

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**

**Přírodovědecká fakulta**



**Role tandemových repetitiv v evoluci karyotypu a  
degeneraci pohlavního chromosomu W u  
skvrnopásníka lískového (*Lomaspilis marginata*)**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor: Bc. Marharyta Trehubenko

Školitelka: RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D.

České Budějovice 2023

Trehubenko, M., 2023: Role tandemových repetič v evoluci karyotypu a degeneraci pohlavního chromozomu W u skrvnopásníka lískového (*Lomaspilis marginata*). [The role of tandem repeats in the karyotype evolution and the W sex chromosome degeneration in the clouded border (*Lomaspilis marginata*). Mgr. Thesis, in Czech] – 47 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

The main objectives of the thesis were (i) to analyze satellite repeats in *Lomaspilis marginata* and their possible localization in autosomal and W-linked heterochromatin blocks and (ii) to compare the content of heterochromatin blocks on the type W-1 W chromosome using the miSAT-03 microsatellite probe. The experiments showed that the satellite repeats are not present in heterochromatin blocks and that there are other types of W-1-like W chromosome that do not contain miSAT-03. Finally, large differences in genome size were found, with a 22% difference between the largest and smallest genomes.

**Finanční podpora:**

Tato práce byla financována z grantu 20-13784S Grantové agentury České republiky při Entomologickém ústavu BC AV ČR.

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, 13.04.2023

.....

Marharyta Trehubenko

## **Poděkování**

V první řadě bych ráda poděkovala mé školitelce Magdě Zrzavé za trpělivost a podporu, bez kterých dokončení této práce nebylo možné. Za veškeré odborné rady a pomoc s experimenty patří obrovské poděkování všem kolegům v laboratoři, zejména Frantovi Marecovi. Další poděkování bych chtěla věnovat kolegům z laboratoře Ivy Mozgové, kteří mě podporovali a věřili, že to zvládnou. V neposlední řadě děkuji svým blízkým, kteří celou cestu stáli při mně v dobrém i ve zlém. Zejména příteli a Nale, kteří vytvářeli perfektní podmínky pro psaní.

## OBSAH

|   |    |
|---|----|
| 1. Úvod   | 1  |
| 1.1. Chromozomální určení pohlaví                               | 1  |
| 1.2. Evoluce pohlavních chromozomů                              | 1  |
| 1.3. Chromozomální určení pohlaví u motýlů                      | 2  |
| 1.4. Pohlavní chromozomy u motýlů                               | 2  |
| 1.5. Sex chromatin  | 4  |
| 1.6. Repetitivní DNA v genomu motýlů                            | 5  |
| 1.6.1. Rozptýlené repetice                                      | 5  |
| 1.6.2. Tandemová opakování                                      | 6  |
| 1.7. Velikost motýlího genomu                                   | 7  |
| 1.8. Skvrnopásník lískový ( <i>Lomaspilis marginata</i> )       | 8  |
| 2. Cíle práce   | 10 |
| 3. Materiály a metody   | 11 |
| 3.1. Použitý hmyz   | 11 |
| 3.2. Příprava preparátů   | 11 |
| 3.2.1. Příprava chromozomálních preparátů                       | 11 |
| 3.2.2 Příprava preparátů z malpighických trubic                 | 12 |
| 3.3. Izolace genomové DNA                                       | 12 |
| 3.4. Vyhledávání tandemových repetice                           | 13 |
| 3.5. Polymerázová řetězcová reakce (PCR)                        | 13 |
| 3.6. Klonování a sekvenování                                    | 15 |
| 3.7. Příprava sond pro komparativní genomovou hybridizaci (CGH) | 16 |
| 3.8. Komparativní genomová hybridizace (CGH)                    | 17 |



|  |    |
|--|----|
| 3.9. Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH) | 18 |
| 3.10. Prohlédnutí chromosomálních preparátů          | 19 |
| 3.11. Měření genomu                                  | 19 |
| 4. Výsledky  | 21 |
| 4.1. Sex chromatin                                   | 21 |
| 4.2. Výsledky CGH                                    | 24 |
| 4.3. Analýza repetitivních sekvencí                  | 26 |
| 4.3.1. Mikrosatelitní sekvence                       | 26 |
| 4.3.2. Satelitní sekvence                            | 27 |
| 4.4. Měření genomu                                   | 31 |
| 5. Diskuze   | 33 |
| 5.1. Varianty chromozomu W                           | 34 |
| 5.2. Satelitní sekvence                              | 35 |
| 5.3. Velikost genomu                                 | 36 |
| 6. Závěr   | 38 |
| 7. Přílohy   | 39 |
| 8. Použité zdroje                                    | 41 |

# 1. Úvod

## 1.1. Chromozomální určení pohlaví

Konstituce pohlavních chromozomů je u mnoha druhů živočichů rozhodující pro určení pohlaví jedince. U většiny z nich se jedná o samčí heterogamii, kde samec nese dva pohlavní chromozomy – X a Y, zatímco samice disponuje sadou dvou chromozomů X. Při méně častém stavu, samičí heterogamii, je to obráceně: dva stejné chromozomy Z mají samci a samice dva chromozomy Z a W (Charlesworth 1996; Rice 1996). Zmíněné systémy chromozomálního určení pohlaví (WZ/ZZ a XY/XX) se vyvíjely nezávisle u různých skupin zvířat a rostlin (Charlesworth 1996).

## 1.2. Evoluce pohlavních chromozomů

Vzhledem k tomu, že jsou zásadní charakteristiky mezi XY a WZ konfiguracemi podobné, pro obě platí totožné evoluční principy (Kaiser a Bachtrog 2010). Obecně uznávaná teorie o původu pohlavních chromozomů praví, že se vyvinuly z homologního páru autozomů ve chvíli, kdy jeden z nich získal gen determinující pohlaví (Charlesworth 1996; Bachtrog 2006). Následně se na tomto chromozomu začaly shromažďovat geny prospívající heterogametickému pohlaví. Jelikož z evolučního hlediska je výhodné, aby se tyto geny přenášely do dalších generací společně, docházelo ke změnám, které chránily tyto úseky před genetickou rekombinací mezi pohlavními chromozomy (Charlesworth 1978; Rice 1987). Výsledkem toho je degenerovaný a často heterochromatizovaný pohlavní chromozom W nebo Y, který přišel o většinu svých aktivních genů a skládá se převážně z repetitivních sekvencí (Charlesworth 1978; Charlesworth a Charlesworth 2000; Charlesworth, Charlesworth a Marais 2005). Tento pohlavní chromozom může nakonec i přijít o svou funkci v určení pohlaví, když gen determinující pohlaví, který se na něm nachází, se přemístí na jiný chromozom, čímž celý cyklus vývoje pohlavních chromozomů může začít znovu (Charlesworth 1996).

Podle alternativní teorie pohlavní chromozomy vznikly z nadbytečného chromozomu B (Dalíková et al. 2017b). Obecně se jedná o atypickou složku karyotypu mnoha skupin organismů, která není zařazena mezi klasické, tzv. A chromozomy. Pro tento chromozom jsou charakteristické nepravidelný vnitrodruhový výskyt, odlišný počet kopií v buňkách stejného jedince, nemendelistická dědičnost a často absence účinku na fenotyp jedince

(Pansonato-Alves et al. 2014; Douglas a Birchler 2017). Tuto teorii podporuje práce Nokkala et al. (2003), kde byl odhalen původ pohlavního chromozomu Y mery přelétavé (*Cacopsylla peregrina*), a práce Carvalho et al. (2002), ve které je popsána evoluce a původ pohlavního chromozomu Y skupiny Drosophilidae (Diptera). Obě práce vychází z toho, že párováním původního chromozomu B s již existujícím pohlavním chromozomem X (pohlavní konstituce XX/XY) postupem času došlo k jeho přeměně na chromozom Y, a tím k začlenění do typického karyotypu.

### 1.3. Chromozomální určení pohlaví u motýlů

Hmyzí řády Lepidoptera (motýli) a Trichoptera (chrostíci) jsou považovány na základě synapomorfí za sesterské (Wolf, Novák a Marec 1997). Jednou z nich je samičí heterogamie, v tomto případě konstituce Z0/ZZ (samice/samec), která se nachází převážně u bazálních skupin motýlů a je považována za ancestrální. Odvozenější chromozomální konstitucí u motýlů je systém WZ/ZZ (samice/samec), který se nachází u drtivé většiny motýlů (shrnuto v Sahara, Yoshido a Traut 2012).

U motýlů existují i další možnosti chromozomální konstituce, například systém neo-WZ<sub>1</sub>Z<sub>2</sub> vznikající fúzí pohlavního chromozomu W s autozomem. V karyotypu samiček se pak nachází lichý počet chromozomu, zatímco u samců sudý (Marec, Sahara a Traut 2010; Hejníčková et al. 2019). Příkladem je kropenatec jetelový (*Chiasmia clathrata*), kde je u některých rodin přítomná klasická WZ/ZZ konstituce, zatímco u jiných jsou přítomny chromozomy neo-WZ<sub>1</sub>Z<sub>2</sub> (Hejníčková et al. 2021). O něco složitější systémy se vyvinuly u bělásků rodu *Leptidea*, kde jsou početné oba typy pohlavních chromozomů – W<sub>1</sub>W<sub>2</sub>W<sub>3</sub>Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>3</sub> (*L. sinapis*), W<sub>1</sub>W<sub>2</sub>W<sub>3</sub>Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>3</sub>Z<sub>4</sub> (*L. juvernica*) a W<sub>1</sub>W<sub>2</sub>W<sub>3</sub>W<sub>4</sub>Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>3</sub>Z<sub>4</sub> (*L. reali*) (Šíchová et al. 2015).

### 1.4. Pohlavní chromozomy u motýlů

Je známo, že chromozomy motýlů postrádají primární konstrikci a kinetochor pokrývá většinu jejich délky. Holokinetická struktura a podobná velikost způsobují, že je skoro nemožné během mitotické metafáze rozeznat jednotlivé chromozomy od sebe. Výjimkou je u některých druhů chromozom W, který je často tvořený heterochromatinem. Pohlavní chromozomy jsou ale často dobře rozpoznatelné od ostatních chromozomů v meióze, kde tvoří bivalent složený

ze dvou morfologicky odlišných chromozomů. Chromozom W je pak u většiny druhů motýlů viditelný v interfázních jádrech v podobě heterochromatinového tělíška, tzv. sex chromatinu (více v kapitole 1.3.3.) (Wolf, Novák a Marec 1997; Traut, Sahara a Marec 2007).

Složení pohlavního **chromozomu Z** je velice podobné autozomům (Sahara, Yoshido a Traut 2012). Jeho obsah je považován za konzervativní, jelikož umístění genů je zachováno u různých druhů motýlů (Beldade et al. 2009; Sahara, Yoshido a Traut 2012; Van't Hof et al. 2013). Značné množství genů je transkripčně aktivní a podílí se na vývoji samčího pohlaví (Traut, Sahara a Marec 2007; Sahara, Yoshido a Traut 2012).

Na rozdíl od svého partnera, chromozomu Z, je **chromozom W** menší velikosti, neobsahuje skoro žádné transkripčně aktivní geny a je často tvořen konstitutivním kondenzovaným chromatinem (Traut, Sahara a Marec 2007; shrnuto v Kaiser and Bachtrog 2010). U některých druhů motýlů (například u bource morušového (*Bombyx mori*)) přítomnost v genomu chromozomu W spouští vývoj samčího pohlaví v nezávislosti na počtu Z chromozomů a autozomů (Abe et al. 2005). Nicméně jsou druhy, u kterých tomu tak není. U potomstva vzniklého křížením dvou poddruhů martináče pajasanového (*Samia cynthia pryeri* a *S. c. walkeri*) se nacházeli samci disponující pohlavním chromozomem W a samičky, které ho postrádaly (Yoshido, Marec a Sahara 2016).

U různých druhů byla nalezena variabilita v míře degenerace chromozomu W – od částečné do kompletní (Hejníčková et al. 2019). Tato rozdílnost je způsobená rychlým vývojem chromozomu W, a to i u velice příbuzných druhů. Například v práci Vítková et al. (2007) téměř nebyla nalezena homologie při analýze pohlavního chromozomu W u čtyř druhů zavíječů (zavíječ moučný, z. čokoládový, z. paprikový a z. voskový). Prakticky žádné rozdíly nebyly objevené ani mezi dvěma druhy skrvnopásníka – s. angreštovým (*Abraxas grossulariata*) a s. jilmovým (*A. sylvata*) (Zrzavá et al. 2018), nebo třemi druhy zavíječů z čeledi Crambidae – zavíječem kukuřičným (*Ostrinia nubilalis*), *Diatraea postlineella* a zavíječem zimostřezovým (*Cydalima perspectalis*) (Cabral-de-Mello et al. 2021b). Důvodem této rychlé diverzifikace může být absence rekombinace během meiózy u samic, která vede ke ztrátě genů a rozšíření repetitivní DNA a tím k heterochromatinizaci chromozomu.

U některých druhů motýlů (např. u zavíječe moučného nebo z. čokoládového), může být chromozom W identifikován pouhým obarvením pachytenních jader 6-diamino-2-phenylindole (DAPI) (Vítková et al. 2007). Pokud to není možné, lze k vizualizaci chromozomu W použít komparativní genomovou hybridizaci (CGH) nebo genomovou *in situ*

hybridizaci (GISH) (Traut a Marec 1997; Marec, Sahara a Traut 2010). Zmíněné metody zvýrazňují diferenciovaný chromozom W, který je často tvořen velkým množstvím repetitivních sekvencí, zvláště mobilními elementy a sekvencemi mitochondriální DNA (Vítková et al. 2007; Marec, Sahara a Traut 2010; Traut et al. 2013; Hejníčková et al. 2023).

Donedávna velké množství repetitivní DNA na chromozomu W znemožňovalo složení jeho sekvence a komplikovalo složení zbytku genomu, proto byl chromozom W často vynechán ze sekvenačních analýz (Traut et al. 2013). V dnešní době však existují nové způsoby sekvenování, které jsou schopné přečíst dlouhé úseky najednou, takže je možné složit i oblasti obsahující mnoho repetitivní DNA. Proto přibývají vysoce kvalitní sekvence genomů poskládaných na úroveň jednotlivých chromozomů včetně chromozomu W. Takovou iniciativou je např. projekt Darwin Tree of Life <https://www.darwintreeoflife.org/>, jehož cílem je osekvenovat genomy eukaryotických organismů Velké Británie a Irsko.

## 1.5. Sex chromatin

Kulaté heterochromatinové tělíčko je zvláštním útvarem přítomným pouze v samičím interfázním jádře, zatímco samci ho postrádají. Jedná se o strukturu odvozenou od pohlavního chromozomu W, a proto se též nazývá W chromatin nebo sex chromatin. Jelikož heterogametickým pohlavím u motýlů jsou samice, sex chromatin nefunguje jako mechanismus kompenzace genové dávky, jak je tomu například u savců (Traut a Marec 1996; Marec a Novák 1998).

Vzhledem ke svému původu a snadné identifikaci v polyploidních buňkách malpighických trubic byl sex chromatin delší dobu používán jako prvotní marker přítomnosti pohlavního chromozomu W (Traut a Marec 1996). Ukázalo se však, že sex chromatin často v predikci přítomnosti chromozomu W není spolehlivý. Častým důvodem je přítomnost neo-W, vznikajícího fúzí původního chromozomu W s autozomem (Hejníčková et al. 2021). Kupříkladu u dvou druhů motýlů z různých čeledí, hrotnokřídlece (*Phymatopus californicus*, Hepialidae) a jasoně dymnivkového (*Parnassius mnemosyne*, Papilionidae), hybridizační metody potvrdily chromozomální konstituci neo-WZ<sub>1</sub>Z<sub>2</sub> a neo-WZ navzdory nepřítomnosti sex chromatinu v malpighických trubicích, která naznačovala absenci chromozomu W (Voleníková 2015; Vlašánek et al. 2017). Taktéž dle výsledků práce Marec a Novák (1998) sex chromatin nebyl přítomen u pěti zkoumaných druhů sesterské skupiny Trichoptera

(chrostíci), a následná analýza potvrdila u samic absenci chromozomu W a chromozomální konstituci Z/ZZ.

