

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

JIHOČESKÉ UNIVERZITY V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Studium syntenie chromosomu Z obaleče jablečného
(*Cydia pomonella*) (L.) metodou BAC-FISH

Diplomová práce

2009

Petr Nguyen

Vedoucí práce: Prof. RNDr. František Marec, CSc.

Nguyen P (2009) Studium syntenie chromosomu Z obaleče jablečného (*Cydia pomonella*) (L.) metodou BAC-FISH. [Z chromosome synteny in codling moth, *Cydia pomonella* (L.), as revealed by BAC-FISH. Mgr. Thesis, in Czech.] 38 p. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

In this study, the codling moth (*Cydia pomonella*) partial sequences orthologous to genes that are Z-linked in other lepidopteran species were isolated and used as probes for screening of the codling moth BAC library. Selected BAC clones were labelled and mapped by fluorescence *in situ* hybridization (the so-called BAC-FISH) to codling moth chromosomes. Where BAC clones were unavailable, Z-linkage was confirmed by Southern hybridization with male and female genomic DNAs. The results revealed conserved synteny of Z-linked genes including gene order between codling moth and the silkworm, *Bombyx mori*, and suggest common evolutionary origin and stability of the Z chromosome in the main clade of Lepidoptera, the Ditrysia.

Finanční podpora:

Práce byla financována z grantů Grantové agentury ČR, reg. č. 206/06/1860 (do r. 2008 včetně) a 523/09/2106 (v r. 2009), a grantem Studentské grantové agentury PŘF JU SGA2008/001.

Prohlášení:

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne 5. května 2009

.....

Petr Nguyen

Poděkování:

V první řadě bych chtěl poděkovat rodině, za to, že takového parazita jako já tak dlouho na studiích trpěla. Pak Kátě, za to, že to se mnou posledních pár týdnů vydržela. Pak Frantovi, že vzal do laborky mě, Martinu a Jindru. Martině za to, že nikdy neřekne ne. Jindře za to, že je. Nesmím zapomenout poděkovat Magdě za to, že mě vždycky potrestá, když moc zlobím. A taky Kenovi a celé jeho laboratoři, za všechno, co jsem se u něho naučil.

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1.	Vznik a diferenciacie pohlavných chromosomů.....	1
1.2.	Pohlavní chromosomy a evoluce	3
1.3.	Cytogenetika motýlů	6
1.3.1.	Karyotyp motýlů.....	6
1.3.2.	Zlatý věk molekulární cytogenetiky.....	7
1.3.3.	Nový svět srovnávací genomiky	8
1.3.4.	Evoluce pohlavních chromosomů motýlů	9
2	Cíle práce.....	12
3	Materiál a metody	13
3.1.	Modelové organismy.....	13
3.2.	Izolace nukleových kyselin	13
3.3.	Polymerásová řetězová reakce.....	14
3.4.	Klonování a sekvenování.....	16
3.5.	Značení sond	17
3.6.	Prohledání BAC knihovny.....	17
3.7.	BAC-FISH.....	18
3.8.	Southernova hybridizace	18
4	Výsledky.....	20
4.1.	Izolace ortologů obaleče jablečného.....	20
4.2.	Mapování získaných ortologů obaleče jablečného metodou BAC-FISH.....	20
4.3.	Ověření vazby genů na chromosom Z pomocí Southernovy hybridizace	23
5	Diskuse	25
6	Souhrn	32
7	Reference	33

1 Úvod

Už před více než sto lety bylo z dědičnosti vázané na pohlaví pozorované u pídalky angreštové, *Abraxas grossulariata*, vyvozeno, že motýli, druhý nejpočetnější hmyzí řád, mají na rozdíl od jiných skupin organismů, samičí heterogametické určení pohlaví WZ/ZZ. Podle pídalky angreštové byl tento způsob určení pohlaví pojmenován jako typ *Abraxas*. Klasická cytogenetika si s chromosomy motýlů, kvůli mnoha jejich zvláštnostem, nedokázala poradit, a tak trvalo dalších téměř devadesát let, než bylo možné jejich pohlavní chromosomy podrobně analyzovat. Teprve dnes, v nové éře genomiky, však máme možnost odhalit také evoluční původ pohlavních chromosomů motýlů.

1.1. Vznik a diferenciacie pohlavních chromosomů

Evoluční původ pohlavních chromosomů je úzce spjat s oddělením rozmnožovacích funkcí v původně hermafroditické populaci. Tento proces vzniku geneticky určeného samčího a samičího pohlaví má dva kroky. Nejdříve v populaci dojde k recesivní mutaci vyvolávající samčí sterilitu, která zabrání vzniku potomstva s nízkou reprodukční úspěšností samooplozením a umožní větší investice do produkce samičího potomstva. Rostoucí frekvence této mutace následně zvýší selekční tlak na mutaci způsobující samičí sterilitu. Pokud je mutace pro samičí sterilitu dominantní a oba lokusy budou v dostatečně těsné vazbě, v populaci převládnu homogametické samice a heterogametiční samci (Charlesworth a Charlesworth, 1978; Ayling a Griffin, 2002). Tato ranná fáze evoluce pohlavních chromosomů byla recentně popsána u jahodníku *Fragaria virginiana*, v jehož populaci koexistují jednodomé, samčí i samičí rostliny. Samčí a samičí pohlaví je určováno dvěma geny v těsné vazbě, mezi nimiž ještě není zcela zablokována rekombinace (Spigler a kol., 2008). Protože rekombinace narušuje vazebnou nerovnováhu alel těchto genů, existuje zde selekční tlak na užší genetickou vazbu a restrikcii rekombinace v lokusu chromosomálními přestavbami (Ming a Moore, 2007; Bergero a Charlesworth, 2009). Předpokládá se, že následná akumulace sexuálně antagonistických genů, tj. genů prospěšných pro jedno ale škodlivých pro druhé pohlaví, na pohlavních chromosomech vede k zastavení rekombinace i mezi dalšími lokusy. Výsledkem je úplné zablokování rekombinace mezi pohlavními chromosomy, které nastartuje procesy vedoucí v konečném důsledku k úplné degeneraci

