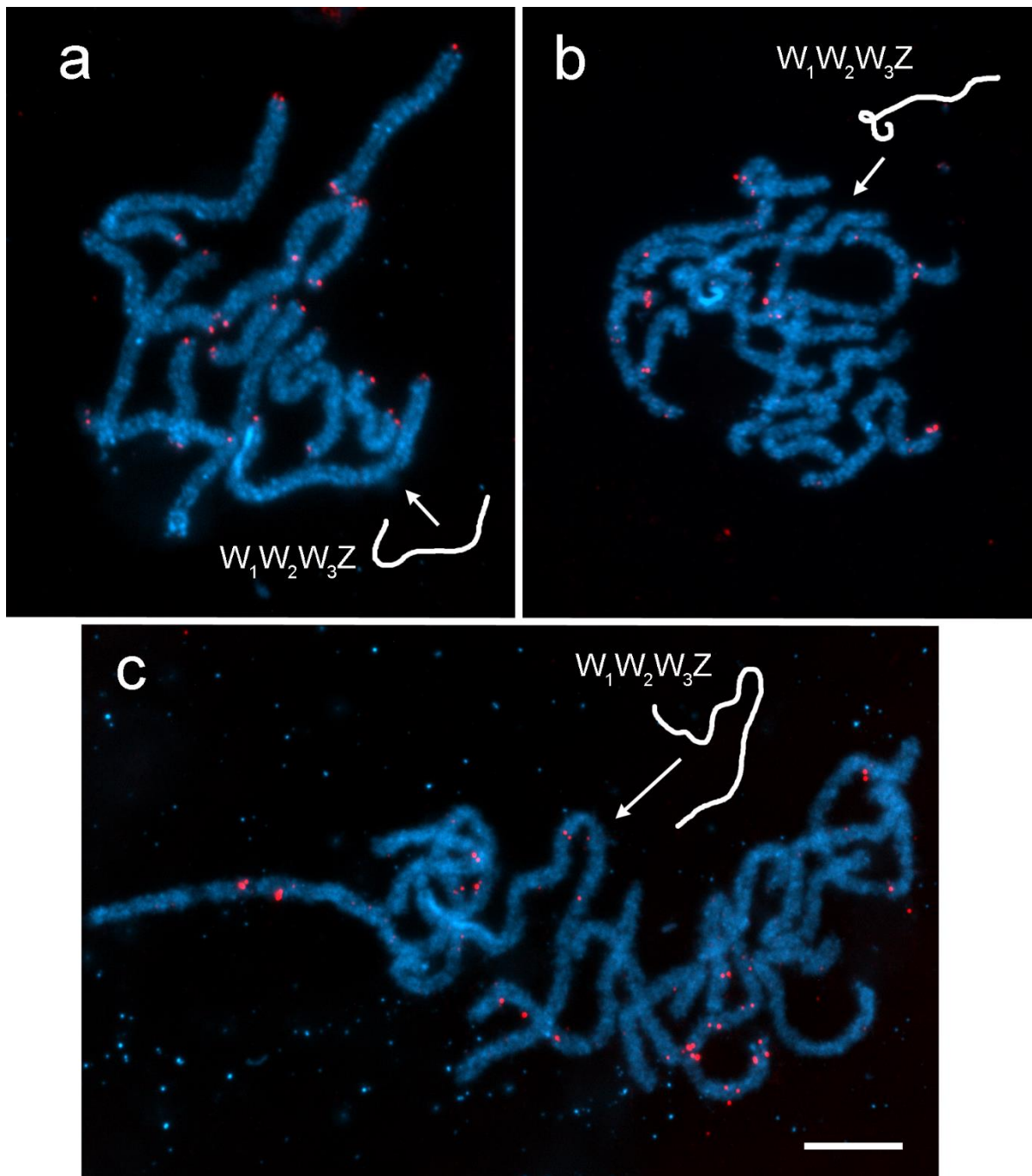
4.3 Lokalizace vybraných satelitů

Distribuce vybraných satelitních sekvencí v genomu byla analyzována pomocí FISH na chromosomálních preparátech z ovariol a testes kukel píďalky podzimní v pachytenní fázi meiózy I. Samčí preparáty byly používány hlavně pro optimalizaci FISH, pro vlastní lokalizaci satelitu jsou méně informativní, protože neobsahují chromosomy W. Samičí pohlavní chromosomy tvoří tetraivalent $W_1W_2W_3Z$, který lze ve většině jader dobře rozpoznat díky heterochromatinizovanému W_1 .