Změny na pohlavních chromozomech dokáží nejen ovlivnit přítomnost sex chromatinu, ale i jeho vzhled a velikost. Tento jev byl pozorován u geneticky pozměněných linií zavíječe moučného s různými typy chromosomálních aberací, jako je fúze autozomu s chromozomem W, delece části chromozomu W (Traut, Weith a Traut 1986), nebo translokace části chromozomu Z na chromozom W (Traut a Marec 1994). Těmito změnami došlo k ovlivnění podoby a přítomnosti sex chromatinu: jeho zmenšení, fragmentace, deformace tvaru a úplné absenci. U píďalky obecné (*Epirrhoe alternata*) vnitrodruhová variabilita sex chromatinu odpovídala chromozomální konstitucí u samic  $W_1W_2W_3Z$  (Hejníčková et al. 2021). Čili zatímco klasická podoba sex chromatinu bývá spojená s přítomností vysoce diferenciovaného a heterochromatizovaného chromozomu W, jeho proměny mohou souviset s numerickými variantami, neo-konstitucí nebo strukturními změnami ve stavbě W chromozomu (jeho euchromatizace) (Hejníčková et al. 2021; Demková 2022).

## 1.6. Repetitivní DNA v genomu motýlů

V práci (Britten a Kohne 1964) byla potvrzená přítomnost a charakterizována repetitivní DNA v eukaryotickém genomu. Dle uspořádání jsou repetitivní sekvence klasifikovány na tandemová opakování a rozptýlené repetice (shrnutí v López-Flores a Garrido-Ramos 2012).

### 1.6.1. Rozptýlené repetice

Rozptýlené repetice (neboli transpozony) jsou sekvence DNA schopné přemístění v rámci genomu jedince. Klasicky jsou rozděleny na dva druhy na základě mechanismu jejich rozšíření – retrotranspozony, které se šíří přes intermediát RNA a tím pádem se „kopírují“ v genomu, a DNA transpozony, které požívají strategii „cut and paste“ (shrnutí v López-Flores a Garrido-Ramos 2012).

U motýlů jsou rozptýlené repetice často lokalizovány na chromozomu W. Například na chromozomu W bource morušového se akumulují jak DNA transpozony, tak i několik druhů retrotranspozonů (Abe et al. 2005). Několik studovaných sekvencí na chromozomu W obaleče jablečného (*Cydia pomonella*) vykazovalo homologii s retrotranspozabilními elementy bource morušového (Fuková et al. 2007). U zavíječe moučného (*Ephestia*

*kuehniella*) (Traut et al. 2013) a *D. saccharalis* se na chromozomu W nachází převážně retrotranspozabilní elementy. Nadto u *D. saccharalis* mobilní elementy tvoří až 41.35 % samičího genomu (Gasparotto et al. 2022). V práci Hejníčková et al. (2023) bylo studováno složení chromozomu W různorožce trnkového (*Peribatodes rhomboidaria*). Analýza pomocí bioinformatického nástroje na analýzu repetitivní DNA z krátkých čtení, RepeatExploreru (Novák et al. 2013; Novák et al. 2017) odhalila deset W-obohacených sekvencí, z nichž většina byla klasifikována jako retrotranspozony, z toho jeden byl lokalizován pomocí *in situ* hybridizace výhradně na chromozomu W.

### 1.6.2. Tandemová opakování

Je obecně známo, že eukaryotický genom je bohatý na různé druhy tandemových opakování, zejména satelitní sekvence u některých druhů. Jedná se o sekvence DNA o variabilní délce umístěné v řadě za sebou, které jsou taktéž často hlavní složkou konstitutivního heterochromatinu (King a Cummings 1997). Podle délky opakující se jednotky a celkového motivu jsou klasifikovány na mikrosatelitní sekvence s monomery do 10 bází, minisatelitní sekvence (10-100 bází) a satelity (> 100 bází) (King a Cummings 1997; López-Flores a Garrido-Ramos 2012). Je to dynamická struktura, jejíž procentuální zastoupení v genomu může dosahovat i 50 % (shrnutí Plohl et al. 2008; Plohl, Meštrović a Mravinac 2012).

Tyto nekódující sekvence, původně považovány za „zbytečné“, mají genomu řadu funkcí. Podle svého umístění plní satelitní sekvence důležitou strukturní funkci v telomerických a centromerických oblastech, a taktéž se podílí na celkové úpravě chromatinu (shrnutí v Plohl, Meštrović a Mravinac 2012; Věchtová et al. 2016). U některých živočichů, například brouka potměníka hnědého (*Tribolium castaneum*), satelitní DNA dokáže ovlivnit expresi genu. Transkripty satelitní sekvence kvasinky poltivé (*Schizosaccharomyces pombe*) hrají důležitou roli v úpravě centromerického chromatinu, čímž je zajištěné jeho správné fungování (Volpe et al. 2002).

Jak již bylo zmíněno výše, u motýlů je obvykle nejvíce heterochromatizovanou částí genomu pohlavní chromozom W, kde jsou nashromážděny repetitivní sekvence. Do roku 2021 bylo identifikováno jenom pět satelitů u všech studovaných druhů, ze kterých jeden byl přítomen výhradně na obou pohlavních chromozomech můry zelené (*Mamestra brassicae*) (Mandrioli, Manicardi a Marec 2003), další byl W-obohacený u zavíječe paprikového (*Plodia*

*interpunctella*) (Dalíková et al. 2017a) a dva poslední byly zastoupeny na všech chromozomech v různém množství, však skoro chyběly na chromozomu W obaleče jablečného (Věchtová et al. 2016) a *Antheraea mylitta* (Mahendran et al. 2006). V práci Lu et al. (1994) byla odhalena satelitní sekvence FR, zastoupená v samičím genomu blýskavky kukuřičné (*Spodoptera frugiperda*) stokrát více než v samčím, však nebyla potvrzená její lokalizace na chromozomu W. Analýza pomocí programu RepeatExplorer objevila dalších sedm satelitních sekvencí hojně zastoupených v genomu tří druhů zavíječů z čeledi Crambidae (*O. nubilalis*, *D. postlineella* a *C. perspectalis*) (Cabral-de-Mello et al. 2021b). Následná *in situ* hybridizace odhalila různou distribuci satelitů: dva se ukázaly být pouze autozomálního původu a tři byly W-obohacené. V práci Gasparotto (2022) bylo identifikováno čtrnáct satelitních sekvencí zastoupených v genomu *Diatraea saccharalis*. Osm z nich byly lehce obohaceny na chromozomu W, však se to nepotvrdilo *in situ* hybridizací.

## 1.7. Velikost motýlího genomu

Velikost haploidního genomu je označována jako hodnota C, přičemž jednotkou je pikogram (pg) nebo počet párů bází (bp) (Gregory 2001; Greilhuber et al. 2005; Liu et al. 2020). Jedná se o důležitý nástroj pro studium evoluce genomu, ale měření velikosti genomu se využívá i pro odhad komplikovanosti a nákladnosti sekvenování nemodelových organismů (Gregory 2005a; Liu et al. 2020).

Ve srovnání s rozmanitostí motýlů, kterých je známo přes 180 000 druhů, znalosti o diverzitě velikostí jejich genomů jsou malé (Liu et al. 2020). Výsledky měření genomů 15 motýlů jsou sumarizovány v práci Gregory a Hebert (2003). Průměr naměřených hodnot odpovídá 0,66 pg, kde nejmenší genom má monarcha stěhovavý (*Danaus plexippus*) - 0,29 pg a největší píďalka *Euchlaena irraria* - 1,9 pg. U většiny byla vyzorována jistá variabilita velikosti genomu v rámci čeledi, zatímco v rámci podčeledi tak patrná nebyla, což svědčí o relativně postupném tempu změny velikosti genomu ve skupině Lepidoptera. Výjimku tvoří podčeď Ennominae (čeď Geometridae), kde je tento rozdíl značný (0.32–1.94 pg).

Další data poskytuje rozsáhlá práce (Liu et al. 2020), kde jsou studovány velikosti genomů dalších 67 druhů motýlů. Naměřené hodnoty jsou podobné těm u dvoukřídleho hmyzu (Diptera) a nepřesahují 2 pg. Autoři se rovněž domnívají, že ancestrální velikost genomu mohla být jenom 0,5 pg a postupem času docházelo ke zmenšení nebo zvětšení. Důvodem



takové variability mohou být chromozomální aberace nebo odlišný poměr repetitivních sekvencí v rámci druhu nebo rodu.

### **1.8. Skvrnopásník lískový (*Lomaspilis marginata*)**

Tato práce se věnuje analýze heterochromatinových bloků skvrnopásníka lískového (*L. marginata*). Je to motýl patřící do čeledi píďalkovitých (Geometridae), který se v České republice hojně vyskytuje, přičemž preferuje vlhčí okraje lesů, kde se vyskytují různé druhy vrb, především vrba jíva (*Salix caprea*), kterými se živí housenky (Reichholf-Riehm 1996; Demková 2022).

*Lomaspilis marginata* je z cytogenetického hlediska velice zajímavý druh, protože vykazuje variabilitu v přítomnosti a podobě sex chromatinu, a též pohlavního chromozomu W. Ve své magisterské práci Demková (2022) popsala pomocí komparativní genomové hybridizace (CGH) tři druhy chromozomu W, které se lišily svým obsahem a také množstvím a místem lokalizace heterochromatinových bloků. Typ W-1 obsahoval dva bloky heterochromatinu bohaté na sekvence výrazně akumulované na chromozomu W, typ W-2 obsahoval jeden centrální heterochromatinový blok, v němž byly sekvence abundantní u obou pohlaví, a typ W-3, který CGH nediferencovala od ostatních chromozomů. Autorka předpokládala, že rozdíl v hybridizačních signálech mezi těmito třemi typy pohlavních chromozomů spočívá v rozdílné expanzi repetitivních sekvencí v genomu.

Chromozomy v karyotypu skvrnopásníka jsou podobné velikosti až na jeden pár autozomů, který je přibližně dvojnásobně větší než ostatní chromozomy. Nápadné heterochromatinové bloky se u skvrnopásníka vyskytují nejen na pohlavním chromozomu W, ale skoro na všech chromozomech, což je u motýlů velmi neobvyklé. Převážná většina autozomů má jeden nebo dva bloky DAPI pozitivního kondenzovaného chromatinu (Demková 2022). Analýzou sekvencí v programu Tandem Repeats Finder (Benson 1999) a jejich následným mapováním pomocí *in situ* hybridizace se ukázalo, že významnou složkou heterochromatinových bloků jsou různé mikro- a minisatelitní sekvence (Zrzavá, nepublikováno). Některé mikrosatelitní sekvence nasedaly různým způsobem i na různé typy chromozomu W, což odpovídalo výsledkům CGH Demkové (2022). Pro mojí práci byl zásadní mikrosatelit miSAT-03, který hybridizoval převážně do heterochromatinových bloků na chromozomu W typu W-1 a byl zde použit k odlišení případných dalších variant

chromozomu W, které podle CGH obsahovaly především sekvence obohacené u samice, ale měly různý počet heterochromatinových bloků.

## 2. Cíle práce

Hlavním cílem této magisterské práce bylo ověření, zda se v heterochromatinových blocích skvrnopásníka nachází další typ repetitivních sekvencí – satelity. Dalším cílem bylo otestovat pomocí mikrosatelitu miSAT03 případný výskyt dalších variant chromozomu W obsahujících podle výsledků CGH sekvence obohacené u samice.

Navržený postup byl následující:

1. Identifikace typu chromozomu W u potomků pomocí komparativní genomové hybridizaci (CGH).
2. Mapování mikrosatelitu miSAT-03 u rodin s potenciálně novým typem chromozomu W.
3. Výběr kandidátních satelitních sekvencí a lokalizace těchto repetic pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH).
4. Porovnání velikostí genomu potomků různých rodin.

### **3. Materiál a metody**

#### **3.1. Použitý hmyz**

Dospělé samice druhu *Lomaspilis marginata*, jejichž potomstvo bylo použité v experimentech, jsou původem z jižních Čech. Samice byly chyceny v období od května do července na dvou lokalitách: v Novohradských horách (obec Kuří, Benešov nad Černou) a v Branišovském lese v okolí Českých Budějovic. Následně byly ponechány při pokojové teplotě k vykladení v plastových krabičkách s cukrovou vodou, která sloužila jako potrava pro dospělé, a s vrbou jívou (*Salix caprea*), která fungovala jako živná rostlina pro housenky. V některých případech bylo potřeba vývoj zpomalit, aby bylo možné zpracovat co nejvíce housenek ve stádiu vhodném pro přípravu preparátů. V tom případě byly krabičky s housenkami přemístěny na nezbytnou dobu do chladného boxu (7 °C). Housenky patřičného larválního stadia byly vypitvané a použité na přípravu chromosomálních preparátů a preparátů z malpighických žláz. Zbytky housenek byly zmrazeny v tekutém dusíku a uchované při teplotě -20 °C do dalšího použití.

#### **3.2. Příprava preparátů**

##### **3.2.1. Příprava chromosomálních preparátů**

Na přípravu mitotických (z křídelních disků) a meiotických (z gonád) chromosomálních preparátů byla použita lehce modifikována metoda „spreading“ (Traut 1976). Křídelní disky a varlata byly vyjmuté z těla housenek posledního instaru ve vychlazeném fyziologickém roztoku a neprodleně přemístěné do hypotonizačního roztoku (75 mM KCl) po dobu minimálně 8 minut. Z důvodu nebezpečí rozvolnění struktury heterochromatinu pohlavního chromozomu W byl tento krok vynechán při práci s ovarii. Po uplynutí stanovené doby následovala fixace všech orgánů pomocí čerstvého fixačního roztoku Carnoy (99% etanol: chloroform: kyselina octová v poměru 6:3:1) přibližně 10-15 minut. V mezičase byla na podložní sklo (Superfrost, Menzel-Gläser, Německo) nanesená kapka 60% kyseliny octové, kam byl nafixovaný materiál následně přenesen a rozmacerován wolframovými jehlami do své úplné homogenizace. Dále bylo sklíčko přemístěno na histologickou plotýnku vyhřátou na 45 °C a materiál byl rozprostřen v centrální části skla opatrným pomalým poháněním kapky jehlou do jejího maximálního odpaření. Hotové preparáty byly postupně odvodněné v etanolové řadě (70 %, 80 % a 100 %) po 45 vteřinách, ponechané uschnout a uskladněné

v -20 °C.

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

Malpighické trubice byly vyjmuty z těla housenek ve fyziologickém roztoku a ihned přeneseny na podložní sklíčko s kapkou téhož roztoku. Poté byly zakápnuty po dobu 1,5 minuty fixačním roztokem Carnoy. Po odstranění přebytné fixáže pomocí filtračního papíru byl preparát obarven kapkou 1,25 % lakto-aceto-orceinu. Následovalo překrytí krycím sklíčkem, odstranění přebytného barviva filtračním papírem a zalakování. Vyrobené preparáty byly buď krátkodobě uskladněné při teplotě 4 °C nebo ihned pozorované pod světelným mikroskopem.

### **3.3. Izolace genomové DNA**

Vybraná metoda izolace celogenomové DNA pomocí hexadecyltrimethylammonium bromidu (neboli CTAB) umožňuje získat vysoké množství vysokomolekulární DNA (Winnepeninckx, Backeljau, a Wachter 1993). Izolovaná DNA byla použita jako templát pro amplifikaci satelitů (kapitola 3.5.) a celogenomové značení sondy (kapitola 3.7.).

Pokaždé byl čerstvě připraven extrakční pufr s následujícími výslednými koncentracemi: 2% CTAB; 100 mM Tris-HCl (pH 8), 1,4 M NaCl, 40 mM EDTA (pH 8), 0,2%  $\beta$ -merkapt ethanol, 0,1 mg proteináza K (Macherey – Nagel, Düren, Německo). Při přípravě extrakčního pufru bylo potřeba nejprve inkubovat CTAB v milli-Q vodě při teplotě 37 °C do úplného rozpuštění. Poté bylo do 1,5ml zkumavek rozpipetováno 800  $\mu$ l pufru, kam byly nadále přidány a důkladně rozmělněny tkáně z jednoho jedince (housenka posledního instaru). Tímto způsobem homogenizovaná směs byla ponechána v termobloku přes noc (62 °C, 300 rpm).