heteromorfních chromosomů Y a W (Bergero a Charlesworth, 2009). Nejvýznamnější roli v úpadku pohlavních chromosomů hraje patrně Mullerova rohatka, tj. nevratné hromadění škodlivých alel v důsledku genetického driftu, a tzv. “*hitchhiking*”, kdy výhodná mutace zapříčiní fixaci všech škodlivých mutací na chromosomu. Výsledkem je vznik pseudogenů a hromadění repetitivních sekvencí, které zprostředkovávají ektopickou rekombinaci způsobující četné delece. Fixace škodlivých alel v mnoha Y/W vázaných lokusech vyvolá selekční tlak na zvýšení exprese příslušných alel na X/Z chromosomu. Pokud toto navýšení genové exprese není omezeno pouze na heterogametické pohlaví jako je tomu např. u octomilky, patrně existuje selekční tlak na kompenzaci genové dávky, tj. její snížení, u pohlaví homogametického např. epigenetickým mechanismem inaktivace transkripce známým u savců (Charlesworth, 1996; Larsson a Meller, 2006). To však není pravidlem. Bylo prokázáno, že ptáci globální kompenzaci genové dávky postrádají a exprese jejich genů je regulována individuálně, gen od genu (“*gene-by-gene*”) (Mank a Ellegren, 2009).

Dobrým příkladem diferenciovaného heteromorfního chromosomu je Y chromosom člověka. Geny, které na něm leží, dokládají jeho společný autosomální původ s chromosomem X. Jen 30 z více než tisíce genů vázaných na chromosom X přetrvává v nehostinném prostředí Y chromosomu patrně díky své pohlavně specifické funkci. Jak ukazují případy delecí částí chromosomu Y spojené s absencí nebo abnormalitami spermií, alespoň některé z nich jsou nezbytné pro správný průběh spermatogeneze (Graves, 2000). Mezi ně patří i dva geny (*DAZ*, *CDY*), jejichž homology leží na autosomech. Oba jsou exprimovány ve varlatech a nachází se na Y chromosomu v mnoha kopiích. Ne všechny jejich kopie jsou aktivní a jejich amplifikace je tedy patrně výsledkem selekce zabezpečující dostatečnou expresi těchto genů v prostředí s vysokou mutační rychlostí (Skaletsky, 2003; Graves, 2006). Srovnání Y chromosomu člověka a šimpanze odhalilo inaktivaci 5 z 16 studovaných genů aktivních u člověka (Hughes a kol, 2005). U některých vačnatců je chromosom Y velký pouze 10 Mb, jiní ho dokonce během embryonálního vývoje v somatických buňkách eliminují. V extrémním případě se dá očekávat ztráta posledních genů vázaných na Y chromosom spojená se vznikem nového systému určení pohlaví a zánikem chromosomu Y (Graves, 2000). Podle posledních odhadů by lidský chromosom mohl zaniknout v horizontu 7 milionů let (Veyrunes a kol., 2008). Nejde

přítom o nereálný scénář, jak dokazují např. rypoši rodu *Ellobius* (Graves, 2000; Just a kol., 2002).

1.2. Pohlavní chromosomy a evoluce

Význam pohlavních chromosomů je obecně spojován s jejich rolí v určení pohlaví. Hemizygotní stav chromosomů X a Z v heterozygotním pohlaví má však z pohledu evoluce dalekosáhlé důsledky a patrně je zodpovědný za rozmanitost života, tak jak ho známe dnes.

V roce 1984 vytvořil William R. Rice model, podle kterého pohlavní chromosomy usnadňují šíření sexuálně antagonistických genů v populaci, čímž spouští evoluci pohlavně dimorfních znaků. Frekvence recesivní alely takového genu, prospěšné pro heterogametické pohlaví (XY) a škodlivé pro pohlaví homogametické (XX), v populaci poroste, pokud bude vázána na pohlavní chromosom X. To proto, že na ni v heterogametickém pohlaví díky její hemizygotické expresi bude působit pozitivní selekce, zatímco v homogametické populaci bude před negativní expresí maskována divokou alelou. Dominantní alela sexuálně antagonistického genu se bude v populaci šířit jen v případě, kdy bude prospěšná pro homogametické pohlaví. Podle tohoto modelu by tedy měly být sexuálně antagonistické geny ve zvýšené míře zastoupeny na chromosomech X a Z (Rice, 1984).

Tento předpoklad byl o čtvrt století později skutečně potvrzen. Saifi a Chandra (1999) vyhledali ve veřejných databázích geny, jejichž mutace u člověka způsobují poruchy diferenciaci pohlaví, vývoje genitálií a plodnosti. Zjistili, že ze 72 těchto genů jich celkem 46 leží na chromosomu X. Podobným přístupem se podařilo prokázat, že X chromosom člověka obsahuje ve srovnání s autosomy více genů, jejichž mutace způsobují mentální retardaci, tj. genů zodpovědných za vývoj kognitivních schopností (Zechner a kol., 2001). Tato nenáhodná distribuce určitých skupin genů se neomezuje jen na člověka. Také geny specificky exprimované během rané spermatogeneze v myších varlatech a spermatocytech jsou nadměrně zastoupeny na chromosomu X (Wang a kol., 2001; Khil a kol., 2004). Distribuce genů s pohlavně specifickou expresí v genomu byla zatím studována u jediného druhu se systémem určení pohlaví typu WZ, kura bankivského (*Gallus gallus*). Bylo zjištěno, že chromosom Z je výrazně obohacen o geny exprimované v samčím mozku,

zatímco geny s expresí v mozku samice jsou na něm podreprezentovány. To odpovídá Riceovu teoretickému modelu pouze v případě, že je mutantní alela prospěšná homogametickému pohlaví alespoň částečně dominantní (Kaiser a Ellegren, 2006; Štorchová a Divina, 2006).