Jako první byl mapován satelit CL49 pomocí přímé i nepřímé FISH na samičí preparát (obrázek číslo 3). Po srovnání výsledků přímé a nepřímé FISH bylo rozhodnuto, že následná mapování budou prováděna pomocí nepřímé FISH, protože hybridizační signál byl silnější a stálější. CL49 byl podle analýzy z našich satelitů nejabundantnější a měl se více vyskytovat u samce na pohlavním chromosomu Z. Jak se ale ukázalo, satelit CL49 hybridizoval téměř výhradně do subtelomerických oblastí všech chromosomů, což u motýlích satelitů není běžné. Na obou koncích tetraivalentu pohlavních chromosomů se nacházel jeden hybridizační signál, bez použití malovací sondy na W nebo CGH však nebylo možné jednoznačně určit, jestli je lokalizován na chromosomu Z nebo na některém z chromosomů W.

Další mapovanou sekvencí byl satelit CL175 (obrázek číslo 3), který měl být, stejně jako u satelitu CL49, obohacen především u samce, tedy opět na chromosomu Z. Po zamapování se ale ukázalo, že satelit je rozšířen po celém genomu a preferenci na pohlavní chromosom nemá.

Posledním zaklonovaným satelitem byl CL219, který měl, na rozdíl od předešlých satelitů, podle analýzy RepeatExploreru (poměr samice a samce = 1,516) šanci se vyskytovat spíše u samice a být obohacen na chromosomu W. Satelit CL219 byl méně abundantní než CL175, ale opět byl jeho výskyt různě roztroušen po celém genomu (viz obrázek číslo 3). Na tetraivalentu pohlavních chromosomů se nachází několik slabých signálů, u kterých opět nelze s jistotou určit, na kterém chromosomu se nacházejí. Tento satelit byl výrazně obohacen na jednom autosomálním bivalentu.



Obr. 3: Výsledky lokalizace vybraných satelitních sekvencí pomocí FISH na samičích chromosomálních preparátech ve fázi pachytene u pídalky podzimmní. **a** – satelit CL49, **b** – satelit CL175, **c** – satelit CL219. Červenou barvou jsou značeny sondy, modrou barvou jsou obarveny chromosomy fluorescenčním DAPI. Šipkami u nákrešů jsou označena místa, kde se nachází tetraivalent $W_1W_2W_3Z$. Měřítka je 10 μm .

Ačkoliv všechny vybrané satelitní sekvence měly potenciál být obohacené na pohlavních chromosomech, neobjevil se zde významně ani jeden. V souhrnné tabulce číslo

XI můžeme vidět rozdíl mezi původním očekáváním umístění satelitů podle RepeatExploreru a jaké umístění satelitů nakonec bylo.

Tabulka XI: Souhrnná tabulka umístění zkoumaných satelitů.

Satelit	Očekávané umístění	Skutečné umístění
CL49	Obohacené na Z	Pravděpodobně subtelomerické oblasti všech chromosomů, přítomen v malé míře v koncových oblastech na tetraivalentu $W_1W_2W_3Z$
CL175	Obohacené na Z	Roztroušený po genomu, nepřítomen na tetraivalentu $W_1W_2W_3Z$
CL219	Obohacené na W	Roztroušený po genomu, přítomen v malé míře na tetraivalentu $W_1W_2W_3Z$, obohacený na jednom autosomálním bivalentu

5 Diskuze

Na začátku této práce nebylo o genomu píďalky podzimní mnoho informací. Měly jsme ale k dispozici práci, ve které byly zkoumány pohlavní chromosomy píďalky podzimní, přičemž se ukázalo, že zde došlo ke vzniku tetraivalentu $W_1W_2W_3Z$. Tento tetraivalent se skládá z původního chromosomu W_1 a nově vzniklých chromosomů W_2 a W_3 (Hejníčková et al., 2021) a naším cílem bylo zjistit, které satelity se zde nacházejí. Původní W_1 bylo na preparátech obarvených DAPI nejvíce viditelné, což nám ukázalo, že se zde nachází mnoho A-T bohatých sekvencí.

Prvním krokem této práce byla bioinformatická analýza veřejně přístupného genomu (Derks et al., 2015) a následně osekvenovaných genomů šesti jedinců RNDr. Martinou Hejníčkovou, přičemž bioinformatická analýza ukázala dohromady pět satelitů, jež měly potenciál být obohacenými na pohlavních chromosomech.