Ráno druhého dne byla směs přemístěna do 2ml zkumavky a přečištěná přidáním stejného množství (800  $\mu$ l) chloroformu. Další krok byl zopakován dvakrát: po jemném promíchání byly vzorky centrifugovány po dobu 10 minut (4 °C, 14000 rpm) a následně byla odebrána horní fáze s DNA do nové 2ml zkumavky. Poté bylo přidáno 5  $\mu$ l RNAzy A (10 mg/ml, Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA) a vzorek byl inkubován při teplotě 37 °C po dobu 1 hodiny. Dále byly přidány 2/3 objemu isopropanolu, vzorek byl promíchán a ponechán

při pokojové teplotě po dobu 15 minut (do vysrážení DNA). Následovala centrifugace (4 °C, 14000 rpm) po dobu 15 minut, odpipetování supernatantu a přidání 500 µl 70% etanolu. Promývací krok byl zopakován dvakrát se zkracováním druhé centrifugace na 5 minut. Po úplném odpaření etanolu ze vzorku byla DNA rozpuštěna v 25–45 µl (úměrně velikosti peletu) sterilní milli-Q vody. Než byla výsledná DNA uchovaná v -20 °C, byla změřena její koncentrace pomocí fluorometru Qubit 3.0 a čistota na spektrofotometru Nanodrop 2000 (obojí ThermoScientific, Waltham, USA). Fragmentovanost DNA byla ověřena elektroforézou na 1,5% agarozovým gelu.

### 3.4. Vyhledávání tandemových repetic

Mou školitelkou byla provedena analýza tandemových opakování v genomu *L. marginata* pomocí dvou programů: Tandem Repeats Finder (Benson 1999) a RepeatExplorer (Novák et al. 2013). První nástroj byl použit na vyhledávání kratších mikrosatelitních sekvencí, druhý se primárně zaměřoval na satelity. Tandemové repetice vybrané pro další analýzu jsou uvedené v Tabulce č.1. a konsensus sekvence – v příloze I.

**Tabulka č.1: Informace o tandemových repeticích vybraných pro mapování *in situ*.**

| Název satelitu/mikrosatelitu | Délka monomeru (bp) | Zastoupení v genomu (%) |
|------------------------------|---------------------|-------------------------|
| Lmar-SAT01                   | 847                 | 0,800                   |
| Lmar-SAT02                   | 1210                | 0,088                   |
| Lmar-SAT03                   | 341                 | 0,063                   |
| Lmar-SAT04                   | 375                 | 0,012                   |
| Lmar-miSAT03                 | 6                   | nd                      |

### 3.5. Polymerázová řetězcová reakce (PCR)

Za účelem zmožení fragmentu molekuly DNA je široce používána polymerázová řetězcová reakce neboli PCR. Metoda je založená na syntéze nových fragmentů DNA pomocí termostabilní *Taq* polymerázy, která je schopná opakovaně přežít teplotu denaturace DNA. Úsek, který se má syntetizovat, je ohraničen párem oligonukleotidů komplementárních k části templátu, tzv. primerů. Oligonukleotid je následně prodloužen pomocí *Taq* polymerázy. Proces se opakuje ve více cyklech a výsledkem je získání mnoho kopií žádaného úseku DNA z malého množství vstupního materiálu (Mullis, Ferré a Gibbs 1994).

V této práci byly použité tři druhy PCR: PCR pro amplifikaci satelitních sekvencí, beztemplátová PCR pro výrobu mikrosatelitních sekvencí, a značení satelitních sond pomocí biotinu. Pro lepší přehlednost jsou výsledné koncentrace a profily reakcí uvedeny v Tabulce č.2.

**Tabulka č.2: Použité druhy PCR reakcí.**

|  |  | PCR, amplifikaci satelitů            | Beztemplátová PCR                     | PRC, značení sond biotinem                                  |
|--|--|--------------------------------------|---------------------------------------|---|
| Množství na 25 µl reakční směsi / Výsledné koncentrace | 10x ExTaq / 5x OneTaq pufr   | 10x ExTag pufr 2,5 µl / 1x           | 5x OneTag pufr 5 µl / 1x              | 10x ExTag pufr 2,5 µl / 1x                                  |
|  | dNTP (2,5mM dATP, dCTP, dGTP a dTTP) / high dNTP (2,5mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP a 1mM Cy3-Biotin-dUTP)            | dNTP 2 µl / 0,2mM                    | dNTP 2 µl / 0,2mM                     | high dNTP 4 µl / 0,4mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP a 0,08mM dUTP |
|  | Primery (10µM forward a reverse)   | 2,5 µl / 1µM                         | 2,5 µl / 1µM                          | 2,5 µl / 1µM  |
|  | OneTaq DNA polymeráza I (5 U/µl) (New England, BioLab, USA) / ExTaq DNA polymeráza I (5 U/µl) (TaKaRa, Japonsko) | ExTaq DNA polymeráza 10,2 µl / 0,04U | OneTaq DNA polymeráza 10,2 µl / 0,04U | ExTaq DNA polymeráza 10,125 µl / 0,0025U                    |
|  | H <sub>2</sub> O   | 15,3 µl                              | 12,8 µl                               | 13,4 µl   |
|  | DNA  | 1 ng                                 | /                                     | 1 ng  |
|  |  |                                      |                                       |   |
| Profil reakce  | Denatura primární  | 94°C, 3'                             | 94°C, 3'                              | 94°C, 3'  |
|  | Denaturace   | 94°C, 30"                            | 94°C, 30"                             | 94°C, 30"   |
|  | Annealing  | 60°C, 30"                            | 51,5°C, 30"                           | 60°C, 30"   |
|  | Extenze  | 72°C, 2'                             | 72°C, 30"                             | 72°C, 2'  |
|  | Finální extenze  | 72°C, 3'                             | 72°C, 3'                              | 72°C, 3'  |
|  | Zchlazení  | 4°C, ∞                               | 4°C, ∞                                | 4°C, ∞  |
|  |  |                                      |                                       |   |

Primery používané v PCR reakcích byly navrženy přes hranice monomeru pomocí programu Geneious Prime, Primer3 (Biomatters, Auckland, Nový Zéland) a následně zaslány na výrobu firmě Generi Biotech s.r.o. (Hradec Králové, Česko). Optimální teplota nasedání použitých primerů byla nejdříve vyzkoušena gradientem teplot v termocycleru. Jejich shrnutí je sděleno v Tabulce č.3.

**Tabulka č.3: Přehled použitých primerů.**

|                         | Název sekvence | Velikost produktu v PCR reakci | Forward primer (5'-3') | Reverse primer (5'-3') |
|-------------------------|----------------|--------------------------------|------------------------|------------------------|
| Satelitní sekvence      | Lmar-SAT01     | 837 bp                         | CGAGGCACACATACGTGAGT   | GGCCACATTTACACGTTCCG   |
|                         | Lmar-SAT02     | 1204 bp                        | TTTTGCAGCGTCCCACTACA   | GCCTCTGCCTACTTAGCGTG   |
|                         | Lmar-SAT03     | 334 bp                         | TCGTCCCAGATGCCGAATATG  | CGGCGACTCCCATCAAAAATT  |
|                         | Lmar-SAT04     | 375 bp                         | ACGCACAAACAACCAACAA    | CTTTCAGCTGCAACGGAG     |
| Mikrosatelitní sekvence | Lmar-miSAT03   | několik kb                     | ATCTCTATCTCTATCTCTAT   | ATAGAGATAGAGATAGAGAT   |

Délka produktů PCR reakcí byla ověřena elektroforetickou separací na 1,5% agarózovém gelu. Gel byl po skončení elektroforézy obarven ethidium bromidem a zdokumentován ve fotodokumentačním zařízení SMART5 Gel Documentation System (VWR Life Science, Radnor, Pensylvánie, USA) pod UV zářením. Koncentrace byla změřena na fluorometru Qubit.

### **3.6. Klonování a sekvenování**

Klonování a následné sekvenování inzertů bylo použito v této práci pro ověření, že sekvence amplifikované pomocí PCR z gDNA odpovídají příslušnému satelitu. Vybrané inzerty se správnou sekvencí byly dále použity na výrobu sond pro nepřímou hybridizaci *in situ* (kapitola 3.9.).

Nejdříve po úspěšné amplifikaci satelitů bylo provedeno vyřezávání PCR produktu z agarózového gelu. Materiál byl poté přečištěn pomocí Zymoclean Gel DNA Recovery Kitu (Zymo research, Orange, Kalifornie, USA) podle návodu výrobce. Koncentrace byla změřena na fluorometru Qubit a vzorky byly dále ligovány do vektoru pomocí pGem-T easy vector kitu (Promega, Wisconsin, USA) dle návodu výrobce. Reakce o objemu 10  $\mu$ l obsahovala 50 ng vektoru, 50 ng přečištěného PCR produktu, 3 U T4 ligázy a 1x ligační pufr. Takto připravená ligační směs byla inkubována ve 4 °C přes noc. V mezičase byly připraveny Petriho misky s 1,5% agarem v LB Broth médiu (VWR Life Science, Radnor, Pensylvánie, USA a Duchefa Biochemie, Haarlem, Nizozemsko) s ampicilinem (50 mg/ml). Aby bylo možné odlišit buňky s vektorem a inzertem od buněk bez inzertu, pomocí tzv. modro-bílé selekce, bylo na každou misku přidáno 70  $\mu$ l 100mM IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid) a 20  $\mu$ l 122mM X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid).

Po uplynutí inkubační doby následovala transformace plazmidů teplotním šokem do kompetentních buněk bakterií *E. coli* (kmen DH5 $\alpha$ ). Směs (50  $\mu$ l bakteriálních buněk a 2,5  $\mu$ l ligační směsi) byla nejprve ponechána na ledu po dobu 30 minut, pak zahřáta na 42 °C po dobu 90 vteřin a prudce ochlazena přendáním na led. Přidání 800  $\mu$ l tekutého LB média a inkubace 45 minut ve 37 °C byly posledním krokem před vysetím směsi na připravené Petriho misky. Takto připravené plotny byly inkubovány přes noc při 37 °C.



Následující den byly kolonie nesoucí inzert přeočkovány na nové Petriho misky s 1,5% agarem v LB médiu s ampicilinem. Dalším krokem byl výběr kolonií, které mají zaklonovaný úsek o správné délce, pomocí klasické PCR s univerzálními primery M13-24

(F: CGCCAGGGTTTTCCAGTACGAC) a M13-26 (R: CAGGAAACAGCTATGAC). Vybrané kolonie byly inokulovány do 2 ml tekutého LB média s ampicilinem a takto inkubovány přes noc (37 °C, 180 rpm). Další den následovala izolace plazmidů pomocí kitu NucleoSpinPlasmid (Macherey – Nagel, Düren, Německo) dle návodu výrobce. Koncentrace byla změřena na fluorometru Qubit.

Vybrané klony byly zaslány firmě SEQme s.r.o. (Dobříš, Česko) na sekvenování. Ověření obdržených sekvencí probíhalo v programu Geneious a pomocí online nástroje BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) na webové stránce <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

### **3.7. Příprava sond pro komparativní genomovou hybridizaci (CGH)**

Princip nick translace spočívá v propojení protilehlých aktivit dvou enzymů, DNázy I a DNA polymerázy I. První vnáší náhodná jednořetězcová přerušení do molekuly DNA a druhá inkorporuje přítomné nukleotidy do vlákna. Vzhledem k tomu, že v reakci jsou přítomné značené a běžné nukleotidy, jako výsledek dostáváme fragmenty DNA značené rovnoměrně.

Byl použit vylepšený protokol popsany v práci (Kato et al. 2006): reakční směs obsahovala 1 µg DNA (izolována v kapitole 3.3.), 1x pufr pro Nick Translaci (5 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.0005% BSA), 0,01 M β-mercaptoethanol, 1 U/µl DNA polymerázy I (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), 2,5 x 10<sup>-4</sup> U/µl DNázy I (ThermoFisher Scientific), 0,05 mM dATP, dCTP a dGTP, 0,01 mM dTTP, 0,02 mM značeného nukleotidu (červené Cy3-dUTP pro samčí DNA a zelené ATTO-488-dUTP pro samičí DNA (obojí Jena Bioscience, Jena, Německo)) a byla doplněna milli-Q vodou do finálního objemu 20 µl. Takto připravené sondy byly inkubovány v thermocycleru při teplotě 15 °C po dobu minimálně 1,5 hodiny, však maximálně 3 hodiny 15 minut. Poté následovala inaktivace enzymů přidáním 2,2 µl Loading buffer (50% glycerol, 250 mM EDTA, 5,9 mM bromphenol blue). Alternativně byly použity Cy3 a ATTO-488 NT Labeling Kity (Jena Bioscience, Jena, Německo). Výroba sond probíhala dle návodu výrobce. Pro kontrolu velikostí produktu, která by se měla pohybovat okolo 500 bp, bylo použito 1,5 µl sondy na

elektroforézu na 1,5% agarózovým gelu. Zbytek byl uskladněn při -20 °C do následného použití.

### **3.8. Komparativní genomová hybridizace (CGH)**

V cytogenetice se metoda CGH používá hlavně pro nalezení potenciálních rozdílů mezi dvěma různými genomy, v našem případě genomu samce a samice zkoumaného druhu. Princip této metody spočívá v kompetici samčí a samičí celogenomové sondy o vazebná místa na samičím chromozomálním preparátu. Za podmínky přítomnosti pohlavního chromozomu W by měla samičí sonda tento chromozom zvýraznit, jelikož se nachází výhradně v samičím genomu. Účelem využití tohoto postupu v mé práci bylo kromě lokalizace chromozomu W i identifikace různých variant tohoto chromozomu.

Předem připravené celogenomové samičí i samčí sondy (300 ng každá, příprava viz kapitola 3.7.) byly smíchány v 1,5ml zkumavce s 25 µg DNA z lososích spermií, 1/10 celkového objemu 3M octanu sodného (pH 8,0) a 2,5násobkem celkového množství chlazeného 100% etanolu (-20 °C). Následovala precipitace směsi při teplotě -20 °C po dobu 15 minut a její centrifugace (4 °C, 14000 rpm) po stejnou dobu. Takto vytvořený supernatant byl odstraněn a k peletu bylo přidáno 200 µl 70% etanolu. Po pečlivém promíchání na vortexu byla směs centrifugována za stejných podmínek po dobu 5 minut. Vzniklý supernatant byl důkladně odstraněn, pelet byl rozpuštěn v 5 µl 100% deionizovaného formamidu (předehřátý na 37 °C) a ponechán inkubovat se při teplotě 37 °C. Po uplynutí 30 minut bylo ke vzorku přidáno 5 µl 20% dextran sulfátu ve 4xSSC. Následovala denaturace ve vodní lázni (90 °C) po dobu 5 minut a okamžité ochlazení vzorku na ledu. Poté byl vzorek ponechán prehybridizovat se při 37 °C 1,5 hodiny, aby se uskutečnila renaturace nejpočetnějších sekvencí.

V mezičase byl připraven samičí chromozomální preparát nejdříve postupným odvodněním ethanolovou řadou (70%, 80% a 100%) po dobu přibližně 1 minuty v každém. Po oschnutí a aplikování RNázy A (200 ng/µl) v 2x SSC byl preparát inkubován při 37 °C 1 hodinu ve vlhké komůrce s vrstvou papírové utěrky s 2xSSC. Dále následovala dvě promytí při pokojové teplotě ve 2x SSC a denaturace přidáním 100 µl 70% deionizovaného formamidu v 2xSSC v termobloku při 68 °C po dobu přesně 3,5 minuty. Prudce ochlazený preparát v 70%

etanolu (-20°C) po dobu 1 minuty byl následně odvodněn v 80% a 100% etanolu při pokojové teplotě přibližně 30 vteřin v každém.

Ihned po oschnutí byla nanese na prehybridizovaná hybridizační směs, preparát byl překryt krycím sklíčkem o velikosti 24x32 mm a zalepen tekutým lepidlem Rubbercement (Marabu, Bietigheim-Bissingen, Německo). Po ošetření preparátu následovala třídenní inkubace ve vlhké komůrce (37 °C). Po uplynutí stanoveného času byl preparát pro snadné odstranění krycího sklíčka ponořen na několik minut do 1% roztoku Tritonu X (Sigma – Aldrich, Burlington Massachusetts, USA) v 0,1x SSC při pokojové teplotě. Poté byl preparát promyt nejdříve ve stejném roztoku při 62 °C 5 minut a pak v 1% roztoku Kodak PhotoFlo v milli-Q vodě při pokojové teplotě. Na oschnutý preparát bylo nanese 25 µl směsi DABCO s DAPI (500 ng/ml) (obojí Sigma-Aldrich, Burlington Massachusetts, USA), která byla přikryta krycím sklíčkem o velikosti 24x40 mm. Nadbytečné množství směsi bylo jemně vytlačeno do filtračního papíru. Nakonec byl preparát zalakován lakem na nehty a ponechán ve 4 °C do následného prohlížení.