Vysoký obsah genů zodpovědných za diferenciaci pohlaví a plodnost pojí pohlavní chromosomy X a Z s dost možná nejvýznamějším evolučním procesem vůbec, speciací. Speciace je úzce spojena s tvorbou prezygotických a postzygotických rozmnožovacích bariér, které slouží k zamezení toku genů mezi dvěma druhy. Dá se tedy očekávat, že geny zodpovědné za formování těchto bariér nejsou v genomu rozmístěny rovnoměrně, ale jsou obzvláště hojné na pohlavních chromosomech (Servedio a Saetre, 2003).

Mezi postzygotické bariéry, tj. bariéry uplatňující se až po oplození vajíčka, patří inkompatibilita hybridů, která má za následek snížení jejich životaschopnosti a reprodukční úspěšnosti. Křížení jedinců z různých populací nebo linií stejného druhu odhalila zajímavý fenomén. Bylo zjištěno, že pokud se v potomstvu F1 generace vyskytne sterilita nebo neživotaschopnost, postihuje zpravidla více heterogametické pohlaví a to jak samčí (XY) tak samičí (WZ). Tento fenomén je znám jako Haldanovo pravidlo a byl dosud zaznamenán u všech studovaných skupin živočichů. Vzniká po oddělení dvou populací postupnou fixací nových alel. Pokud dojde k druhotnému kontaktu těchto populací a jejich křížení, recesivní alely vázané na pohlavní chromosom X/Z se v hybridu heterogametického pohlaví ocitnou v hemizygotním stavu. Pokud je fenotyp těchto alel podmíněn jejich interakcí s autosomálními geny, jejich produkty budou v proteinových komplexech inkompatibilní s polovinou svých partnerů (Jiggins a kol., 2001; Naisbit a kol., 2002; Presgraves, 2002; Qvarnström a Bailey, 2009).

Prezygotické bariéry působí už v rané fázi reprodukčního cyklu a jak už sám název napovídá, patří mezi ně vše, co snižuje pravděpodobnost setkání dvou jedinců různého druhu, jejich páření či úspěšného oplození. Z pohledu pohlavních chromosomů je jednoznačně nejzajímavější izolace zprostředkovaná primárními pohlavními znaky, mezi které patří např. pohlavní orgány nebo proteiny zajišťující interakci spermie s vajíčkem, a sekundárními pohlavními znaky, které jsou předmětem pohlavního výběru (Qvarnström a Bailey, 2009). Všechny tyto znaky mají pohlavně specifický vliv na reprodukční úspěšnost a často také pohlavně specifickou

expresi. Jak už bylo uvedeno výše, tyto atributy zvyšují pravděpodobnost jejich vazby na pohlavní chromosomy (Saetre a kol., 2003; Vicoso a Charlesworth, 2006). Roli pohlavních chromosomů v pohlavním výběru je možné stanovit na základě recipročních křížení. Reinhold (1998) na základě analýzy dat dostupných v literatuře dospěl k závěru, že geny vázané na chromosom X značnou měrou ovlivňují znaky podléhající pohlavnímu výběru. Podle přehledu recentních dat však vazbě znaků zodpovědných za prezygotickou izolaci na pohlavní chromosom X nic nenasvědčuje (Qvarnström a Bailey, 2009). Jiná je situace u taxonů se samičím heterogametickým pohlavím. Více než polovina znaků sledovaných u šesti dobře prostudovaných druhových komplexů motýlů (Lepidoptera) leží na chromosomu Z (Sperling, 1994; Prowell, 1998). U zavíječe kukuřičného (*Ostrinia nubilalis*) byly na chromosomu Z zamapovány hlavní faktory určující rozdíly v době postdiapausního vývoje a samčí behaviorální odpověď k samičímu feromonu (Dopman a kol., 2005). Dalším příkladem může být samice přástevníka *Utetheisa ornatrix* která se přednostně páří s většími samci. Iyengar a kol. (2002) ukázali, že se i tato samičí preference dědí společně s chromosomem Z. Geny zodpovědné za prezygotickou izolaci vázané na chromosom Z jsou známé také u ptáků. U lejsků *Ficedula hypoleuca* a *F. albicollis* společná vazba genů zodpovědných za asortativní párování (barva peří a samičí preference) a inkompatibilitu hybridů na chromosomu Z podporuje proces adaptivního posílení prezygotické izolace (*“reinforcement of prezygotic isolation”*) v zóně jejich druhotného kontaktu (Servedio a Saetre, 2003; Saether et al., 2007). Obdobný případ byl zaznamenán také u žluťásků *Colias eurytheme* a *C. philodice*. Samice těchto druhů si vybírají samce na základě druhově specifických vizuálních a feromonových signálů. Bylo prokázáno, že většina genů zodpovědných za samičí pohlavní výběr je společně s velkou částí genů kontrolujících samčí signály lokalizována na chromosomu Z (Guala a Taylor, 1980).

Reeve a Pfennig (2003) formulovali hypotézu, podle které je náchylnost některých skupin živočichů k pohlavnímu výběru důsledkem jejich systému chromosomálního určení pohlaví. Podle jejich modelu je pro vzácnou alelu zodpovědnou za pohlavně selektovaný znak vazba na Z chromosom výhodná, protože ve srovnání s autosomální dědičností nebo vazbou na chromosom X značně snižuje pravděpodobnost její náhodné ztráty z populace. Klíčovým předpokladem autorů je vazba samičí preference pro sekundární pohlavní znak na chromosom Z.

Kirkpatrick a Hall (2004) metodický přístup i závěry Reeva a Pfenninga (2003) zpochybnili. Také v jejich modelu však vazba na pohlavní chromosomy zvyšuje pravděpodobnost fixace alely podmiňující pohlavně selektovaný znak v populaci.