Dosud bylo satelitních sekvencí v motýlích genomech nalezeno málo. Satelitní sekvence mají tendenci se nacházet v heterochromatinu. Velké bloky heterochromatinu bývají u motýlů vzácné, a tudíž by to mohlo vysvětlovat jednu z příčin, proč je hledání nových satelitů náročné. Dalším z důvodů je, že dříve bylo hledání satelitních sekvencí složité a drahé, ale nyní již máme bioinformatické nástroje, které nám tuto práci ulehčují a dá se očekávat, že známé satelitní sekvence budou poměrně rychle přibývat (Novák et al., 2013; Palomeque a Lorite, 2008; Treangen a Salzberg, 2012)

Kromě této práce bylo díky RepeatExploreru u motýlů nalezeno a následně také mapováno pouze několik málo satelitů, a to konkrétně jeden satelit (Cper-Sat01) u *Cydalima perspectalis* s délkou monomeru 2 244 bp, dva satelity (Dpos-Sat01, Dpos-Sat02) u *Diatraea postlineella* s délkami monomerů 1 391 bp a 1 380 bp a čtyři satelity (Onub-Sat01, Onub-Sat02, Onub-Sat03, Onub-Sat04) u *Ostrinia nubilalis* s délkami monomerů 528 bp, 453 bp, 957 bp a 123 bp. Satelit Cper-Sat01 a satelity Dpos-Sat01 a Dpos-Sat02 mají na skupinu hmyzu překvapivě dlouhou délku. Satelitní sekvence u hmyzu mají obvykle do 600 bp. Satelity u *Cydalima perspectalis* a *Ostrinia nubilalis* byly obohaceny na chromosomu W, jak se původně očekávalo, naproti tomu satelity u *Diatraea postlineella* na chromosomu W obohaceny nebyly. Kromě chromosomu W byly satelity roztroušené i jinde po genomu (Cabral-de-Mello et al., 2021). Námi nalezené satelity byly o poznání kratší, jejich délka se pohybovala od pouhých 38 bp do 374 bp (viz tabulka číslo IX v kapitole 4 Výsledky). V dalším případě byl RepeatExplorer využit ke hledání repetitivních sekvencí mezi

jednotlivými druhy bělásků, a to u běláška zelného (*Pieris brassicae*), běláška řepkového (*Pieris napi*) a běláška řepového (*Pieris rapae*). Zde byly nalezeny dohromady čtyři satelity. Tři satelity se vyskytovaly u běláška zelného (CL04, CL26, CL183) a jeden u běláška řepkového (CL187). Délky těchto satelitů se pohybovaly mezi 109 bp a 235 bp. Z těchto nalezených satelitů byly podle RepeatExploreru na chromosomu W obohaceny satelity CL26 u běláška zelného a CL187 u běláška řepkového. Ostatní satelity se vyskytovaly v menší míře na autosomech obsahujících heterochromatin (Pinkrová, 2020).

V době, kdy ještě nebyl k dispozici RepeatExplorer a jiné novější bioinformatické nástroje, bylo u motýlů nalezeno pět satelitů, a to MBSAT1 u *Mamestra brassicae* (Noctuidae), CpSAT-1 u *Cydia pomonella* (Tortricidae), PiSat1 u *Plodia interpunctella* (Pyralidae), Taq1 u *Antheraea mylitta* (Saturniidae) a FR satDNA u *Spodoptera frugiperda* (Noctuidae) (Dalíková et al., 2017; Lu et al., 1994; Mahendran et al., 2006; Mandrioli et al., 2003; Věchtová et al., 2016). Společným znakem všech těchto satelitů, a to jak nově objevených či starších, je jejich bohatost na A-T sekvence (Cabral-de-Mello et al., 2021).

Z našich pěti nově nalezených satelitů byly z časových důvodů zkoumány pouze tři (CL49, CL175 a CL219). Pomocí PCR analýzy bylo ověřeno, že se skutečně jedná o tandemové repetice tak, jak předpovídal RepeatExplorer. Na základě komparativní analýzy samčích a samičích genomů se všechny zkoumané satelitní sekvence měly nacházet u obou pohlaví, ale vyskytovat se měly i na pohlavním chromosomu W nebo Z. Satelity CL49, CL55 a CL175 by měly být obohaceny na chromosomu Z a satelity CL156 a CL219 na chromosomu W. Analýza míst, kam si satelity skutečně sedají byla provedena fluorescenční *in situ* hybridizací.