### **3.9. Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)**

Metoda FISH byla použita v této práci pro lokalizaci repetitivních sekvencí v genomu *L. marginata*. Pro mapování přímě značené mikrosatelitní sekvence byla připravená hybridizační směs obsahující předem připravenou sondu (300 ng, příprava viz kapitola 3.5.), 25 µg DNA z lososích spermii, 1/10 objemu 3M octanu sodného (pH 8) a 2,5násobné množství objemu studeného 100 % ethanolu. Následující postup byl totožný se CGH metodou (kapitola 3.8.) až na vynechanou 1,5hodinovou hybridizaci.

Pro mapování satelitních sekvencí značených biotinem byl použit upravený protokol Cabral-de-Mello (2021). Postup byl podobný jako u klasické FISH kromě odlišného množství sondy (50 ng), promývání preparátů a imunologické detekce sondy. Preparát s nanesenou hybridizační směsí byl inkubován ve vlhké komůrce při 37 °C přes noc. Další den po odstranění krycího sklíčka následovala série promytí preparátu: nejprve dvakrát po pěti minutách v 2xSSC při pokojové teplotě, dále za stálého míchání dvakrát v 0,1xSSC a jedenkrát v 2xSSC (oboje 42 °C, po 5 minutách). Vzorek byl poté přemístěn na 10 minut za stálého míchání do 2xSSC a inkubován 15 minut ve WBB roztoku (promývací blokovací pufr se složením 4xSSC, 0,1% Tween, 1% odtučněné mléko) (oboje pokojová teplota). Na takto připravený preparát bylo nanese 100 µl směsi protilátky streptavidinu konjugovaného se

Cy3 s WBB roztokem (9 µg/ml Cy3-streptavidin (Jackson ImmunoRes. Labs. Inc, USA) ve WBB). Po hodinové inkubaci ve vlhké komůrce (37 °C) byl preparát postupně třikrát opláchnut ve WBB roztoku za stálého míchání při teplotě 45 °C. Na mírně oschnutý preparát bylo aplikováno 25 µl směsi DABCO s DAPI (500 ng/ml) (obojí Sigma-Aldrich, Burlington Massachusetts, USA) a preparát byl překryt sklíčkem (24x40 mm). Po odstranění nadbytečného množství směsi vytlačení do filtračního papíru bylo sklíčko bylo zalakováno lakem na nehty. Preparát byl uskladněn ve 4 °C.

### 3.10. Prohlédnutí chromosomálních preparátů

Mikroskop Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss Jena, Oberkochen, Německo) byl použit k prohlédnutí preparátů z malpighických trubic pod objektivy 40x a 63x a preparátů po CGH a FISH pod objektivy 63x a 100x. Při prohlížení posledně zmíněných preparátů byly využity 3 barevné filtry: pro samičí celogenomovou sondu byl použit zelený filtr, pro samčí sondu červený filtr a modrý filtr byl aplikován pro pozorování chromozomů barvených DAPI. Snímky byly pořízené pomocí kamery Olympus CCD XM10 s programem cellSens 1.9 (Olympus, Německo). Výsledné obrazy byly upravené a složeny v programu Adobe Photoshop CS6.

### 3.11. Měření genomu

Pro měření genomu byla použita metoda průtokové cytometrie, popsána v práci Hejníčkova (2019). Měření probíhalo na fakultě Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích s pomocí Mgr. Petra Kouteckého, Ph.D. Cílem měření bylo odhalit případné rozdíly ve velikosti genomu v rámci populace, mezi rodinami s různými typy pohlavního chromozomu W, a taktéž případné rozdíly mezi pohlavími v rámci jedné rodiny.

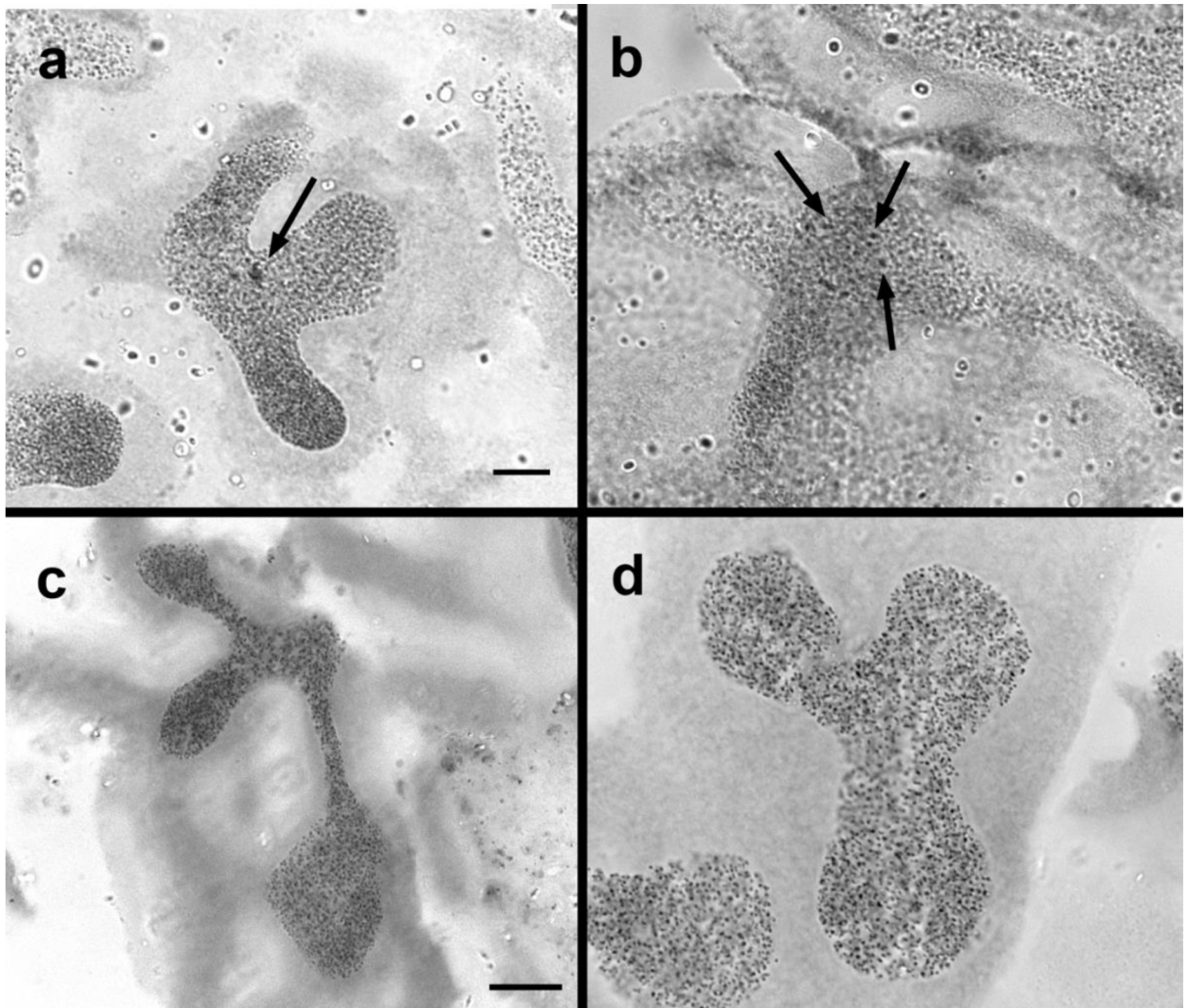
Jak materiál byly použité mozkové tkáně housenek (jedno ganglium) a dospělců (1/2 hlavy). Jako standard byly použity hlavy dospělců zavíječe moučného (*Ephestia kuehniella*) z chovů v naší laboratoři (1/2 hlavy). Během měření se však ukázalo, že velikost genomu je velice variabilní a u některých jedinců se překrývá s velikostí standardu. Proto byla jako druhý standard zavedena ruměnice pospolná (*Pyrrhocoris apterus*) z chovů v laboratoři Mgr. Davida Doležela, Ph.D. (ENTÚ, BC AV ČR), ze které se používalo celé mozkové ganglium. Postup byl následující: mozek larvy *L. marginata* byl vždy vypitván ve fyziologickém roztoku jako

první a neprodleně přenesen na Petriho misku s 500 µl čerstvě připraveného pufru (0,1 M Tris-HCl (pH 7,5), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 % Triton X- 100). Alternativně byla použita ½ hlavy dospělé. Následně byl přidán standard, buď ½ hlavy *E. kuehniella* nebo celé mozkové ganglium *P. apterus*. Obě tkáně byly co nejvíce rozsekány žiletkou a takto vytvořena suspenze byla přečištěn přes nylonový filtr do nové skleněné zkumavky. Objem byl doplněn o dalších 500 µl zmíněného pufru. Po přidání propidium jodidu (50 µg/ml) byly vzorky inkubovány po dobu 20 minut a následně analyzovány průtokovým cytometrem Partec CyFlow SL (Partec, Münster, Německo; nyní Sysmex). Analýza dat byla provedena Mgr. Petrem Kouteckým, Ph.D. pomocí softwaru FlowJo 10 (TreeStar, Inc., Ashland, OR, USA).

## 4. Výsledky

### 4.1. Sex chromatin

V této práci byli testováni jedinci třinácti rodin skvrnopásníka lískového z let 2021 a 2022 (seznam rodin uveden v Tabulce č.4) na přítomnost sex chromatinu v interfázních jádrech malpighických trubic. Přítomnost a vzhled sex chromatinu se u samic ukázaly být velmi variabilní jak v rámci druhu, tak i některých rodin, dokonce i v rámci jedince. U žádného ze studovaných samců nebyl spatřen (obrázek 1d). Výjimečně byla u nich pozorována drobná tělíska připomínající sex chromatin, důvodem by mohla být heterochromatizace genomu. Veškeré potomstvo samičího pohlaví dvou testovaných rodin (F21-06 a F21-07) obsahovalo pravidelný kulatý sex chromatin, který se jenom mírně lišil ve velikosti (obrázek 1a), zatímco potomstvo tří rodin (F21-03, F21-04 a F22-09) neobsahovalo žádný (obrázek 1c). Samičky jedné rodiny (F22-08) vykazovaly široké spektrum od přítomnosti sex chromatinu odlišného ve tvaru (klasický kulatý až různě fragmentovaný (obrázek 1b) až po jeho absenci. U několika rodin (F21-01, F22-04, F22-11) heterochromatinové tělísko nebylo nalezeno ve většině jader, ale v některých se náhodně vyskytlo. U jedné z testovaných rodin (F22-05) byl zjištěn deformovaný sex chromatin. Na obrázku 1 jsou uvedeny všechny zaznamenané varianty sex chromatinu.



**Obr. 1: Polyploidní interfázní jádra malpighických žláz barvená lakto-aceto-orceinem s a bez sex chromatinu (SC). Jádro ♀ s jedním kulatým tělískem SC (a), jádro ♀ s SC fragmentovaným do více menších tělísek (b), jádro ♀ bez SC (c), jádro ♂ bez SC (d). Měřítko (a,b,d) = 10 µm, měřítko(c) = 20 µm.**

**Tabulka č.4: Informace o rodinách *L. marginata*.** Rok = rok odchycení samice – zakladatelky rodiny. Rodina = kód matky zakladatelky a celé její rodiny. SC+ = přítomnost sex chromatinu, SC- = absence sex chromatinu. W-1 = typ chromozomu W zvýrazněný samičí zelenou sondou, dva až čtyři heterochromatinové bloky; W-2 = typ chromozomu W s více než polovinou značenou rovnoměrně oběma sondami, tj. žlutě, jeden centrální heterochromatinový blok; W-4 = typ chromozomu W zvýrazněný samičí zelenou sondou, bez heterochromatinových bloků; W-5 = typ chromozomu W zvýrazněný samičí zelenou sondou, jeden heterochromatinový blok. N.d. = neurčeno.

| Rok  | Rodiny | Lokalita   | Sex chromatin  | Chromozom W | Ověřeno               | Původ   |
|------|--------|--|--|-------------|-----------------------|---|
| 2019 | F19-02 | Vrbenské rybníky, České Budějovice               | SC+  | W-1         | CGH                   | Demková 2022                                    |
|      | F19-05 | Novohradské hory (obec Kuří, Benešov nad Černou) | SC+  | W-1         | CGH                   | Demková 2022                                    |
|      | F19-06 | Novohradské hory (obec Kuří, Benešov nad Černou) | SC+  | W-1         | CGH                   | Demková 2022                                    |
| 2020 | F20-01 | Vrbenské rybníky, České Budějovice               | variabilní data (SC+, fragmentovaný až úplna absence)              | W-2         | CGH                   | Demková 2022                                    |
|      | F20-03 | Javorník pod Veličkou                            | variabilní data (u některých samiček SC+, u některých SC-)         | univalent   | CGH                   | Demková 2022                                    |
| 2021 | F21-01 | České Budějovice (Braníšovský les)               | vyriabilní data (ve většině jader SC-, občas SC+)                  | W-2         | CGH                   | Tato práce                                      |
|      | F21-02 | Novohradské hory (obec Kuří, Benešov nad Černou) | nd   | W-1         | CGH                   | Tato práce                                      |
|      | F21-03 | Novohradské hory (obec Kuří, Benešov nad Černou) | SC-  | W-4         | CGH                   | Tato práce                                      |
|      | F21-04 | Novohradské hory (obec Kuří, Benešov nad Černou) | SC-  | W-2         | CGH                   | Tato práce                                      |
|      | F21-06 | Novohradské hory (obec Kuří, Benešov nad Černou) | SC+  | W-2         | CGH                   | Tato práce                                      |
|      | F21-07 | Novohradské hory (obec Kuří, Benešov nad Černou) | SC+  | W-5         | CGH                   | Tato práce                                      |
| 2022 | F22-04 | Vrbenské rybníky, České Budějovice               | vyriabilní data (ve většině jader SC-, občas fragmentovaný)        | W-2         | na základě morfologie | Tato práce + výsledky RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D. |
|      | F22-05 | Vrbenské rybníky, České Budějovice               | SC+ , deformovaný  | W-2         | na základě morfologie | Tato práce + výsledky RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D. |
|      | F22-08 | České Budějovice (Braníšovský les)               | vyriabilní data (ve většině jader SC+, občas fragmentovaný až SC-) | W-2         | na základě morfologie | Tato práce + výsledky RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D. |
|      | F22-09 | České Budějovice (Braníšovský les)               | SC-  | univalent   | CGH                   | Tato práce + výsledky RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D. |
|      | F22-11 | České Budějovice (Braníšovský les)               | vyriabilní data (převážně SC-, občas fragmentovaný)                | W-2         | na základě morfologie | Tato práce + výsledky RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D. |
|      | F22-12 | Vrbenské rybníky, České Budějovice               | velice fragmentovaný   | W-2         | na základě morfologie | Tato práce + výsledky RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D. |
|      | F22-13 | České Budějovice (Braníšovský les)               | nd   | nd          | na základě morfologie | Tato práce + výsledky RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D. |



## 4.2. Výsledky CGH

Přítomnost a charakter pohlavního chromozomu W byly u všech zkoumaných rodin skvrnopásníka (s výjimkou šesti) testovány pomocí metody CGH (Tabulka č.4 a obrázek 2). Zpravidla je bivalent pohlavních chromozomů kvůli heterochromatizaci chromozomu W nápadně odlišný od autozomů. U *L. marginata* je navíc celý bivalent chromozomů WZ jasněji obarven DAPI, takže je možné ho snadno odlišit od ostatních chromozomů. Jak již bylo zjištěno v diplomové práci Demková (2022), u tohoto druhu existuje několik typů chromozomů W lišících se množstvím, pozicí a obsahem heterochromatinových bloků. V diplomové práci (Demková 2022) byly úspěšně definovány a popsány tři typy – W-1, W-2 a W-3. V této práci byly objeveny další typy pohlavního chromozomu W – W-4 a W-5.

První typ (W-1) se vyskytoval u jedné rodiny z roku 2021 – F21-02. U téhle rodiny sex chromatin nebyl testován. U tohoto chromozomu W jsou 1/3 až 2/3 délky intenzivně značeny samičí zelenou sondou. V této části chromozomu se také nachází dva (v některých případech až čtyři) heterochromatinové bloky značené zeleně, jeden terminální a druhý subterminální. Zbytek chromozomu je zabarven žlutě, protože samičí a samčí sonda hybridizují se stejnou silou.