1.3. Cytogenetika motýlů

1.3.1. Karyotyp motýlů

Mitotický komplement motýlů (Lepidoptera) sestává zpravidla z velkého počtu malých chromosomů, které se od sebe tvarově a velikostně příliš neliší (De Prins a Saitoh, 2003; Mediouni a kol., 2004; Fuková a kol., 2005). Za ancestrální karyotyp je, na základě srovnání modálních počtů chromosomů motýlů ($n=31$) a jejich sesterské skupiny, chrostíků (Trichoptera) ($n=30$), považován haploidní počet chromosomů $n=31$ (Suomalainen, 1966; De Prins a Saitoh, 2003). Tomu odpovídají i počty chromosomů pozorované u basálních skupin motýlů (Luktanov, 2000). Chromosomy motýlů nemají centromeru (Wolf a kol., 1997) a v anafázi se jejich sesterské chromatidy rozchází paralelní disjunkcí (Murakami a Imai, 1974). Jsou tedy považovány za chromosomy holokinetického typu, tj. kinetochor pokrývá většinu jejich povrchu (Suomalainen, 1969; Murakami a Imai, 1974). Motýli mají chromosomální samičí heterogametické určení pohlaví ZZ/Z0 nebo ZZ/WZ. Chromosom W, pokud je přítomen, je u motýlů zpravidla dobře diferenciován a skládá se převážně z všudypřítomných repetitivních sekvencí odvozených z mobilních elementů (Sahara a kol., 2003; Abe a kol., 2005; Fuková a kol., 2007; Vítková a kol., 2007). V interfázních jádrech somatických buněk tvoří chromosom W pohlavně specifický heterochromatin (tzv. "sex chromatin") (Traut a Marec, 1996). Motýli, podobně jako ptáci (viz. kap. 1.1), postrádají mechanismus kompenzace genové dávky (Suzuki a kol., 1998, 1999; Koike a kol. 2003). Během meiózy nedochází u samic motýlů k rekombinaci (Marec a Traut, 1993; Traut a kol., 2007). Tato tzv. achiamatická meióza je společná motýlům i chrostíkům (Suomalainen, 1966) a patrně tedy nesouvisí s potřebou zablokování rekombinace mezi pohlavními chromosomy (viz. kap. 1.1). Absence jakýchkoli morfologických znaků (Mediouni a kol., 2004; Fuková a kol., 2005) a selhání proužkovacích technik (Bedo, 1984, De Prins a Saitoh, 2003) znemožňující identifikaci jednotlivých mitotických chromosomů dlouhou dobu omezovalo cytogenetické studium motýlů na prosté počítání chromosomů. Karyotypovou analýzu motýlů usnadnilo až využití pachytenních

chromosomů, které jsou mnohem delší, tvoří bivalenty a mají výrazný chromomerový vzor. Další výhodou je, že na pachytenních bivalentech je, na rozdíl od mitotických chromosomů možné stříbrem detekovat transkripčně aktivní jadérko (Fuková a kol., 2005). Toho bylo využito k identifikaci 6 z celkem 28 pachytenních bivalentů bource morušového (*Bombyx mori*) (Traut, 1976), při studiu karyotypové evoluce štetconošů rodu *Orgyia* (Traut a Clarke, 1997) a diferenciaci pohlavních chromosomů motýlů (Traut a Marec, 1997).

1.3.2. Zlatý věk molekulární cytogenetiky

Zavedení moderních molekulárních metod, jmenovitě fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a jejích modifikací, do cytogenetického výzkumu představovalo pro studium chromosomů motýlů přelomový okamžik. Traut a kol. (1999, 2001), inspirováni uplatněním komparativní genomové hybridizace (CGH) v nádorové diagnostice, využili tuto metodu pro identifikaci molekulárně diferenciovaných pohlavních chromosomů. Podobné využití našla také jednodušší genomová *in situ* hybridizace (GISH) použitá poprvé u motýlů ke studiu pohlavního chromosomu W a jeho aberací u bource morušového (Sahara a kol., 2003a). Obě tyto metody našly široké využití při identifikaci pohlavních chromosomů řady druhů motýlů (Sahara a kol., 2003b; Mediouni a kol., 2004; Fuková a kol., 2005; Yoshido a kol., 2005b; Vítková a kol., 2007). Fluorescenční *in situ* hybridizace s telomerickou sondou (TTAGG)_n přispěla k objasnění evolučního původu hmyzí telomerické sekvence (Sahara a kol., 1999; Frydrychová a kol., 2004; Vítková a kol., 2005) a v kombinaci s tyramidovou amplifikací signálu odhalila přítomnost intersticiálních telomerických sekvencí v genomu motýlů (Rego a Marec, 2003). Společně s GISH umožnila telomerická FISH studium evoluce neo-pohlavních chromosomů motýlů rodu *Orgyia* (Lymantridae) a *Samia* (Saturniidae) (Yoshido a kol., 2005b). Dalším milníkem byla jistě příprava W-specifických malovacích sond metodou laserové mikrodisekce (Fuková a kol., 2007; Vítková a kol., 2007). Hybridizace W-specifické malovací sondy zavíječe moučného, *Ephestia kuehniella*, (Pyralidae) na příbuzné druhy zavíječů potvrdila rychlou divergenci chromosomu W motýlů (Vítková a kol., 2007). Tento experiment bohužel také ukázal, že se W-specifické malovací sondy nehodí pro studium evoluce pohlavních chromosomů motýlů. Velké naděje jsou v tomto ohledu vkládány do využití malovacích sond specifických pro chromosom Z. Jejich

konstrukce se však k dnešnímu dni kvůli metodickým překážkám nezdařila (Šichová, 2009). Mapování genů metodou FISH je vzhledem k její nízké rozlišovací schopnosti omezeno na členy velkých genových rodin. U motýlů byla zatím studována pouze distribuce klastrů genů pro hlavní ribosomální RNA (18S, 5.8S a 28S rRNA) (Nguyen a kol., v oponentním řízení).