Po zamapování satelitů do genomu se ukázalo, že satelity se vyskytovaly v podobě klastrů, které byly rozmístěny různě po genomu. Satelity CL175 a CL219 se vyskytovaly pouze na některých chromosomech, zatímco CL49 se vyskytoval na všech chromosomech. Co se týče pohlavních chromosomů, několik málo signálů se vyskytovalo na tetravalentu u satelitů CL49 a CL219. To, že se satelity na pohlavních chromosomech téměř vůbec nevyskytovaly je zajímavé, jelikož původní chromosom W₁ je u tohoto organismu nejbohatší místo na heterochromatin, u kterého bychom výskyt satelitních sekvencí očekávaly. Dalším překvapením byl satelit CL49, který se ukázal být nejspíš ve všech subtelomerických oblastech, což dosud žádný motýlí satelit neudělal.

Některé z předešlých známých satelitů se právě na chromosomu W vyskytovaly (CL26, CL187, Onub-Sat01, Onub-Sat02, Onub-Sat03, Onub-Sat04, Cper-Sat01, MBSAT1, PiSat1 a FR satDNA). Výskyt satelitů v genomech motýlů může být v podobě klastrů nebo roztroušených signálů, satelity se mohou vyskytovat jednotlivě po celém genomu, či mohou být rozmístěny na všech, nebo pouze na některých chromosomech (Cabral-de-Mello et al., 2021; Dalíková et al., 2017; Lu et al., 1994; Mandrioli et al., 2003; Pinkrová, 2020; Věchtová et al., 2016).

Na tetraivalentu píďalky podzimní a konkrétně chromosomu W_1 se tedy mohou vyskytovat buď sekvence, které nebyly zamapovány, nebo může být chromosom tvořen něčím úplně jiným. Jednou z možností je, že W_1 může být tvořen mikrosatelity, které jsme ale z analýzy RepeatExplorerem nedostaly, jelikož byly záměrně bioinformaticky zakryty a nebyly brány v úvahu. Další z pravděpodobných věcí, kterým by chromosom W_1 mohl být tvořen, jsou mobilní elementy. Mobilní elementy na pohlavním chromosomu W byly prokázány již u několika druhů, a to například u *Cydia pomonella* (Fuková et al., 2007), *Ephestia kuehniella* (Traut et al., 2013) a *Bombyx mori* (Abe et al., 2005).

Rozdíl mezi výsledky komparativní bioinformatické analýzy a zamapování satelitů pomocí FISH může být způsoben např. tím, že námi použitá FISH nebyla dostatečně citlivá na detekci případných krátkých klastrů satelitní DNA. Řešením by bylo použít zesílení signálu pomocí antistreptavidinu, protilátky proti streptavidinu, kterým se detekuje sonda značená biotinem, a následnou inkubací se streptavidinem značeným fluorochromem Cy3. Další možností, proč se nepodařilo prokázat obohacení satelitů na některém z pohlavních chromosomů je případná vnitrodruhová variabilita zkoumaných repetitivních sekvencí. Osekvenované genomy pocházely z jiných rodin, než ze kterých byly pořízeny preparáty, a je tak možné, že se rodiny navzájem liší hojností jednotlivých satelitů.

5.1 Další postup

Z časových důvodů nebyly dva z pěti satelitů zamapovány, a to konkrétně satelity CL55 a CL156. Oba satelity jsou poměrně krátké, CL55 má 62 bp a CL156 má pouhých 38 bp, oba by ale zároveň mohly být na pohlavních chromosomech (CL55 na chromosomu Z a CL156 na chromosomu W). Jejich délka by mohla být překážkou v následné práci s těmito satelity. Satelit CL55 jsme se pokoušely přidat do této práce také,

ale prozatím se nám nepodařilo získat funkční primery. Satelit CL156, který má monomer dlouhý 38 bp, by mohl být v budoucnu zamapován za použití značeného oligonukleotidu.

Dalším krokem by mohlo být zopakování FISH s třemi již zamapovanými satelity se zesílením hybridizačního signálu. Mohly by se tak detekovat případné krátké klastry satelitní DNA, které byly pod detekční schopností FISH použité v této práci. Případná vnitrodruhová variabilita v množství satelitních sekvencí by mohla být odhalena prozkoumáním jedinců z jiných rodin a lokalit.