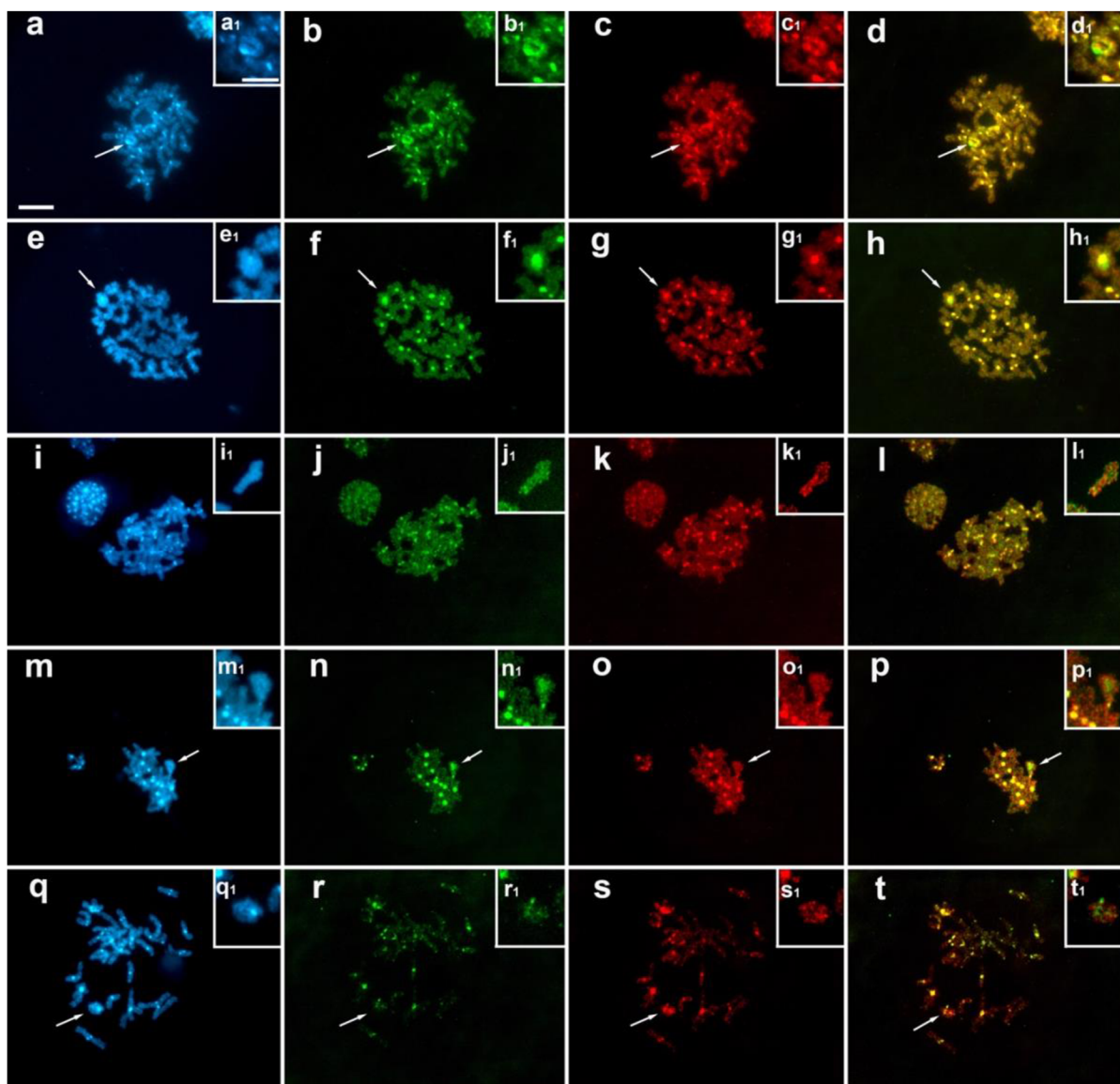
Druhý typ (W-2) figuroval u tří rodin z roku 2021 a pěti z roku 2022. Vzhled a podoba sex chromatinu byla vysoce variabilní. U tohoto typu chromozomu W byla přibližně polovina celkové délky zvýrazněna samičí zelenou sondou, zatímco zbytek byl značen žlutě, tj. rovnoměrně oběma sondami. Na rozdíl od prvního typu disponoval pouze jedním heterochromatinovým blokem v centrální části chromozomu, který byl zvýrazněn oběma sondami stejně intenzivně.

Třetí typ chromozomální konstituce původně uvedený jako W-3 byl v této práci zaznamenán u rodiny F22-09. Sex chromatin u této rodiny nebyl přítomen. Metoda CGH v práci Demková (2022) u typu W-3 u jiné rodiny nedokázala jasně definovat pohlavní chromozom W, jelikož se u tohoto typu v pachytenních jádrech nachází DAPI pozitivní objekt, ke kterému sondy hybridizovaly srovnatelně. Svou šířkou ale spíše připomínal univalent a je pravděpodobné, že se ve skutečnosti jedná spíše u univalent chromozomu Z. Stejný výsledek byl zaznamenán i v této práci, kdy byl v pachytenních jádrech u rodiny F22-09 nalezen chromozom bez heterochromatinového bloku, který byl stejně značen samčí i samičí sondou. V některých jádrech byl zaznamenán v podobě tenčího standardně dlouhého chromozomu, v jiných jako kratší objekt přibližně stejně široký jako ostatní bivalenty, což napovídá, že se

patrně jedná o univalent chromozomu Z, který je v některých jádrech ohnutý do tvaru písmene U.

U rodiny F21-03 byl poprvé objeven čtvrtý typ pohlavního chromozomu, a to W-4. Sex chromatin nebyl nalezen u této rodiny. Všem samicím z této rodiny v malpighických žlázách chyběl sex chromatin. Na chromozomu W nebyly přítomny žádné heterochromatinové bloky. Podél celé své délky byl zvýrazněn výrazně více samičí sondou (tj. zeleně).

Poslední nalezený typ, W-5, byl nalezen u rodiny F21-07. Samičky této rodiny měly klasický sex chromatin. Jedná se o chromozom W, který je opět zvýrazněn samičí sondou podél své délky a disponuje jedním terminálním heterochromatinovým blokem, který je více značen samičí sondou.



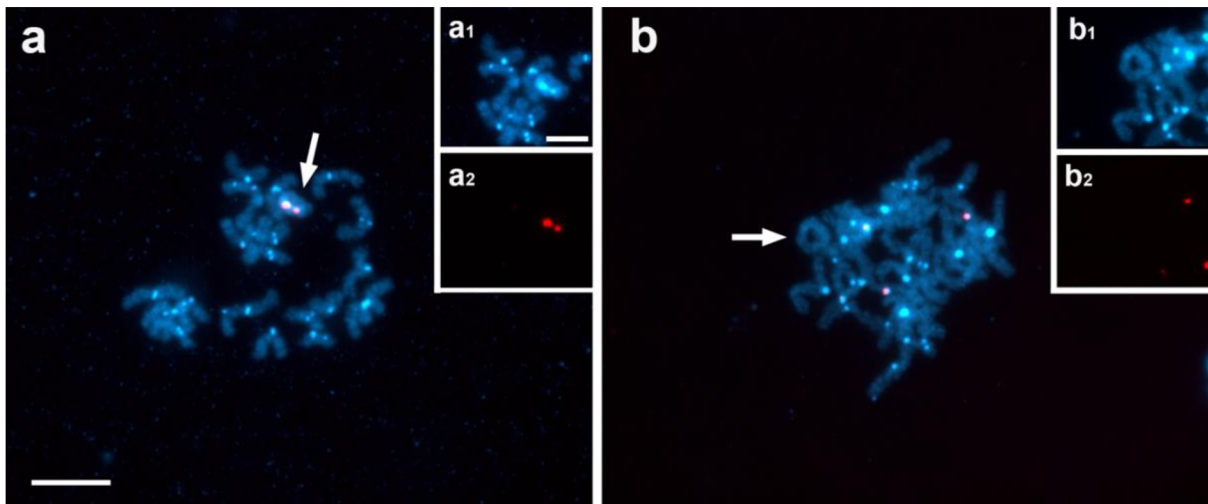
**Obr. 2: Komparativní genomová hybridizace na pachytenních oocytech samiček s různými typy chromozomu W.** Podbarvení DAPI obrázků (a, e, i, m, q) a výřezů (a<sub>1</sub>, e<sub>1</sub>, i<sub>1</sub>, m<sub>1</sub>, q<sub>1</sub>), obrázky (b, f, j, n, r) a výřezy (b<sub>1</sub>, f<sub>1</sub>, j<sub>1</sub>, n<sub>1</sub>, r<sub>1</sub>) se samičí sondou značenou zeleně, obrázky (c, g, k, o, s) a výřezy (c<sub>1</sub>, g<sub>1</sub>, k<sub>1</sub>, o<sub>1</sub>, s<sub>1</sub>) se samčí sondou značenou červeně, překryv samičí a samčí sondy na obrázcích (d, h, l, p, t) a výřezech (d<sub>1</sub>, h<sub>1</sub>, l<sub>1</sub>, p<sub>1</sub>, t<sub>1</sub>). W-1 (a-d), W-2 (e-h), univalent (i-l), W-4 (m-p) a W-5 (q-t). Šipka ukazuje na bivalent WZ. Měřítka pro obrázky = 10 μm, měřítka pro výřezy = 5 μm.

### 4.3. Analýza repetitivních sekvencí

#### 4.3.1. Mikrosatelitní sekvence

Předchozí analýza provedená školitelkou ukázala, že heterochromatinové bloky, včetně těch na pohlavním bivalentu WZ, obsahují velké množství mikrosatelitních sekvencí (RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D., osobní sdělení). Mapování mikrosatelitů ukázalo, že různé typy pohlavního chromozomu W se skutečně liší obsahem heterochromatinových bloků. V této práci byl použit mikrosatelit miSAT-03, který jako jediný sedal do heterochromatinových bloků chromozomu W-1 a zároveň jen minimálně hybridizoval do autosomálních bloků (obrázek 3). Důvodem jeho použití v této práci bylo podezření, že chromozomy, které jsou při CGH výrazně značeny hlavně samičí sondou, ale liší se počtem heterochromatinových bloků, mohou mít ve skutečnosti různý obsah.

Jak již bylo zmíněno, počet heterochromatinových bloků u W-1 u rodiny F21-02 byl variabilní a pohyboval se mezi dvěma a čtyřmi. Rovněž byly nalezeny další druhy chromozomu W (W-4 a W-5) u dvou rodin z roku 2021, které byly zvýrazněné samičí celogenomovou sondou s odlišným počtem heterochromatinových bloků oproti W-1. Mapování mikrosatelitu miSAT-03 pomohlo identifikovat W-1 u rodiny F21-02 a ujistit se, že W-4 je skutečně další typ chromozomu W u skvrnopásníka, jelikož mikrosatelit sedal jen na pár autozomálních bloků a nebyl přítomen na chromozomu W. U rodiny F21-07 s typem chromozomu W-5 nebylo možné experiment provést kvůli nedostatku preparátů.



**Obr. 3: Fluorescenční *in situ* hybridizace mikrosatelitní sondy miSAT-03 na rodinách s různými typy chromozomu W.** Překryv mikrosatelitní sondy značené červeně a DAPI podbarvení na obrázcích (a,b), podbarvení výřezů pomocí DAPI (a<sub>1</sub>,b<sub>1</sub>), překryv mikrosatelitní sondy značené červeně a výřezů podbarvených DAPI (a<sub>2</sub>, b<sub>2</sub>). W-1 (a), W-2 (b). Šipky ukazují na bivalent WZ. Měřítko pro obrázky = 10 μm, měřítko pro výřezy = 5 μm.

#### 4.3.2. Satelitní sekvence

Komparativní analýza repetitivní DNA v genomech tří samců a tří samic zastupujících různé typy chromozomu W (W-1 a W-2) byla provedena školitelkou pomocí programu RepeatExplorer. Byly nalezeny čtyři satelitní sekvence, které podle RepeatExploreru zaujímaly v genomu skvrnopásníka alespoň 0,01 % genomu: Lmar-SAT-01 (0,8 %), Lmar-SAT-02 (0,088 %), Lmar-SAT-03 (0,063 %) a Lmar-SAT-04 (0,012 %). Výsledky komparativní analýzy jsou uvedeny v Tabulce č.5, kde je u každé satelitní DNA uveden poměr průměrného množství čtení (readů) u všech tří samic a samců. Čili pokud je příslušný satelit zastoupen v průměru stejně u obou pohlaví, je hodnota 1, sekvence obohacené u samic mají hodnotu vyšší než jedna, obohacené u samců menší než jedna. Analýza ukázala, že Lmar-SAT-01 a Lmar-SAT-02 by měly být obohacené na obou typech W srovnatelně, Lmar-SAT-03 by měl být výrazně obohacený u W-2 a Lmar-SAT-04 by měl být W-obohecený u obou rodin, ale zejména na W-2.

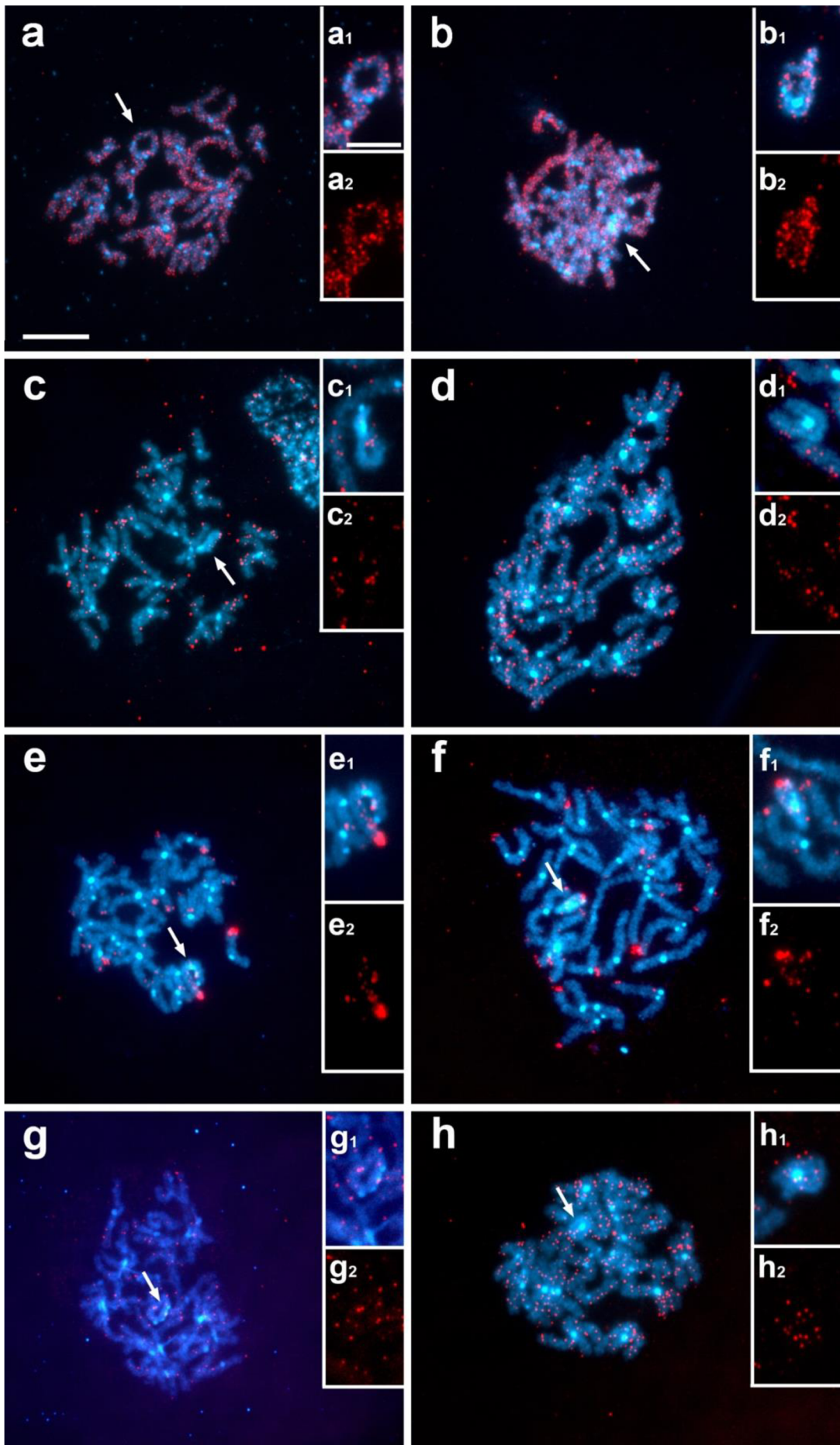
Tyto satelity byly následně amplifikovány z genomové DNA pomocí PCR, osekvenovány a zamapovány pomocí FISH na chromozomálních preparátech z ovarii samic (obrázek 4). Vzhledem k nedostatku preparátů a zároveň potřebě ověřit některé předchozí

výsledky byly použity preparáty z předchozích let, které připravila má kolegyně Miriam Demková. Byly vybrány rodiny s pohlavním chromozomem W-1 a W-2 pro porovnání výskytu jednotlivých satelitů. Ukázalo se, že heterochromatinové bloky skvrnopásníka nejsou tvořené satelity, jelikož všechny satelity hybridizovaly na jiných místech v genomu. Hybridizace satelitů měla podobný pattern u obou rodin, až na satelit Lmar-SAT-03 (obrázek 4e, f). Satelit Lmar-SAT01 byl hojně zastoupen v genomu nejen na autozomech, ale také na bivalentu pohlavních chromozomů WZ (obrázek 4a, b). Sekvence dvou satelitů, Lmar-SAT02 a Lmar-SAT04, tvoří početné ojedinělé klastry převážně na autozomech. Pokud byl hybridizační signál přítomen na bivalentu pohlavních chromozomů, bylo to opět mimo heterochromatinový blok (obrázek 4c, d, g, h).