1.3.3. Nový svět srovnávací genomiky

Zveřejněním předběžné sekvence genomu bource morušového, *B. mori*, (Mita a kol., 2004; Xia a kol. 2004) se nám doslova otevřel svět nových možností. Vzhledem k relativně malému pokrytí však zůstal genom bource fragmentován, což značně zkomplikovalo jeho anotaci a další studie. Pro podrobnou analýzu genomu bource bylo tedy nezbytné integrovat fyzické a genetické mapy. Proto sestavil Yoshido a kol. (2005a) pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace umělých bakteriálních chromosomů, tzv. BAC ("Bacterial Artificial Chromosome") FISH, karyotyp bource morušového. Šlo vlastně o fyzickou mapu vytvořenou na základě již existující mapy genetické (Yasukochi, 1998), která umožnila přiřazení vazebných skupin bource k jednotlivým chromosomům. Tato mapa byla následně použita k ukotvení 523 BAC kontigů nesoucích 342 známých genů a 85 EST ("Expressed Sequences Tag") sekvencí (Yasukochi a kol., 2006).

Srovnání takto získané mapy s vazebnou mapou babočky *Heliconius melpomene* (Nymphalidae) (Jiggins a kol., 2005) obsahující 19 jaderných genů odhalila syntenii genů čtyř vazebných skupin (Yasukochi a kol., 2006). Pringle a kol. (2007) obohatili genetickou mapu *H. melpomene* o 64 konzervovaných genů, čímž získali celkem 72 ortologních markerů zamapovaných u *H. melpomene* i *B. mori*. Porovnání jejich map odhalilo zachovalou syntenii chromosomů obou druhů. Beldade a kol. (2009) provedli vazebnou analýzu EST sekvencí okáče *Bicyclus anynana* (Nymphalidae) a získanou mapu srovnali s mapou "referenčního" druhu, bource morušového. Také tito autoři zjistili velkou míru syntenie mezi vazebnými skupinami *B. anynana* a *B. mori*.

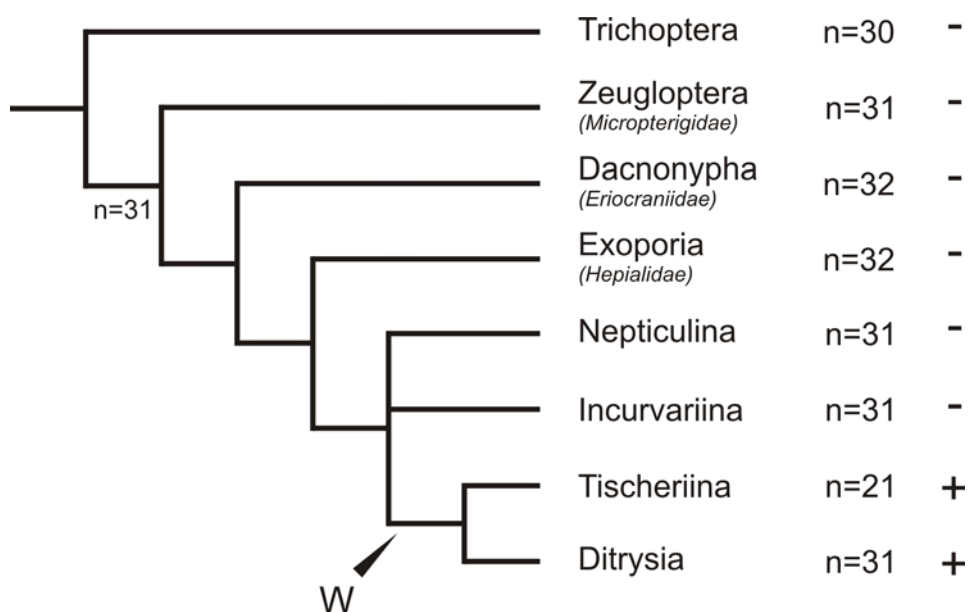
Díky značně konzervované organizaci motýlího genomu jsou genomová data bource velkým přínosem pro budoucí studium syntenie a evoluce genomu u nemodelových druhů motýlů. Tomu ale stojí v cestě obtížnost a pracnost konstrukce genetických map. Vzhledem k vysokému počtu chromosomů motýlů vyžaduje

vazebná analýza velké množství polymorfních markerů. Na druhou stranu, pokud chceme výslednou mapu srovnávat s referenčním druhem, musíme jako markery použít konzervované geny. Protichůdnost těchto požadavků je zřejmá. Řešením tohoto problému může být alternativa k vazebné analýze, fyzické mapování metodou BAC-FISH, která byla s úspěchem využita při sestavení BAC karyotypu lišaje tabákového, *Manduca sexta*, (Sphingidae) (Sahara a kol., 2007; Yasukochi a kol., v oponentním řízení).

1.3.4. Evoluce pohlavních chromosomů motýlů

Jak už bylo uvedeno výše, motýli mají, společně se svou sesterskou skupinou, chrostíky (Trichoptera), samičí heterogametické určení pohlaví. Samčí pohlaví je určeno chromosomální konstitucí ZZ, samičí konstitucí ZO nebo WZ. V interfázních jádrech polyploidních buněk tvoří chromosom W pohlavně specifický heterochromatin, který může být použit jako nepřímý důkaz pro přítomnost chromosomu W v samičím genomu. Přítomnost pohlavně specifického heterochromatinu v samičích interfázních jádrech byla prokázána u 81 procent z 238 vyšetřených druhů (Traut a Marec, 1996). Naprostá většina motýlů má tedy mechanismus určení pohlaví WZ/ZZ. Všechny tyto druhy jsou řazeny do rozsáhlého taxonu Ditrysia, který zahrnuje 98% všech žijících druhů motýlů. Naopak pohlavně specifický heterochromatin nebyl zjištěn u chrostíků (Marec a Novák, 1998) a bazálních skupin motýlů (Traut a Marec, 1996; Traut a Marec, 1997). Některé druhy Ditrysií vykazují jeho druhotnou ztrátu (Traut a Marec, 1996; Traut a kol., 2007). Na základě těchto informací byla formulována hypotéza o evoluci pohlavních chromosomů motýlů. Podle ní je mechanismus určení pohlaví ZO/ZZ společný pro sesterské skupiny motýlů (Lepidoptera) a chrostíků (Trichoptera). U společného předka větve motýlů Ditrysia došlo patrně k fúzi chromosomu Z s autosome, čímž vznikly chromosomy neo-Z a neo-W. Lukhtanov (2000) vyšetřil na přítomnost pohlavně specifického heterochromatinu samice tří druhů chrostíků a osmi druhů "primitivních" motýlů nepatřících do skupiny Ditrysia. Potvrdil absenci chromosomu W u chrostíků a "primitivních" motýlů s výjimkou druhu *Tischeria ekebladella*, který patří do infrařádu Tischeriina, sesterské skupiny Ditrysia. Chromosom W se tedy musel v karyotypu motýlů objevit už o něco dříve, než předpokládali Traut a Marec (1996). Lukhtanov (2000) na základě tohoto zjištění a modálních počtů chromosomů