6 Závěr

Repetitivní DNA hraje důležitou roli v evoluci genomu a diverzifikaci pohlavních chromosomů. V této práci byly lokalizovány a zamapovány tři vybrané satelitní sekvence píďalky podzimní identifikované komparativní analýzou samčích a samičích genomů pomocí bioinformatického nástroje RepeatExplorer. Píďalka podzimní je pro výzkum zajímavým druhem kvůli svým mnohočetným pohlavním chromosomům $W_1W_2W_3Z$, přičemž chromosomy W se liší úrovní heterochromatinizace.

Vybranými satelity byly CL49, CL175 a CL219. Jednotlivé satelity byly v této práci, amplifikovány pomocí PCR, následně zaklonovány, osekvenovány a vytvořené sondy poté zamapovány pomocí FISH na samičích chromosomech píďalky podzimní.

I když měly být všechny zkoumané satelity lokalizované nejen na autosomech, ale i na chromosomu W nebo Z , jejich výskyt byl na pohlavních chromosomech velmi omezený. Repetitivní sekvence, které se na nich nacházejí, zejména na chromosomu W_1 , který je bohatý na heterochromatin, tak musejí být buď tvořeny satelity, se kterými se v této práci nepracovalo, mikrosatelity nebo mobilními elementy. Podařilo se ale získat satelit s umístěním v telomerických/subtelomerických oblastech všech chromosomů, což u motýlů zatím nebylo pozorováno.

7 Zdroje

- Abe, H., Fujii, T., Shimada, T., Mita, K. (2010). Novel non-autonomous transposable elements on W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Genetics*, 89(3), 375–387. <https://doi.org/10.1007/S12041-010-0049-3>
- Abe, H., Mita, K., Yasukochi, Y., Oshiki, T., Shimada, T. (2005). Retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Cytogenetic and Genome Research*, 110(1–4), 144–151. <https://doi.org/10.1159/000084946>
- Andrenacci, D., Cavaliere, V., Lattanzi, G. (2020). The role of transposable elements activity in aging and their possible involvement in laminopathic diseases. *Ageing Research Reviews*, 57, 100995. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2019.100995>
- Bachtrog, D. (2006). A dynamic view of sex chromosome evolution. *Current Opinion in Genetics Development*, 16(6), 578–585. <https://doi.org/10.1016/J.GDE.2006.10.007>
- Bardella, V. B., da Rosa, J. A., Vanzela, A. L. L. (2014). Origin and distribution of AT-rich repetitive DNA families in *Triatoma infestans* (Heteroptera). *Infection, Genetics and Evolution*, 23, 106–114. <https://doi.org/10.1016/J.MEEGID.2014.01.035>
- Biémont, C., Vieira, C. (2006). Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. *Nature*, 443(7111), 521–524. <https://doi.org/10.1038/443521A>
- Biscotti, M. A., Olmo, E., Heslop-Harrison, J. S. (Pat. (2015). Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome Research*, 23(3), 415–420. <https://doi.org/10.1007/S10577-015-9499-Z>
- Blackmon, H., Demuth, J. P. (2014). Estimating Tempo and Mode of Y Chromosome Turnover: Explaining Y Chromosome Loss With the Fragile Y Hypothesis. *Genetics*, 197(2), 561–572. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.114.164269>
- Briggs, J. B. (1957). Some Features of the Biology of the Winter Moth (*Operophtera Brumata* (L.) on Top Fruits . *Journal of Horticultural Science*, 32(2), 108–125. <https://doi.org/10.1080/00221589.1957.11513893>
- Cabral-de-Mello, D. C., Zrzavá, M., Kubičková, S., Rendón, P., Marec, F. (2021). The Role of Satellite DNAs in Genome Architecture and Sex Chromosome Evolution in Crambidae Moths. *Frontiers in Genetics*, 12(March), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.661417>