Nejzajímavější z hlediska pohlavních chromozomů byl satelit Lmar-SAT-03 (obrázek 4e, f), u kterého se pattern hybridizace lišil mezi rodinami s W-1 a W-2. Kromě sporadického zastoupení na některých autozomech a jednoho výrazného terminálního autosomálního klastru, vydával silnější signál v terminálním úseku WZ bivalentu mimo heterochromatinové bloky (obrázek 4, e, f). Přestože se klastr nacházel u obou rodin, silnější signál byl na chromozomu W-1 (obrázek 4e). Při důkladnější analýze byl pozorován zvláštní pattern jemných hybridizačních signálů, které se vyskytovaly po celé délce bivalentu WZ a nikde jinde v genomu (obrázek 4e, e<sub>1</sub>, e<sub>2</sub>). Tento jemný hybridizační signál byl později pozorován i u pohlavního bivalentu/univalentu u rodiny F20-03 s chromozomem W-3 (obrázek 5). Na tomto útvaru chyběl silný terminální signál, ale byl přítomen pattern jemných signálů, což ukazuje, že se jedná o pohlavní chromozom nebo chromozomy.

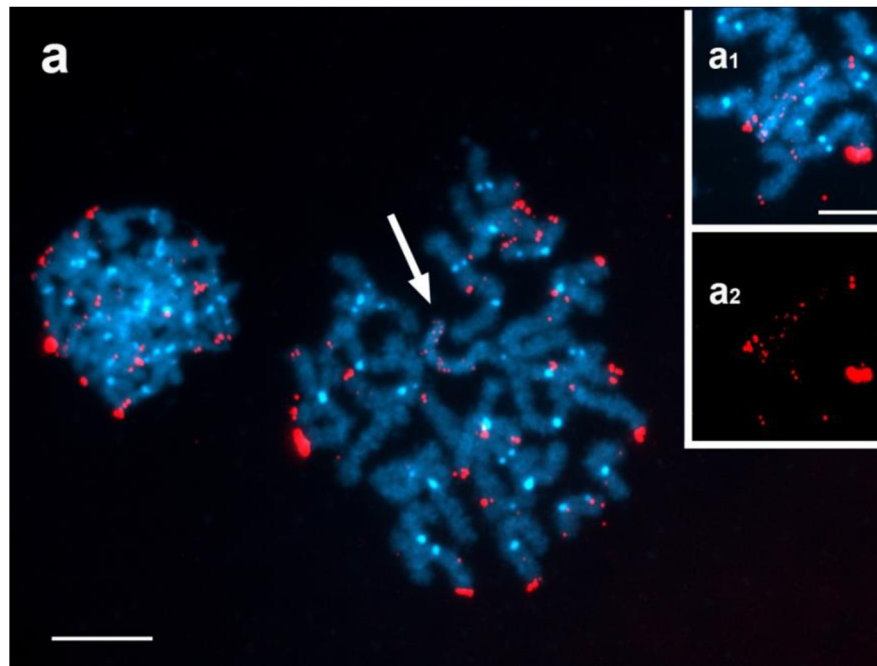
**Tabulka č.5. Výsledky komparativní analýzy porovnávající množství jednotlivých satelitů u samců a samic z rodin s chromozomem W-1 a W-2. U jednotlivých satelitů a obou rodin jsou uvedeny poměry součtů počtů čtení u samic a samců.**

| Satelit | Poměr čtení ♀ / ♂ u W-1 | Poměr čtení ♀ / ♂ u W-2 |
|---------|-------------------------|-------------------------|
| SAT-01  | 0,947                   | 0,853                   |
| SAT-02  | 1,300                   | 1,182                   |
| SAT-03  | 0,879                   | 2,730                   |
| SAT-04  | 2,750                   | 4,500                   |





**Obr. 4: Fluorescenční *in situ* hybridizace satelitních sond (Lmar-SAT-01 (a,b), Lmar-SAT-02 (c,d), Lmar-SAT-03 (e,f), Lmar-SAT-04 (g,h)) na rodinách s W-1 (a, c, e, g) a W-2 (b, d, f, h) na pachytenních jadrech ♀ *L. marginata*. Překryv satelitní sondy značené červeně a DAPI podbarvením na obrázcích (a-h), překryv satelitní sondy značené červeně a DAPI podbarvením výřezů (a<sub>1</sub>, b<sub>1</sub>, c<sub>1</sub>, d<sub>1</sub>, e<sub>1</sub>, f<sub>1</sub>, g<sub>1</sub>, h<sub>1</sub>), satelitní sonda značená červeně výřezů (a<sub>2</sub>, b<sub>2</sub>, c<sub>2</sub>, d<sub>2</sub>, e<sub>2</sub>, f<sub>2</sub>, g<sub>2</sub>, h<sub>2</sub>). Šipky ukazují na bivalent WZ. Měřítko pro obrázky (a-h) = 10 μm, měřítko pro výřezy (a<sub>1</sub>-h<sub>2</sub>) = 5 μm.**



**Obr. 5: Fluorescenční *in situ* hybridizace satelitní sondy Lmar-SAT03 na rodině F20-03 s univalentem (původně W-3). Překryv satelitní sondy značené červeně a DAPI podbarvení na obrázku (a), překryv satelitní sondy značené červeně a DAPI podbarvení výřezu (a<sub>1</sub>), satelitní sonda značená červeně ve výřezu (a<sub>2</sub>). Šipky ukazují na bivalent WZ. Měřítko pro obrázky = 10 μm, měřítko pro výřezy = 5 μm.**

#### 4.4. Měření genomu

Expanze repetitivní DNA je považována za jeden ze způsobů zvětšování eukaryotního genomu. Vzhledem k přítomnosti velkého množství heterochromatinových bloků v genomu skvrnopásníka tvořených mikrosatelitními sekvencemi, bylo použito v této práci měření genomu k zjištění případných vnitrodruhových rozdílů. Celkem byla změřena velikost genomu u 21 jedinců z 11 rodin z roku 2019-2022, z toho 15 samců a 6 samic (Tabulka č.6). Měření byla nejprve prováděna jen na samcích, aby výsledky nebyly ovlivněny přítomností pohlavního chromozomu W, který se vykytuje pouze u samic a podle výsledků jiných metod je značně variabilní v počtu a obsahu heterochromatinových bloků. Abychom ověřili, jak velké rozdíly mezi jedinci představují ve skutečnosti chyby měření, změřili jsme velikost genomu u čtyřech dospělců (dvou samic a dvou samců), u kterých se používá na jedno měření půlka hlavy, každý vzorek dvakrát. Maximální rozdíl v rámci jedince byl 0,77 %, nejmenší 0,12 %. (označeny v tabulce písmeny „a“ a „b“).

Naměřené hodnoty nepřevyšovaly 1 pg s nejmenší naměřenou hodnotou 0,729 pg (M22-12-43) a největší - 0,947 pg (M19-04-03). Rozdíl mezi nejmenším a největším genomem skvrnopásníka tvoří 23 %, což nemůže být chybou nebo odchylkou měření. V průměru v rámci rodiny měli bratři podobnou velikost, kromě rodiny F21-03, kde dva bratři měli rozdíl ve velikostech genomu až 12 %. Porovnání mezi sourozenci odlišného pohlaví se lišilo mezi rodinami. Velikosti genomu byly podobné u rodiny F21-07, zatímco u rodiny F22-13 byl rozdíl 6,6 %. Byl také zaznamenán významný rozdíl mezi samicemi z rodin s odlišným typem chromozomu W. Průměr naměřených hodnot u rodiny F22-08 (W-2) byl 0,763 a u rodiny F21-07 (W-5) – 0,828, což odpovídá 8 % rozdílu.



**Tabulka č.6: Informace o měření genomu *L. marginata*. M = samec, F = samice. a, b = měření stejného jedince. Nd = neurčeno.**

| Jedinec    | Typ W     | Lokalita   | Velikost genomu (pg) | Standard                   |
|------------|-----------|--|----------------------|----------------------------|
| M19-02-09  | W-1       | Vrbenské rybníky, České Budějovice               | 0,894                | <i>Pyrrhocoris apterus</i> |
| M19-04-03  | W-1       | Vrbenské rybníky, České Budějovice               | 0,947 (největší)     | <i>Pyrrhocoris apterus</i> |
| M20-01-03  | W-2       | Vrbenské rybníky, České Budějovice               | 0,934                | <i>Pyrrhocoris apterus</i> |
| M20-01-04  | W-2       | Vrbenské rybníky, České Budějovice               | 0,922                | <i>Pyrrhocoris apterus</i> |
| M21-01-02  | W-2       | České Budějovice (Branišovský les)               | 0,838                | <i>Ephestia kuehniella</i> |
| M21-01-04  | W-2       |  | 0,892                | <i>Ephestia kuehniella</i> |
| M21-03-12  | W-4       | Novohradské hory (obec Kuří, Benešov nad Černou) | 0,860                | <i>Pyrrhocoris apterus</i> |
| M21-03-03  | W-4       | Novohradské hory (obec Kuří, Benešov nad Černou) | 0,755                | <i>Ephestia kuehniella</i> |
| M21-07-08  | W-5       | Novohradské hory (obec Kuří, Benešov nad Černou) | 0,834                | <i>Pyrrhocoris apterus</i> |
| F21-07-10  | W-5       | Novohradské hory (obec Kuří, Benešov nad Černou) | 0,836                | <i>Pyrrhocoris apterus</i> |
| F21-07-02  | W-5       | Novohradské hory (obec Kuří, Benešov nad Černou) | 0,820                | <i>Pyrrhocoris apterus</i> |
| F22-08-40  | W-2       | České Budějovice (Branišovský les)               | 0,744                | <i>Ephestia kuehniella</i> |
| F22-08-41  | W-2       | České Budějovice (Branišovský les)               | 0,770                | <i>Ephestia kuehniella</i> |
| F22-08-42a | W-2       | České Budějovice (Branišovský les)               | 0,775                | <i>Pyrrhocoris apterus</i> |
| F22-08-42b | W-2       | České Budějovice (Branišovský les)               | 0,776                | <i>Pyrrhocoris apterus</i> |
| M22-09-33  | univalent | České Budějovice (Branišovský les)               | 0,784                | <i>Pyrrhocoris apterus</i> |
| M22-09-41  | univalent | České Budějovice (Branišovský les)               | 0,800                | <i>Ephestia kuehniella</i> |
| M22-09-42a | univalent | České Budějovice (Branišovský les)               | 0,807                | <i>Ephestia kuehniella</i> |
| M22-09-42b | univalent | České Budějovice (Branišovský les)               | 0,808                | <i>Ephestia kuehniella</i> |
| M22-12-30  | W-2       | Vrbenské rybníky, České Budějovice               | 0,795                | <i>Pyrrhocoris apterus</i> |
| M22-13-40a | nd        | České Budějovice (Branišovský les)               | 0,738                | <i>Pyrrhocoris apterus</i> |
| M22-13-40b | nd        | České Budějovice (Branišovský les)               | 0,758                | <i>Ephestia kuehniella</i> |
| M22-13-43  | nd        | České Budějovice (Branišovský les)               | 0,729 (nejmenší)     | <i>Pyrrhocoris apterus</i> |
| F22-13-44a | nd        | České Budějovice (Branišovský les)               | 0,775                | <i>Ephestia kuehniella</i> |
| F22-13-44b | nd        | České Budějovice (Branišovský les)               | 0,781                | <i>Ephestia kuehniella</i> |

## 4. Diskuze

Dříve patřil skvrnopásník lískový mezi cytogeneticky neprozkoumané druhy motýlů, protože nebyla k dispozici žádná data o počtu chromozomů, pohlavních chromozomech nebo velikosti genomu. První informace přinesla diplomová práce Miriam Demkové (2022), ve které byl popsán variabilní sex chromatin, který se u tohoto druhu nachází i u samic z jedné lokality. To indikovalo přítomnost variabilního chromozomu W nebo variabilitu v přítomnosti W. U zavíječe moučného byla pozorována podobná variabilita ve vzhledu a přítomnosti sex chromatinu, která byla způsobena chromozomální přestavbou zahrnující chromozom W (Traut, Weith a Traut 1986). Následně bylo pomocí CGH zjištěno, že se u tohoto druhu vyskytuje několik typů pohlavního chromozomu W. Tři již známé typy uspořádání pohlavních chromosomu (W-1, W-2 a W-3) se podařilo najít i v této práci a mezi nově analyzovanými rodinami byly identifikovány další dva typy chromosomu W – W-4 a W-5. Tyto typy se lišily množstvím a pozicí heterochromatinových bloků na chromosomu W. Lišil se i obsah bloků: u typu W-1 výrazně převažovala hybridizace samičí sondy, u typu W-2 obě sondy hybridizovaly do jediného heterochromatinového bloku. W-4, který nenesl žádný heterochromatinový blok, a W-5, který nesl jeden, byly více naznačeny samičí sondou, což svědčí o tom, že obsahují sekvence, které jdou obohacené u samice. Typ W-3 nebyl pomocí CGH odlišen od zbytku genomu a patrně se jedná o univalent chromozomu Z. Podobně jako v práci Demková (2022), ani zde nebyla nalezena korelace mezi odlišným vzhledem a formou sex chromatinu a typem chromozomu W, jelikož byly nalezeny různé typy sex chromatinu na preparátech jedné samice nebo mezi sestrami ze stejné rodiny.

Dalším zajímavým znakem v karyotypu skvrnopásníka jsou heterochromatinové bloky, nacházející se na téměř všech chromozomech. Vzhledem k tomu, že nejvíce heterochromatizovanou částí genomu motýlů bývá diferencovaný pohlavní chromozom W (Sahara, Yoshido, a Traut 2012), heterochromatinové bloky na autozomech vzbuzují otázky ohledně jejich složení, způsobu a důvodu tak abundantního rozšíření. Dle ústního sdělení školitelky, analýza sekvenačních čtení z genomů *L. marginata* a mapování mikrosatelitních sekvencí hojně zastoupených v genomu potvrdila jejich vysokou abundanci v heterochromatinových blocích. Dokonce u různých typů pohlavního chromozomu W hybridizovaly testované mikrosatelitní sekvence odlišně.

Na zmíněné výsledky navazovala tato diplomová práce, jejíž hlavním cílem bylo zjistit, zda heterochromatinové bloky jsou tvořené dalším typem repetitivních sekvencí –

satelity a případné odlišení různých druhů chromozomu W mapováním mikrosatelitní sekvence do genomu.

#### **4.1. Varianty chromozomu W**

Aby bylo možné analyzovat repetitivní DNA na různých chromozomech W, bylo potřeba získat nový materiál, protože původní rodiny použité v práci Demkové již nebyly k dispozici. U každé rodiny bylo potřeba zjistit, jaký má sex chromatin a jaký typ chromozomu W, k čemuž se používala CGH nebo později analýza morfologie chromozomu W, tj. počet a pozice heterochromatinových bloků. Variabilita přítomnosti a podoby sex chromatinu odpovídala té, která byla popsána v práci Demkové (2022). Byly nalezeny samice bez sex chromatinu a také s klasickým kulatým, nebo fragmentovaným, nebo deformovaným sex chromatinem různých velikostí.