jednotlivých bazálních skupin motýlů (Obr. 1) formuloval tři hypotézy vzniku pohlavního chromosomu W. (i) Systém určení pohlaví ZZ/ZW vznikl u společného předka skupin Tischeriina a Ditrysia fúzí chromosomu Z s autosomem. Vzhledem k tomu, že u “primitivních” Ditrysií nedošlo důsledkem fúze ke snížení ancestrálního počtu chromosomů $n=31$, považuje Lukhtanov tuto hypotézu za nepravděpodobnou. Nelze však vyloučit, že u společného předka Tischeriina a Ditrysia došlo kromě fúze chromosomu Z s autosomem také k obnovení původního karyotypu $n=31$ rozpadem jiného chromosomu. (ii) U předka skupiny Glossata došlo ke zvýšení počtu chromosomů z $n=31$ na $n=32$ rozpadem jednoho chromosomu. Systém určení pohlaví WZ/ZZ pak vznikl u společného předka skupiny Heteroneura (Nepticulina + Incurvariina + Tischeriina + Ditrysia) fúzí chromosomu Z s autosomem, která druhotně obnovila původní počet chromosomů $n=31$. Vzhledem k tomu, že u zástupců skupin Nepticulina a Incurvariina nebyl pohlavně specifický heterochromatin nalezen, je i tento scénář vysoce nepravděpodobný. (iii) W chromosom vznikl *de novo* z nadpočetného chromosomu, tzv. B chromosomu, podobně jako Y chromosom mery *Cacopsylla peregrina* (Homoptera, Psylloidea) (Nokkala a kol., 2003) a octomilek rodu *Drosophila* (Carvalho, 2002; Carvahlo a Clark, 2005; Graves, 2005). Tyto tři scénáře představují testovatelné hypotézy. Jejich testování však umožnilo až osekvenování genomu bource morušového a současný rozvoj komparativního fyzického mapování.



Obr. 1. Fylogenetické vztahy bazálních skupin motýlů, jejich modální počty chromosomů (**n**) a přítomnost (+) nebo absence (-) pohlavně specifického chromatinu. Šipka označuje pravděpodobný vznik chromosomu *W* u společného předka skupin *Tischeriina* a *Ditrysia* (více v kap. 1.3.4).

2 Cíle práce

Evoluční původ chromosomu W, tedy to, zda vznikl z autosomu nebo B chromosomu, je možné studovat prostřednictvím jeho partnera, chromosomu Z. Případnou fúzi ancestrálního chromosomu Z s autosomem odhalí porovnání molekulárního složení chromosomu Z mezi “primitivními” motýly a zástupci skupin Tischeriina a Ditrysia. Toto srovnání je možné provést dvěma metodickými přístupy, které byly s úspěchem použity např. při studiu evoluce pohlavních chromosomů obratlovců: (i) komparativní barvení chromosomů (“*comparative chromosome painting*”) nebo také ZOO-FISH, při které chromosomálně specifickou malovací sondu hybridizujeme na chromosomy jiného druhu (Shetty a kol., 1999; Itoh a Arnold; 2005) a (ii) komparativní mapování genů (Nanda a kol., 2000; Itoh a kol., 2006; Kawai a kol., 2007; Veyrunes a kol., 2008).

Tato práce v rámci studia evoluce pohlavních chromosomů motýlů využívá dostupnosti BAC knihovny obaleče jablečného, *Cydia pomonella* (Tortricoidea). Jejím cílem je ověření syntenie genů chromosomu Z obaleče jablečného s jinými druhy motýlů fyzickým mapováním genů metodou BAC-FISH. Dílčími cíli této práce je: (i) izolace genů obaleče jablečného ortologních k Z-vázaným genům bource morušového, (ii) příprava hybridizačních sond, které budou použity k prohledání BAC knihovny obaleče jablečného, (iii) ověření syntenie získaných genů obaleče jablečného metodou BAC-FISH.

3 Materiál a metody

3.1. Modelové organismy

V této práci byla použita laboratorní linie obaleče jablečného, *Cydia pomonella*, Krym-61. Její původ a chov včetně umělé potravy jsou podrobně zpracovány v práci Fuková a kol. (2005). Dalším druhem motýla, který byl v této práci použit je zavíječ moučný, *Ephestia kuehniella*, z laboratorní linie WT-C. Podrobnosti o původu této linie je možné najít v práci Marec (1990).

3.2. Izolace nukleových kyselin

RNA obaleče jablečného byla izolována z hlaviček, střeva a centrální nervové soustavy. Orgány byly vypitvány ve fyziologickém roztoku (Mediouni a kol., 2004) a skladovány v roztoku RNAlater (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) v -20°C do vlastní izolace. RNA byla extrahována pomocí RNA blue (Top-Bio, Praha, ČR) dle doporučení výrobce. Vyizolovaná RNA byla 15 minut inkubována při 37°C s DNázou I (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) (10 µL reakce obsahovala 1x pufr, 2 U DNázy I, 10 U SUPERase InTM RNase Inhibitor od firmy Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). RNA byla následně přečištěna fenol-chloroformovou extrakcí (fenol pro purifikaci RNA, pH 4,7; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Syntéza prvního vlákna cDNA byla provedena pomocí SuperScriptTM III reverzní transkriptázy (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) dle protokolu výrobce. Po tepelné inaktivaci reverzní transkriptázy bylo k reakci přidáno 5 U RNázy H (USB Corporation, Cleveland, OH, USA). Reakce byla inkubována 20 minut při 37°C. RNáza H byla tepelně inaktivována zahřátím na 65°C po dobu 20 minut.