- Charlesworth, B. (1991). The evolution of sex chromosomes. *Science*, 251(4997), 1030–1033.
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1998119>
- Charlesworth, B., Sniegowski, P., Stephan, W. (1994). The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 1994 371:6494, 371(6494), 215–220.
<https://doi.org/10.1038/371215a0>
- Charlesworth, D., Charlesworth, B., Marais, G. (2005). Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity*, 95(2), 118–128.
<https://doi.org/10.1038/SJ.HDY.6800697>
- Clark, F. E., Kocher, T. D. (2019). Changing sex for selfish gain: B chromosomes of Lake Malawi cichlid fish. *Scientific Reports* 2019 9:1, 9(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-55774-8>
- Dalíková, M., Zrzavá, M., Kubíčková, S., Marec, F. (2017). W-enriched satellite sequence in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae). *Chromosome Research*, 25(3–4), 241–252. <https://doi.org/10.1007/S10577-017-9558-8>
- Dasmahapatra, K. K., Walters, J. R., Briscoe, A. D., Davey, J. W., Whibley, A., Nadeau, N. J., Zimin, A. V., Salazar, C., Ferguson, L. C., Martin, S. H., Lewis, J. J., Adler, S., Ahn, S. J., Baker, D. A., Baxter, S. W., Chamberlain, N. L., Ritika, C., Counterman, B. A., Dalmay, T., ... Jiggins, C. D. (2012). Butterfly genome reveals promiscuous exchange of mimicry adaptations among species. *Nature* 2012 487:7405, 487(7405), 94–98.
<https://doi.org/10.1038/nature11041>
- Derks, M. F. L., Smit, S., Salis, L., Schijlen, E., Bossers, A., Mateman, C., Pijl, A. S., De Ridder, D., Groenen, M. A. M., Visser, M. E., Megens, H. J. (2015). The Genome of Winter Moth (*Operophtera brumata*) Provides a Genomic Perspective on Sexual Dimorphism and Phenology. *Genome Biology and Evolution*, 7(8), 2321–2332.
<https://doi.org/10.1093/GBE/EVV145>
- Fuková, I., Traut, W., Vítková, M., Nguyen, P., Kubíčková, S., Marec, F. (2007). Probing the W chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin. *Chromosoma*, 116(2), 135–145.
<https://doi.org/10.1007/S00412-006-0086-0>
- Gabor, G. L., Gill, A. C. (1982). Nucleotide sequences of highly repeated DNAs; compilation and comments. *Genet. Res., Camb.* <https://doi.org/10.1017/S0016672300020711>

- Garrido-Ramos, M. A. (2017). Satellite DNA: An evolving topic. *Genes*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/GENES8090230>
- Gotter, A. L., Levine, J. D., Reppert, S. M. (1999). Sex-Linked period Genes in the Silkworm, *Antheraea pernyi*: Implications for Circadian Clock Regulation and the Evolution of Sex Chromosomes. *Neuron*, 24(4), 953–965. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81042-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81042-9)
- Hausmann, A., Viidalepp, J. (Jaan). (2012). *The geometrid moths of Europe. Volume 3, Subfamily Larentiinae I (Cataclymini, Xanthorhoini, Euphyiini, Larentiini, Hydrimenini, Stammnodini, Cidariini, Operophterini, Asthenini, Phileremini, Rheumapterini, Solitaneini, Melanthiini, Chesladini, Trichopterygini): Subfamily Sterrhinae (II) (Lythriini)*. 743.
- Heckmann, S., MacAs, J., Kumke, K., Fuchs, J., Schubert, V., Ma, L., Novák, P., Neumann, P., Taudien, S., Platzer, M., Houben, A. (2013). The holocentric species *Luzula elegans* shows interplay between centromere and large-scale genome organization. *The Plant Journal*, 73(4), 555–565. <https://doi.org/10.1111/TPJ.12054>
- Hejníčková, M., Dalíková, M., Potocký, P., Tammaru, T., Trehubenko, M., Kubíčková, S., Marec, F., Zrzavá, M. (2021). Degenerated, undifferentiated, rearranged, lost: High variability of sex chromosomes in geometridae (Lepidoptera) identified by sex chromatin. *Cells*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/cells10092230>
- Kejnovsky, E., Hobza, R., Cermak, T., Kubat, Z., Vyskot, B. (2009). The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. *Heredity* 2009 102:6, 102(6), 533–541. <https://doi.org/10.1038/hdy.2009.17>
- Kidwell, M. G. (2005). Transposable Elements. *The Evolution of the Genome*, 165–221. <https://doi.org/10.1016/B978-012301463-4/50005-X>
- Kidwell, M. G., Lisch, D. R. (2001). PERSPECTIVE: TRANSPOSABLE ELEMENTS, PARASITIC DNA, AND GENOME EVOLUTION. *Evolution*, 55(1), 1–24. <https://doi.org/10.1111/J.0014-3820.2001.TB01268.X>
- Kristensen, N. P., Scoble, M. J., Karsholt, O. (2007). Lepidoptera phylogeny and systematics: the state of inventorying moth and butterfly diversity. *Zootaxa*, 1668, 699–747. www.mapress.com/zootaxa/