Hlavní rozdíl mezi odlišnými typy chromozomu W zvýrazněnými samičí sondou (W-1, W-4 a W-5) byl počet heterochromatinových bloků. Přestože W-4 a W-5 byly pozorovány ve více jádrech u více jedinců samičího pohlaví, identifikace dalších typů W nebyla dostatečně spolehlivá kvůli variabilitě v počtu bloků u W-1, kde se jejich počet pohyboval mezi dvěma až čtyřmi, což mohlo být způsobeno různou kondenzací chromozomu W nebo tím, že se ve skutečnosti jedná o různé typy chromozomů W, na kterých se nezávisle rozšířily různé repetitivní sekvence. K ověření těchto teorií byla použita hybridizace s mikrosatelitem miSAT-03, u kterého bylo zjištěno, že se nachází v heterochromatinových blocích na chromozomu W-1 a zároveň se téměř nenachází jinde v genomu ani na W-2 (Zrzavá, nepublikováno). Sonda podle očekávání hybridizovala na chromozom W u rodiny F21-02, který podle CGH i morfologie odpovídal typu W-1. Sonda naopak vůbec nehybridizovala na chromozom W u rodiny F21-03 s chromozomem W-4 bez heterochromatinového bloku, což byl důkaz toho, že se jedná o nový typ chromozomu W. Pokus se bohužel nepodařilo provést u typu W-5 s jedním heterochromatinovým blokem, což bylo způsobeno nedostatkem preparátů a ztrátou rodiny F21-07, u které jedině byl tento chromozom nalezen.

Na nedostatek materiálu jsme v průběhu práce naráželi opakovaně, protože až donedávna byla každá rodina udržována jen maximálně dvě generace do podzimu, kdy jedinci vstupovali do diapauzy. Většinou byly ale všechny samice zcela zpracovány na chromosomální preparáty ještě dříve. Nyní, když se spektrum metod aplikovaných na každou

rodinu značně rozšířilo, jsou již zkoumané rodiny udržovány v laboratorních chovech, což umožní pokračovat v detailním výzkumu variant chromozomu W bez nutnosti chytat další jedince z volné přírody.

## 4.2. Satelitní sekvence

Neobvykle velké množství heterochromatinu u *L. marginata* svědčí o mimořádné aktivitě repetitivních sekvencí u tohoto druhu. Zpravidla je genom motýlů tvořen málo kondenzovaným chromatinem, zatímco heterochromatin je umístěn na pohlavním chromozomu W (Sahara et al. 2012). Donedávna jedinou známou výjimku tvořil skvrnopásník angreštový (*Abraxas grossulariata*), který měl velké množství intersticiálně a terminálně umístěných bloků na autozomech a pohlavních chromozomech. Je zajímavé, že jeho příbuzný druh, s. jilmový (*Abraxas sylvata*) měl jen nepatrné množství terminálních heterochromatinových bloků (Zrzavá et al. 2018). Vzhledem k tomu, že často jsou tyto struktury tvořeny mobilními elementy nebo tandemovými opakování (López-Flores a Garrido-Ramos 2012), odlišné složení chromozomu W i u velice příbuzných druhů naznačuje vysokou dynamičnost v šíření repetitivních struktur. U motýlů tandemová opakování nejsou dostatečně prostudována, což bylo spojené s absencí vhodných programů a algoritmů na vyhledávání repetitivní DNA u nemodelových organismů. V dnešní době se k tomuto s oblibou využívá RepeatExplorer, který byl použit mou školitelkou na vyhledávání satelitních sekvencí hojně zastoupených v genomu *L. marginata*.

Na rozdíl od bělásky zelného (*Pieris brassicae*), u kterého satelitní sekvence tvořily významnou složkou heterochromatinových bloků (Pinkrová 2020), analýza skvrnopásníka ukázala, že žádný ze zmíněných satelitů nesadal do bloků kondenzovaného chromatinu. Hlavní složkou těchto bloků jsou tak s největší pravděpodobností mikrosatelity, které se v těchto místech již podařilo prokázat. Například u ptáků jsou nalezeny případy, kdy nehledě na společný původ chromozomu W, mikrosatelitní DNA dokáže ovlivnit morfologii a složení heterochromatinu tohoto chromozomu. U dvou druhů ptáků z řádu lelkové (Caprimulgiformes), potu obecného (*Nyctibius griseus*) a lelka kopistoocasého (*Hydropsalis torquata*), v rozdílné velikosti chromozomu W hraje roli repetitivní mikrosatelitní DNA. Několik mikrosatelitů je přítomno pouze u druhu s větším chromozomem W (potu obecného), zatímco u lelka kopistoocasého chybí (Santos de Souza et al. 2020). U motýlů prozatím byly nalezeny mikrosatelitní sekvence na chromozomu W u bource morušového, ale nejsou jeho

významnou složkou (Traut et al. 2013). Cabral-de-Mello (2021) se domnívá, že chromozom *W D. postlineella* bude bohatý na mobilní elementy a mikrosatelitní sekvence, jelikož není tvořen satelitními sekvencemi. Podobně existuje možnost, že mobilní elementy, což je typ repetitivní DNA, který u *L. marginata* dosud nebyl zkoumán, se budou vyskytovat v heterochromatinových blocích.

### 4.3. Velikost genomu

Genom motýlů je poměrně malý, největší nedosahuje ani 2 pg (Gregory 2002c, Gregory a Hebert 2003). V tomto ohledu je genom *L. marginata* i se svou největší naměřenou hodnotou 0,947 pg typickým motýlím genomem. Co patrně typické není, je velká vnitrodruhová variabilita ve velikosti genomu, kdy rozdíl mezi jedinci stejného pohlaví s největším a nejmenším nalezeným genomem představoval 23 %. Zajímavé je, že poměrně velké rozdíly ve velikosti genomu byly zaznamenány i mezi bratry z rodiny F21-03, kteří se lišila o 12 %. Vzhledem k vysokému obsahu repetitivní DNA u tohoto druhu se nabízí vysvětlení, že rozdíly mezi genomy způsobují právě rozdíly v akumulaci repetitivní DNA. Demková (2022) ve své práci pozorovala občasné rozdíly v přítomnosti heterochromatinových bloků v bivalentu, kdy byl blok přítomen jen na jednom homologu a na druhém ne. Tento jev byl opakovaně pozorován i v této práci. Rozdíly mohou být způsobeny i různou akumulací satelitní DNA. V případě satelitu Lmar-SAT-03 byla nalezena různá velikost klastru na bivalentu WZ mezi rodinami s chromozomy typu W-1 a W-2. Svou roli mohou hrát i mobilní elementy, které dosud u *L. marginata* nebyly zkoumány, ale u jiných druhů může jejich množení způsobovat zásadní rozdíly ve velikosti genomu. Významné rozdíly v tendenci akumulovat transpozibilní elementy hrají důležitou roli v evoluci motýlího genomu (Talla et al. 2017; Liu et al. 2020). Například u rodu *Leptidea* (bělásek hrachorový (*Leptidea sinapis*), *L. reali* a b. luční (*L. juvernica*)) velikostí genomů korelují s přítomností mobilních elementů, zejména extrémním příkladem je *Leptidea sinapis*, kde transpozibilní elementy tvoří 38 % genomu (Talla et al. 2017).

Dalším zajímavým výsledkem byl malý rozdíl mezi samci a samicemi v jedné rodině, zatímco u jiné rodiny byl 6,6 %. To je v kontrastu s prací Liu (2020), kde při měření velikostí genomu 15 druhů motýlů z čtyř čeledí (s výjimkou *Danaus genutia*) nebyl nalezen rozdíl mezi samici a samcem. Z toho hlediska by bylo zajímavé porovnat velikost genomů u samic a samců v rodině F22-09, kde se pravděpodobně u samic nachází univalent chromozomu Z, zatímco

chromozom W chybí. Toto porovnání zatím nebylo provedeno, protože samice, kterých byl v této rodině omezený počet, jsou zatím uchovány pro produkci další generace.

## 6. Závěr

Skvrnopásník lískový (*L. marginata*) je motýl s více typy pohlavního chromozomu W, lišících se svým složením, u kterého došlo k expanzi heterochromatinových bloků na většinu autozomů. Cílem této práce bylo ověřit potomstvo skvrnopásníka na typ chromozomu W (na rozlišení chromozomu W zvýrazněných samičí sondou s odlišným počtem heterochromatinových bloků použit mikrosatelit miSAT-03) a zjistit, zda heterochromatinové bloky jsou tvořené dalším typem repetitivní DNA - satelity.

V této práci bylo zaznamenáno dohromady pět typů chromozomu W (tři již známé a dva nově objevené). Typy W-1, W-4 a W-5 byly zvýrazněné samičí sondou a lišily se počtem heterochromatinových bloků, což mohlo být způsobeno odlišnou mírou kondenzací chromozomu W. Mapování mikrosatelitu miSAT-03, který se nachází v blocích W-1, prokázalo odlišné složení chromozomu W-1 a W-4 a tak se jedná o další typ chromozomu W. Mapování vybraných satelitních sekvencí ukázalo podobný pattern u rodin s W-1 a W-2 (klastry na většině chromozomu v genomu) až na satelit SAT-04, který byl W-obohacen u obou rodin, ale silnější signál byl pozorován na W-1. Měření genomu ukázalo velký rozdíl mezi nejmenšími a největšími naměřenými hodnotami - 23 %. Bratři v rodinách měli podobnou velikost genomu až na jednu rodinu – F21-03, kde rozdíl byl 12 %. Důvodem může být odlišné zastoupení repetitivní DNA u různých jedinců jak v rámci druhu *L. marginata*, tak i v rámci rodiny.

Dalším směrem výzkumu by mohl být výzkum mobilních elementů, které u tohoto druhu ještě nebyly zkoumány a mohly by být další složkou tvořící heterochromatinové bloky. Mapování mikrosatelitních sekvencí by mohlo odhalit další typy chromozomu W.

## 7. Přílohy

Příloha I: Consensus sekvence studovaných satelitů vygenerované programem RepeatExplorer.

>Lmar-226-CL11-satLC (847 bp)

```
CTTCTCTTGATTTTCGCCTTTACGTTTGCGTATTACCCAGTGTCATGTGTGTTTCTGGAGGG
TTAATGTCTTATCTAATTTACTTCAAGTGATGTAGTGGAACATTACTAAAAGTTTCCAT
GGAGTTCTGCAGCGAGAGCGAAAACAACGTTTTCCACTTTGTATCACTTTGTCCCACT
TGTGTACGTTACGAACAGTTATTATATACGTTATTAGTTATAAATCCACTATTTTTACAC
AATAACACTCGAAAAAACAAGTAGTATCAGAAAATAATACAAAATAAACAACGCCATTTT
CACTATGGCGGCAAAACTCCTTCAATTAAGTTCTTTCTATTTGCAAGCCAGTTCGAAATT
TAAATAAAACCTTTGATAAGTTACCTCTTTGGTTGCCGTGTTTCGTAGTAAAAGGTCGTT
CCATTTTTAAATAACACGACAGATATGGATTTTCATACTTAGATTGCCGGCCGCTGCTCG
CATGTATTTGGCCAGTACAGCAATGTCGATTTATCTCGAAGAAGGTTGTCAAATAATG
CTCACATTTCCAAGCATGTTTGAGAAATAGTACATTACTGCAGCGGCCGCAATAGGGG
CATTGCTGGACGAACGTGTAAATGTGGGCCGAGGCCGAAGCCGAGGCACACATACGTGA
GTCCATCAATGCCTAGTTGCGGCCAAGGCTTGATAGTGCTTTTCTCAAATAATGCGCGG
AAATTAATACTAAGTAGTACTTAACTCATTTTGTCAAATATACTGTTACTTACTTTTCAA
AATCAATGAAGAACAACGACCAACAATATTTTTTCACTCGTTAAAGAGTTTTTTTTTCAA
TGAACTTCTT
```

>Lmar-226-CL57-satLC (1210 bp)

```
AACGAAAACAAATAAAAGTCAGATAGCGAGCTAGGAATCGTTGGATCCCACTTCTGATG
TAAACTTAATACGTCAGAAACGGGTAGGTAACCTTACAACGCCAGGTTTCTATCACATTA
TATCTCTTTTACACCAGATCCTCAATCACTAAACCACATATTTAGACCACGATTGATTCA
GATAGGTCGTTGATCACAAACAAATCACGCTAAGTAGGCAGAGGCACGTTTTTGCAGCG
TCCCACTACAGCCATAGCCAAAAATCTCCACAAGTCTTCACAAGTCAACTTCGCAATC
GCCGGTCTCCCGAGCGCCTCCCTGCAACGTCACACCGTGACAGCGGTGTTGCCAACACG
GCCCTCCTGCCCCGTGCATGCCCTCATGCATAACAGAACTTGAAACATAAAGACACAAT
GTTATATCGACTGATGACGTTTCCAATAACATGCCGACTCGGCCTATCATGACAATGCCA
ATTCAGAACAACCTTTAGACACTCCAAGAACACCTTTATGCTTAGGGGTTATTTGAAGCTC
TGTTGTCTGAATTGGACCACTTGAGTTAGGGTCACTACCTTTATGCTTAGGCAATCCCTC
TTATCAATTCATTCTTTAGTGCCACCAAGTGCCTGTTCCAGCTTTTCTCCTTTATGCTTAG
GAGGTAAGTGTGTCAGCTCACCGTGTCAACCAAGCAATGAATTTACTTACTCAGTACT
```



TGAACTGTCATTTTTATTCAATAGCAATGTTTGTACAATTTTTCTTATCCTTCCACAAACA  
GGTTGTCCATTAGTGATCGTTACGCAACAATGACTCGTACCAAACCTTTAGCAGAATCTTT  
GAGCGTATTAAGAGCCTAATAGGGAATCATACCGCCACACCATGAGAACGTGGAATCGT  
AAGAGTCTATCACATTTAACCAGGAATCTACATTATCTTATCAATCAACGGGTCAAAGTT  
AGGTATCATTTTTATGGAGGGTAGTGTTGTTTACTACTCACAGATACGACACCGTTCATATG  
CGATACCTTTATCCTTTTTTTGACCTACGGGTGCACGAAGTGGCATTTCGGGATCTGTTCTC  
ATCACTCGATGGTACTCGAGCTTCTGCTTGATGACGGAAAACGTGATCGTATTCTTGGTT  
TTGTTTATGACCTATCTTTATCAATTGCGGGTAATCGGAAGTTGCAAATTTACTTGAGCC  
TTTCTGAATACAA

>Lmar-226-CL74-satHC (341 bp)

AGTAAACTTTTTAACAAGTCCTAGTATGGCGGCCAAAAAATTTGACCGAATTTCCGCAA  
AATTTTGATGGGAGTCGCCCGGGGGCTCGTCCCGATGCCGAATATGTGTTTTTTATTTG  
TCTCAAGTGAAATTTGGGTTTTTAAGAGCCGAAAATATTTTATGTTTTTATAAATTTTGA  
AAATTTTGATTATTTGAAAATGTTACTAATTATTTTTGTCTGATTACAGGTCTGCGGA  
GAGTTCGTGAGACGCGTTCAACGAGCTATCAAACCTCAGTGTACGTCAAACCTTCGAG  
CTCAAAGTCAATACTTGGATCCGTACATAGTAAGTACTCTTCA

>Lmar-226-CL205-satLC (375 bp)

AATGTGCTATTGACTGATGGTAAGCGATACTTTTAGAGCGTTAGAAAATCCTTGTATTCCG  
GTGATGGAAAAATGGTGATGTGCGTTGATGATGTTAAGTAGCCTATAACCTGGTCCCT  
GGTTGACTGAGTGATTGACTGATGGTAAACGATACTTTTAGAGCGTTAAAAAAGCCTTG  
TATTCGGTGATGAAAAATGGTGATGTATGATGATGAAAAGTAGCCTATAACCTAATCCC  
GCCTATGAACTGTGTCTGTGCAAAAAATCACGTCGATCCGTTGCTCCGTTGCAGCGTGA  
AAGACGCACAAACAAACCAACAAACACATTTTCTCGTTTATCATAGTTTTGTTTTTTTT  
TTAATATTTTTTTTTCTATG

## 8. Použité zdroje

Abe H, Mita K., Yasukochi Y., Oshiki T. a Shimada T.. 2005. “Retrotransposable Elements on the W Chromosome of the Silkworm, *Bombyx Mori*.” *Cytogenetic and Genome Research*. 110: 144–51. DOI: 10.1159/000084946.

Bachtrog D. 2006. “A Dynamic View of Sex Chromosome Evolution.” *Current Opinion in Genetics and Development*. 16 (6): 578–85. DOI: 10.1016/j.gde.2006.10.007.

Beldade P., Saenko S. V., Pul N. a Long A. D.. 2009. “A Gene-Based Linkage Map for *Bicyclus Anynana* Butterflies Allows for a Comprehensive Analysis of Synteny with the Lepidopteran Reference Genome.” *PLoS Genetics*. 5 (2): e1000366. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000366.