DNA pro potřeby Southernovy hybridizace, BAC-FISH (kompetitor) a PCR byla izolována standardní fenol-chloroformovou extrakcí. Samčí a samičí DNA byla izolována samostatně. Ve stručnosti, tkáň byla homogenizována v tekutém dusíku a inkubována s extrakčním pufrem (0,1 g tkáně/3 mL extrakčního pufru: 100 mM NaCl, 50 mM EDTA, 100 µg/mL proteináza K, 0,5% Sarkosyl, 10 mM Tris-HCl, pH 8) přes noc. Druhý den byla přidána RNáza A (konečná koncentrace 10 µg/mL) a po hodinové inkubaci byla provedena fenol-chloroformová extrakce. DNA byla precipitována přidáním 1/10 objemu 3M octanu sodného a 7/10 objemu isopropanolu a rozpuštěna v příslušném množství vody nebo 1x TE pufru. Kvalita izolované DNA

byla ověřena štěpením restrikcími enzymy. Koncentrace DNA byla stanovena na fluorometru DyNA Quant 200 (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

DNA z klonů BAC byla izolována ze 100 mL bakteriální kultury v LB mediu s 12,5 µg/mL chloramfenikolu pomocí kitu Quiagen Plasmid Midi Kit (QUIAGEN, Düsseldorf, SRN) dle protokolu dostupného na internetových stránkách výrobce ("Isolation of BAC DNA using the QUIAGEN Plasmid Midi Kit").

3.3. Polymerázová řetězová reakce

Kandidátní geny pro mapování syntenie chromosomu Z obaleče jablečného byly vybrány na základě práce Provazník (2008). Primery použité pro amplifikaci těchto genů byly převzaty z literatury, poskytnuty Y. Naitou (Univerzita Hokkaido, Sapporo, Japonsko) nebo navrženy podle srovnání ("*alignment*") sekvencí dostupných v databázi GenBank. Seznam všech primerů použitých v této práci včetně jejich sekvencí a původu je uveden v Tab. 1. Specifické primery byly navržené s pomocí volně dostupných programů FastPCR (<http://primerdigital.com/>) a Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>; Rozen a Skaletsky, 2000). Degenerované primery byly navržené "ručně" na základě srovnání aminokyselinových sekvencí podle standardního genetického kódu.

Polymerázová řetězová reakce o objemu 20 µL standardně obsahovala 1x Ex *Taq* pufr, 0,2 mM dNTP mix, 20 ng gDNA nebo 2 µL cDNA, 0,25 U Takara Ex *Taq* Hot Start polymerázy (Takara, Otsu, Japonsko). Při PCR se specifickými primery a RT-PCR byla finální koncentrace použitých primerů 0,5 µM. Při PCR s degenerovanými primery (DOP-PCR) se osvědčila koncentrace primerů desetkrát vyšší, tedy 5 µM. Teplotní profil PCR sestával z počáteční denaturace při 94°C dlouhé 2 minuty a 35 cyklů složených z denaturace při 94°C trvajících 30 sekund, nasednutí primerů (30 sekund) a syntézy při 72°C. Teplota nasednutí (T_A) specifických primerů se pohybovala kolem 50°C. PCR s degenerovanými primery byla prováděna v gradientovém cykléru. Ve snaze omezit vznik nespecifických produktů u nich byla T_A zvyšována na nejvyšší možnou mez. Empiricky zjištěné teploty nasednutí pro degenerované primery úspěšně použité v této práci jsou uvedeny v Tab. 2. Doba extenze se v závislosti na předpokládané délce produktu pohybovala od 30 sekund do 1,75 minuty. Posledním krokem byla finální syntéza při 72°C trvajících 3 minuty.

Tab. 1. Sekvence a původ primerů použitých v této práci.

Lokus	Kód primeru	5'-3' sekvence primeru	Typ^a	Původ primeru
<i>6-pgd</i>	6PD-5.3dop	AAYGGNATHGARTAYGGNGAYATGCA	Deg, F	Y. Naito
	Pgd_F_014-019	GCIGTIATGGGICARAA	Deg, F	tato práce, dle NM001047060, NM057512, BC011329, NM002631
	6PD-6.5dopA	TCRTCARYTCNCCYTRRTTCCAATC	Deg, R	Y. Naito
	Pgd_R_190-184	ATICRTRRTGIACCATYTT	Deg, R	tato práce, dle NM001047060, NM057512, BC011329, NM002631
	Pgd_Sp_F2	CCTCAACATGGATTCTAAAG	S, F	tato práce
	Pgd_Sp_R3	TGCAACCATATCTTCTAAGG	S, R	tato práce
<i>aterous</i>	Ap4.3dopT	TGGCAYGCNAGYTYGCANCARTGYTATGC	Deg, F	Y. Naito
	Ap6.3dopA	GGNAGRCCNAGRAARAGRAARCCNAAAGA	Deg, F	Y. Naito
	Ap7.5dopG	AGRTCYTTNGCRTCNGGRTTRTGGTT	Deg, R	Y. Naito
	Ap.8.5hedop	CCATTTNGCNCGNGCATTCTGRAACC	Deg, R	Kronforst (2005)
	Ap_Sp_F1	CGAAGTAGGACTTCATGGTGC	S, F	tato práce
	Ap_Sp_R1	ACCGATCGTTTTTGCATCGC	S, R	tato práce
<i>kettin</i>	kettin4.3dop2T	GAYATHATHGCNGARTCNARCATCC	Deg, F	Y. Naito
	kettin5.3dopT	ATGAGRGTNGARTGGTTYTGAAATGG	Deg, F	Y. Naito
	kettin5.5dop2	CCRTRRCARAACCAYTCNACYCTCAT	Deg, R	Y. Naito
	kettin7.5dopT	TCDATNCGRCAYTCRTARTGNGCRCTTTG	Deg, R	Y. Naito
	KET_R01_1602	ATTGGGTATTATCGGAACG	S, R	tato práce, dle AB079865, EU109282
	KET_F01_1243	GTCACAGGCAGACCTTACC	S, F	tato práce, dle AB079865, EU109282
<i>Ldh</i>	KET_F_158-163	AARGTIGAYACITTYGARTA	Deg, F	tato práce, dle AB079865, EU109282
	Ldhbm_65F	ATCGCCAGTAACCCCGTGG	S, F	Dopman a kol. (2005)
<i>Ldh</i>	Ldhbm_255_R	CGCTGCTGTCTCCGTGTT	S, R	tato práce, dle EU000385
	<i>Tpi</i>	Tpiexon3.3edop	CTNGGNCAYTCNGARAGRAG	Deg, F
Tpiexon4.3edop		TAYGARCCNGTNTGGGCNATHGG	Deg, F	Y. Naito
tpi4.5dop2		TCYCTYTCYTCNAGNGTYTCNCCDATRCA	Deg, R	Y. Naito
Tpiexon5.5edop		TTANCANCNGTNACNGANCCNCCRTA	Deg, R	Y. Naito
TPI_F_009-015		GGIAAYTGGAARATGAAYGG	Deg, F	tato práce, dle NM_001126258, U23080, DM_DMU60860, L07390
TPI_R_170-164		ATIGCCCAIACIGGYTCRTA	Deg, R	tato práce, dle NM_001126258, U23080, DM_DMU60860, L07390
Tpi_Sp_F2		TTGGTGTGCCTGCCATCT	S, F	tato práce
Tpi_Sp_R2		TCCAGCAGTTTTGGGCAG	S, R	tato práce
<i>period</i>	Cp_per_F379	CCAATGAGGCGATTGAAGA	S, F	Fuková a kol., 2009
	Cp_per_R545	CTGCCTTGCTTGACGATG	S, R	Fuková a kol., 2009
<i>EF1a</i>	135F	CAAATGYGGTGGTATYGACAAACG	S, F	Kandul a kol., 2004
	570R	ACACYTCCTTCTTGATTTCTC	S, R	tato práce, dle D13338, U85672, AY870510, AY496822