- Kubo, Y., Okazaki, S., Anzai, T., Fujiwara, H. (2001). Structural and Phylogenetic Analysis of TRAS, Telomeric Repeat-Specific Non-LTR Retrotransposon Families in Lepidopteran Insects. *Molecular Biology and Evolution*, 18(5), 848–857. <https://doi.org/10.1093/OXFORDJOURNALS.MOLBEV.A003866>
- Lu, Y. -J, Kochert, G. D., Isenhour, D. J., Adang, M. J. (1994). Molecular characterization of a strain-specific repeated DNA sequence in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Molecular Biology*, 3(2), 123–130. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1994.tb00159.x>
- Mahendran, B., Acharya, C., Dash, R., Ghosh, S. K., Kundu, S. C. (2006). Repetitive DNA in tropical tasar silkworm *Antheraea mylitta*. *Gene*, 370(1–2), 51–57. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2005.11.010>
- Mandrioli, M., Manicardi, G. C., Marec, F. (2003). Cytogenetic and molecular characterization of the MBSAT1 satellite DNA in holokinetic chromosomes of the cabbage moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera). *Chromosome Research*, 11(1), 51–56. <https://doi.org/10.1023/A:1022058032217>
- Mannai, Y., Ezzine, O., Hausmann, A., Nouira, S., Ben Jamâa, M. L. (2017). Budburst phenology and host use by *Operophtera brumata* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Geometridae) in three Mediterranean oak species. *Annals of Forest Science*, 74(1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/S13595-016-0600-3/FIGURES/4>
- Marec, F., Traut, W. (1993). Synaptonemal complexes in female and male meiotic prophase of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). *Heredity* 1993 71:4, 71(4), 394–404. <https://doi.org/10.1038/hdy.1993.154>
- Melters, D. P., Paliulis, L. V., Korf, I. F., Chan, S. W. L. (2012). Holocentric chromosomes: Convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. In *Chromosome Research* (Vol. 20, Issue 5, pp. 579–593). <https://doi.org/10.1007/s10577-012-9292-1>
- Novák, P., Neumann, P., Pech, J., Steinhaisl, J., MacAs, J. (2013). RepeatExplorer: A Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. *Bioinformatics*, 29(6), 792–793. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt054>
- Osanai-Futahashi, M., Suetsugu, Y., Mita, K., Fujiwara, H. (2008). Genome-wide screening and characterization of transposable elements and their distribution analysis in the

- silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(12), 1046–1057. <https://doi.org/10.1016/J.IBMB.2008.05.012>
- Palomeque, T., Lorite, P. (2008). Satellite DNA in insects: a review. *Heredity* 2008 100:6, 100(6), 564–573. <https://doi.org/10.1038/hdy.2008.24>
- Pinkrová, K. (2020). *Role repetitivních sekvencí v molekulární diferenciaci pohlavních chromosomů bělásků rodu Pieris BAKALÁŘSKÁ PRÁCE Autorka : Kristina Pinkrová Školitelka : RNDr. Magda Zrzavá , Ph. D. České Budějovice.*
- Plohl, M., Meštrović, N., Mravinac, B. (2012). Satellite DNA Evolution. In *Genome dynamics* (Vol. 7, pp. 126–152). *Genome Dyn.* <https://doi.org/10.1159/000337122>
- Sahara, K., Yoshido, A., Traut, W. (2012). Sex chromosome evolution in moths and butterflies. *Chromosome Research*, 20(1), 83–94. <https://doi.org/10.1007/S10577-011-9262-Z/FIGURES/6>
- Sela, N., Kim, E., Ast, G. (2010). The role of transposable elements in the evolution of non-mammalian vertebrates and invertebrates. *Genome Biology*, 11(6), 1–13. <https://doi.org/10.1186/GB-2010-11-6-R59/FIGURES/6>
- Traut, W., Marec, F. (1996). Sex chromatin in lepidoptera. *Quarterly Review of Biology*, 71(2), 239–256. <https://doi.org/10.1086/419371>
- Traut, W., Marec, F. (1997). Sex Chromosome Differentiation in Some Species of Lepidoptera (Insecta). *Chromosome Research* 1997 5:5, 5(5), 283–291. <https://doi.org/10.1023/B:CHRO.0000038758.08263.C3>
- Traut, W., Sahara, K., Marec, F. (2007). Sex Chromosomes and Sex Determination in Lepidoptera. *Sexual Development*, 1(6), 332–346. <https://doi.org/10.1159/000111765>
- Traut, W., Vogel, H., Glöckner, G., Hartmann, E., Heckel, D. G. (2013). High-throughput sequencing of a single chromosome: A moth W chromosome. *Chromosome Research*, 21(5), 491–505. <https://doi.org/10.1007/S10577-013-9376-6>
- Treangen, T. J., Salzberg, S. L. (2012). Repetitive DNA and next-generation sequencing: Computational challenges and solutions. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 13, Issue 1, pp. 36–46). <https://doi.org/10.1038/nrg3117>
- Van Dongen, S., Sprengers, E., Löfstedt, C., Matthysen, E. (1999). Fitness components of