Benson G.. 1999. “Tandem Repeats Finder: A Program to Analyze DNA Sequences.” *Nucleic Acids Research*. 27 (2): 573–80. DOI: 10.1093/nar/27.2.573.

Britten R. J. a Kohne D. E.. 1964. “Repeated Sequences in DNA“ *Science*. 161 (3841).

Cabral-de-Mello D. C. a Marec F.. 2021ba. “ Universal Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) Protocol for Mapping Repetitive DNAs in Insects and Other Arthropods.“ *Molecular Genetics and Genomics*. 296 (3): 513-526.

Cabral-de-Mello D. C., Zrzavá M., Kubíčková S., Rendón P. a Marec F.. 2021b. “The Role of Satellite DNAs in Genome Architecture and Sex Chromosome Evolution in Crambidae Moths“ . *Frontier in Genetics*. 12:661417. DOI: 10.3389/fgene.2021.661417.

Carvalho A B.. 2002. “Origin and Evolution of the *Drosophila* Y Chromosome.” *Current Opinion in Genetics and Development* 12 (16): 664–68.

Charlesworth B. 1978. “Model for Evolution of Y Chromosomes and Dosage Compensation.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 75 (11): 5618–22. DOI: 10.1073/pnas.75.11.5618.

Charlesworth B.. 1996. “The Evolution of Chromosomal Sex Determination and Dosage Compensation.” *Current Biology*. 6 (2): 149–62.

Charlesworth B. a Charlesworth D.. 2000. “The Degeneration of Y Chromosomes.” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 335 (1404): 1563–72. DOI: 10.1098/rstb.2000.0717.

- Charlesworth D, Charlesworth B. a Marais G.. 2005. "Steps in the Evolution of Heteromorphic Sex Chromosomes." *Heredity* 95 (2): 118–28. DOI: 10.1038/sj.hdy.6800697.
- Dalíková M., Zrzavá M., Kubičková S a Marec F.. 2017a. "W-enriched satellite sequence in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae)". *Chromosomal Research*. 25 (3-4). DOI: 10.1007/s10577-017-9558-8.
- Dalíková M., Zrzavá M., Hladová I., Nguyen P., Šonský I., Flegrová M., Kubičková S., Voleníková A., Kawahara A. Y., Peters R. S. a Marec F.. 2017b. "New Insights into the Evolution of the W Chromosome in Lepidoptera." *Journal of Heredity*, 1–11.
- Demková M. 2022. "Analýza chromosomu W u skvrnopásníka lískového, *Lomaspilis marginata*." *Diplomová Práce, Jihočeská Univerzita*.
- Douglas R. N. a Birchler J. A.. 2017. "B Chromosomes." *In Chromosome Structure and Aberrations*, edited by T. A. Bhat and A. A. Wani, 13–30.
- Fuková I., Traut W., Vítková M., Nguyen P., Kubičková, S. a Marec F.. 2007. "Probing the W Chromosome of the Codling Moth, *Cydia Pomonella*, with Sequences from Microdissected Sex Chromatin." *Chromosoma* 116: 135–45. DOI: 10.1007/s00412-006-0086-0.
- Gasparotto A.E., Milani D., Martí E., Beatriz S M Ferretti A., Bardella V. B., Hickmann F., Zrzavá M., Marec F. a Cabral-de-Mello D. C.. 2022. "A Step Forward in the Genome Characterization of the Sugarcane Borer, *Diatraea saccharalis*: Karyotype Analysis, Sex Chromosome System and Repetitive DNAs Through a Cytogenomic Approach." *Chromosoma*. 131 (4): 253–267. DOI: 10.1007/s00412-022-00781-4.
- Gregory, T. R.. 2001. "Coincidence, Coevolution, or Causation? DNA Content, Cellsize, and the C-Value Enigma." *Biological Reviews* 76 (1): 65–101. DOI: 10.1111/j.1469-185X.2000.tb00059.x.
- Gregory, T. R. 2002c. "Genome size and developmental complexity." *Genetica*. 115: 131–146.
- Gregory, T. R. a Hebert P. D. N.. 2003. "Genome Size Variation in Lepidopteran Insects." *Canadian Journal of Zoology*. 81 (8): 1399-1405.
- Gregory, T. R.. 2005. "The C-Value Enigma in Plants and Animals: A Review of Parallels and an Appeal for Partnership." *Annals of Botany* 95 (1): 133–46. DOI: 10.1093/aob/mci009.

Greilhuber J., Doležel J., Lysák M. A. a Bennett M. D.. 2005. “The Origin, Evolution and Proposed Stabilization of the Terms ‘genome Size’ and ‘C-Value’ to Describe Nuclear DNA Contents.” *Annals of Botany* 95 (1): 255–60. DOI: 10.1093/aob/mci019.

Hejníčková M., Koutecký P., Potocký P., Provazníková I., Dalíková M., Visser S., Marec F. a Zrzavá M.. 2019. “Absence of W Chromosome in Psychidae Moths and Implications for the Theory of Sex Chromosome Evolution in Lepidoptera.” *Genes* 10 (1016): 1–12. DOI: 10.3390/genes10121016.

Hejníčková M., Dalíková M., Potocký P., Tammaru T., Trehubenko M., Kubíčková S., Marec F. a Zrzavá M.. 2021. “Degenerated, Undifferentiated, Rearranged, Lost: High Variability of Sex Chromosomes in Geometridae (Lepidoptera) Identified by Sex Chromatin.” *Cells* 10 (9). DOI: 10.3390/cells10092230.

Hejníčková M., Dalíková M., Zrzavá M., Marec F., Lorite P. a Montiel E. E. 2023. “Accumulation of Retrotransposons Contributes to W Chromosome Differentiation in the Willow Beauty *Peribatodes Rhomboidaria* (Lepidoptera: Geometridae).” *Scientific Reports*. 13:534.

Kaiser V. B a Bachtrog D.. 2010. “Evolution of Sex Chromosomes in Insects.” *The Annual Review of Genetics*. 44:91–112. DOI: 10.1146/annurev-genet-102209-163600.

Kato A., Albert P. S., Vega J. M. a Birchler J. A.. 2006. “Sensitive Fluorescence *in situ* Hybridization Signal Detection in Maize Using Directly Labeled Probes Produced by High Concentration DNA Polymerase Nick Translation.” *Biotechnic & Histochemistry*. 71-78. DOI: 10.1080/10520290600643677.

King L. M. a Cummings M. P.. 1997. “Satellite DNA Repeat Sequence Variation Is Low in Three Species of Burying Beetles in the Genus *Nicrophorus* (Coleoptera: Silphidae).” *Molecular Biology and Evolution* 14 (11): 1088–95. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025718.

López- Flores I. a Garrido-Ramos M. A.. 2012. “The Repetitive DNA Content of Eukaryotic Genomes.” *Genome Dynamics*. 7: 1-28.

Liu G., Chang Z., Chen L., He J., Dong Z., Yang J., Lu S., Zhao R., Wan W., Ma G., Li J., Zhang R., Wang W. a Li X.. 2020. “Genome Size Variation in Butterflies (Insecta, Lepidoptera,

- Papilionoidea): A Thorough Phylogenetic Comparison.” *Systematic Entomology* 45 (3): 571–82. DOI: 10.1111/syen.12417.
- Lu Y. -J., Kochert G. D., Isenhour D. J. a 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): 123–30. DOI: 10.1111/j.1365-2583.1994.tb00159.x.
- Mahendran B., Acharya C., Dash R., Ghosh S. K. a Kundu S. C.. 2006. “Repetitive DNA in Tropical Tasar Silkworm *Antheraea Mylitta*.” *Gene* 370 (1–2): 51–57. DOI: 10.1016/j.gene.2005.11.010.
- Mandrioli M., Manicardi G. C. a 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. DOI: 10.1023/A:1022058032217.
- Marec F. a Novák K.. 1998. “Absence of Sex Chromatin Corresponds with a Sex-Chromosome Univalent in Females of Trichoptera.” *European Journal of Entomology* 95 (2): 197–209.
- Marec F., Sahara K. a Traut W.. 2010. “Rise and Fall of the W Chromosome in Lepidoptera.” *Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera*, 49–64. DOI: 10.1201/9781420060201.
- Mullis K. B., Ferré F. a Gibbs R. A..1994. “The Polymerase Chain Reaction.” *Molecular Diagnostics: For the Clinical Laboratorian*.
- Nokkala S., Grozeva S., Kuznetsova V. a Maryanska- Nadachowska A.. 2003. “The Origin of the Achiasmatic XY Sex Chromosome System in *Cacopsylla Peregrina* (Frst.) (Psylloidea, Homoptera).” *Genetica*. 327–32.
- Novak P., Neumann P., Pech J., Steinhaisl J. a Macas J.. 2013. “RepeatExplorer: a Galaxy-based Web Server for Genome-wide Characterization of Eukaryotic Repetitive Elements from Next Generation Sequence Reads.” *Bioinformatics*. 29:792-793.
- Novak P., Robledillo L.A., Koblížková A., Vrbová I., Neumann P. a Macas J.. 2017. “TAREAN: a Computational Tool for Identification and Characterization of Satellite DNA from Unassembled Short Reads.” *Nucleic Acid Research*. 45:e111.

- Pansonato-Alves, J. C., Serrano É. A., Utsunomia R., Camacho J. P. M., Silva C., Vicari M. R. a Artoni R. F.. 2014. "Single Origin of Sex Chromosomes and Multiple Origins of B Chromosomes in Fish Genus *Characidium*." *PLoS ONE* 9 (9): e107169. DOI: 10.1371/journal.pone.0107169.
- Pinkrová K.. 2020. "Role repetitivních sekvencí v molekulární diferenciaci pohlavních chromosomů bělásků rodu *Pieris*". *Bakalářská Práce, Jihočeská Univerzita*.
- Plohl M., Luchetti A., Meštrović N a Mantovani B.. 2008. "Satellite DNAs between Selfishness and Functionality: Structure, Genomics and Evolution of Tandem Repeats in Centromeric (Hetero)Chromatin." *Gene* 409 (1–2): 72–82. DOI: 10.1016/j.gene.2007.11.013.
- Plohl M., Meštrović N. a Mravinac B. 2012. "Satellite DNA Evolution." *Genome Dynamics*. 7: 126–52.
- Reichholf-Riehm H.. 2005. "Motýli: Průvodce přírodou. 2." ČR: Ikar. ISBN 80-7176- 318-7.
- Rice, W. R. 1987. "The Accumulation of Sexually Antagonistic Genes as a Selective Agent Promoting the Evolution of Reduced Recombination between Primitive Sex Chromosomes." *Evolution*. 41 (4): 911–14.
- Rice W. R. 1996. "Evolution of the Y Sex Chromosome in Animals." *American Institute of Biological Science* 46 (5): 331–43. DOI: 10.2307/1312947.
- Sahara K., Yoshido A. a Traut W.. 2012. "Sex Chromosome Evolution in Moths and Butterflies." *Chromosome Research*. 20 (1): 83–94. DOI: 10.1007/s10577-011-9262-z.
- Santos de Souza M., Kretschmer R., Barcellos S. A., Costa A. L., Cioffi M. De B., Corrêa de Oliveira E. H., Garnerio A. D. V. a Gunski R. J.. 2020. "Repeat Sequence Mapping Shows Different W Chromosome Evolutionary Pathways in Two Caprimulgiformes Families." *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*. 19-34.
- Šichová J., Voleníková A., Dincă V., Nguyen P., Vila R. a Sahara K.. 2015. "Dynamic Karyotype Evolution and Unique Sex Determination Systems in Leptidea Wood White Butterflies." *Evolutionary Biology*. 1–16. DOI: 10.1186/s12862-015-0375-4.
- Talla V., Suh A., Kalsoom F., Dincă V., Vila R., Friberg M., Wiklund C. Niclas Backstrom N.. 2017. "Rapid Increase in Genome Size as a Consequence of Transposable Element

- Hyperactivity in Wood-White (*Leptidea*) Butterflies.” *Genome Biology and Evolution*. 9(10):2491–2505. DOI: 10.1093/gbe/evx163.
- Traut W.. 1976. “Pachytene Mapping in the Female Silkworm, *Bombyx Mori* L. (Lepidoptera).” *Chromosoma* 284 (58): 275–84.
- Traut W. a Marec F.. 1994. “Sex Chromosome Pairing and Sex Chromatin Bodies in W-Z Translocation Strains of *Ephesia Kuehniella* (Lepidoptera).” *Genome* 37: 426–35.
- Traut W. a Marec F.. 1996. “Sex Chromatin in Lepidoptera.” *The Quarterly Review of Biology* 71 (2): 239–56. DOI: 10.1086/419371.
- Traut W. a Marec F.. 1997. “Sex Chromosome Differentiation in Some Species of Lepidoptera (Insecta).” *Chromosomal Research* 5: 283–91.
- Traut, W., Sahara K. a Marec F.. 2007. “Sex Chromosomes and Sex Determination in Lepidoptera.” *Sexual Development* 1 (6): 332–46. DOI: 10.1159/000111765.
- Traut W., Weith A. a Traut G.. 1986. “Structural Mutants of the W Chromosome in *Ephesia* (Insecta, Lepidoptera).” *Genetica* 70: 69–79.
- Traut W., Vogel H., Glöckner G., Hartmann E. a Heckel D.G.. 2013. “High-Throughput Sequencing of a Single Chromosome: A Moth W Chromosome.” *Chromosome Research* 21 (5): 491–505. DOI: 10.1007/s10577-013-9376-6.
- Van't Hof, AE, Nguyen P., Dalíková M., Edmonds N., Marec F. a Saccheri I. J.. 2013. “Linkage Map of the Peppered Moth, *Biston Betularia* (Lepidoptera, Geometridae): A Model of Industrial Melanism.” *Heredity* 110: 283–95. DOI: 10.1038/hdy.2012.84.
- Věchtová P., Dalíková M., Sýkorová M., Žurovcová M., Füßy Z. a Zrzavá M.. 2016. “CpSAT-1, a Transcribed Satellite Sequence from the Codling Moth, *Cydia Pomonella*.” *Genetica* 144 (4): 385–95. DOI: 10.1007/s10709-016-9907-0.
- Vítková M., Fuková I., Kubíčková S. a Marec F. 2007. “Molecular Divergence of the W Chromosomes in Pyralid Moths (Lepidoptera).” *Chromosome Research* 15 (7): 917–30. DOI: 10.1007/s10577-007-1173-7.
- Vlašánek, P., Bartoňová A., Marec F. a Konvička M.. 2017. “Elusive *Parnassius Mnemosyne* (Linnaeus, 1758) Larvae: Habitat Selection, Sex Determination and Sex Ratio (Lepidoptera: Papilionidae)” 45 (180): 561–69.

- Voleníková, A. 2015. “Analýza Pohlavních Chromosomů Vybraných Druhů Primitivních Motýlů z Čeledi Hrotnokřídlecovití (Lepidoptera : Hepialoidea ).” *Diplomová Práce, Jihočeská Univerzita*.
- Volpe T. A., Kidner C., Hall I. M., Teng G., Grewal S. I. S. a Martienssen R. A.. 2002. “Regulation of Heterochromatic Silencing and Histone H3 Lysine-9 Methylation by RNAi.” *Science*. 297 (5588): 1833–37. DOI: 10.1126/science.1074973.
- Winnepenninckx B., Backeljau T. a Wachter R. D.. 1993. “Extraction of High Molecular Weight DNA from Molluscs.” *Technical Tips*. 9 (12): 407.
- Wolf K.W., Novák K. a Marec F.. 1997. “Kinetic Organization of Metaphase I Bivalents in Spermatogenesis of Lepidoptera and Trichoptera Species with Small Chromosome Numbers.” *Heredity* 79 (2): 135–43. DOI: 10.1038/hdy.1997.136.
- Yoshido A., Marec F. a Sahara K.. 2016. “The Fate of W Chromosomes in Hybrids between Wild Silkmoths, *Samia Cynthia Ssp.*: No Role in Sex Determination and Reproduction.” *Heredity* 116 (5): 424–33. DOI: 10.1038/hdy.2015.110.
- Zrzavá M., Hladová I., Dalíková M., Šíchová J., Ůunap E., Kubičková S. a Marec F.. 2018. “Sex Chromosomes of the Iconic Moth *Abraxas grossulariata* (Lepidoptera, Geometridae) and Its Congener *A. sylvata*.” *Genes* 9 (279): 1–16. DOI: 10.3390/genes9060279.