- male and female winter moths (*Operophterabrumata* L.) (Lepidoptera, Geometridae) relative to measures of body size and asymmetry. *Behavioral Ecology*, 10(6), 659–665. <https://doi.org/10.1093/BEHECO/10.6.659>
- Varley, G. C. (George C., Gradwell, G. R., Hassell, M. P. (Michael P. (1973). *Insect population ecology : an analytical approach*. 212.
- Věchtová, P., Dalíková, M., Sýkorová, M., Žurovcová, M., Füssy, Z., Zrzavá, M. (2016). CpSAT-1, a transcribed satellite sequence from the codling moth, *Cydia pomonella*. *Genetica*, 144(4), 385–395. <https://doi.org/10.1007/S10709-016-9907-0>
- Vindstad, O. P. L., Hagen, S. B., Jepsen, J. U., Kapari, L., Schott, T., Ims, R. A. (2011). Phenological diversity in the interactions between winter moth (*Operophtera brumata*) larvae and parasitoid wasps in sub-arctic mountain birch forest. *Bulletin of Entomological Research*, 101(6), 705–714. <https://doi.org/10.1017/S0007485311000277>
- Vítková, M., Fuková, I., Kubičková, S., Marec, F. (2007). Molecular divergence of the W chromosomes in pyralid moths (Lepidoptera). *Chromosome Research*, 15(7), 917–930. <https://doi.org/10.1007/S10577-007-1173-7>
- Winnepenninckx, B., Backeljau, T., De Wachter, R. (1993). Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends in Genetics*, 9(12), 407. [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(93\)90102-N](https://doi.org/10.1016/0168-9525(93)90102-N)
- Wright, A. E., Dean, R., Zimmer, F., Mank, J. E. (2016). How to make a sex chromosome. *Nature Communications* 2016 7:1, 7(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/ncomms12087>
- Zrzavá, M., Hladová, I., Dalíková, M., Šíchová, J., Ůunap, E., Kubičková, S., Marec, F. (2018). Sex Chromosomes of the Iconic Moth *Abraxas grossulariata* (Lepidoptera, Geometridae) and Its Congener *A. sylvata*. *Genes*, 9(6). <https://doi.org/10.3390/GENES9060279>

8 Přílohy

Konsensus sekvence zkoumaných satelitních sekvencí:

CL49 (374 bp):

AAAATAAGTGACATTTTTGACCATTTTTATACAAAAATTAAAGTTCAAACCTAAC
CTAACCCACGGTTAGGTTTGACGGTTTTTCGCGTGTATTTTCTTGCGTGAGTGAG
TTTTTTCTTCAGTTGTAGCCGAAACACCATCCCCGACGCTCTCCAGTCGACCTG
CAACAAAAAGAAAAAATTAGCACGCGAAAAAACTAAAATTTGCAAATTCAGTT
CCAAAAAGTTGATATACCCAAGCTAATTTCCCTTGAGAAATTACCTTTGATTTTGA
AATTATTGGAGTTGTTTTTGTGAATAAAAATAATTCCAAGTGCGCATAGGTATCT
ACACCTGTTAATTAGTTTCTACGTATTTTATCAGTGGTTTTGACTC

CL175 (152 bp):

AAAGTAGAAAAAATATTTTCATCATTTCAAACAGTCTAGGAAGCTAGAACTCT
TTCGTTTTGAACAGATCCGTATCATAGCTGCAATCTAGAACTCGATTGGAGTCCA
GAACTCACGTTAAAATGCCAGCAGATCATGTCCGAAAGTTTGA

CL219 (171 bp):

TCGTAAAATTTGCTGTATGTTGATGATTTAGTCTCTAATTTTTTTATTTACCAAGG
TATCCCTCTAGATATCATTTGATTCACCTACTTATGTATTAGTTGATGTCCACAAG
CATTTTTGAGGCAATCAAAGGGAGGGCGGGGTATTTAAGGCCAATTTTCGATC
AGTAT