^aTyp: Deg, degenerovaný primer; S, specifický primer navržený, pokud není uvedeno jinak, podle sekvence obaleče jablečného; F, forward; R, reverse.

Tab. 2. Seznam genů obaleče jablečného a zavíječe moučného, jejichž částečné sekvence se podařilo získat v rámci této práce. V tabulce jsou dále uvedeny primery použité pro jejich amplifikaci včetně jejich koncentrace v PCR (podrobnosti v kap. 3.3), délka jejich produktu a jejich empiricky zjištěná teplota nasednutí (T_A).

	Gen	primery (F,R)	produkt (bp)	T_A (°C)	Konc. primerů
<i>C. pomonella</i>	<i>6-pgd</i>	Pgd_F_014-019, Pgd_R_190-184	~ 3500	53	5 μ M
		6pd-5.3dop, 6pd-6.5dopA	710	63,5	5 μ M
	<i>apterous</i>	Ap4.3dopT, Ap7.5dopG	~ 1200	65	5 μ M
	<i>kettin</i>	Ket_F_158-163, Ket_R01_1602	930	45	5 μ M
		Ket_F01_1243, Ket_R01_1602	540	50	0,5 μ M
	<i>Ldh</i>	LdhBm_65F, LdhBm_255R	200	55	0,5 μ M
<i>Tpi</i>	Tpiexon3.3edop, Tpi4.5dop2	540	58	5 μ M	
	Tpi_F_009-015, Tpi_R_170-164	430 ^a	45	0,5 μ M	
<i>E. kuehniella</i>	<i>apterous</i>	Ap6.3dopA, Ap.8.5hedop	~ 1000	60	5 μ M
	<i>kettin</i>	Kettin4.3dop2T, Kettin5.5dop2	~800	60	5 μ M
		Kettin5.3dopT, Kettin7.5dopT	~600	60	5 μ M
	<i>Tpi</i>	Tpiexon3.3edop, Tpiexon5.5edop	~ 800	60	5 μ M
Tpi_F_009-015, Tpi_R_170-164		~ 1500	55	5 μ M	

^aProdukt amplifikován z cDNA.

3.4. Klonování a sekvenování

PCR produkty byly extrahovány z agarozového gelu pomocí kitu Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (Promega, Madison, WI, USA) dle protokolu výrobce. Takto získané sekvence byly buď přímo osekvenovány specifickými primery nebo dle protokolu výrobce vloženy do plazmidu Promega pGEM T Easy Vector (Promega), který byl následně použit k transformaci chemicky kompetentních buněk DH5 α . Plazmidová DNA byla izolována pomocí kitu Quiaprep Spin Miniprep Kit (QUIAGEN, Düsseldorf, SRN) dle protokolu výrobce. K sekvenování byly použity kity BigDye Terminator v1.1 nebo v3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) a univerzální sekvenační primery T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGG-3') a SP6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3') nebo M13-M4 (5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3') a M13 reverse (5'-GGAAACAGCTATGA-CCATG-3'). Získané sekvence byly editovány ve volně dostupném programu BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/>). K hledání homologií v databázích NCBI (National Center for Biotecnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) byl použit nástroj BLASTn.

3.5. Značení sond

Sondy určené pro prohledání BAC knihovny obaleče jablečného byly metodou PCR naznačeny alkali-labilním digoxigeninem (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, SRN). Značící 10 µL reakce obsahovala 1x Ex *Taq* pufr, směs nukleotidů (0,08 mM dGTP, dCTP, dATP; 0,052 mM dTTP a 0,028 mM DIG-11-dUTP), 0,5 µM primery (viz. Tab. 3), ca. 2 ng PCR produktu extrahovaného z gelu a 0,3 U Takara Ex *Taq* Hot Start polymerázy (Takara). Teplotní profil stejný jako u klasické PCR (viz. kap. 3.3).

Sondy pro BAC-FISH byly naznačeny fluorochromy SpectrumGreen-dUTP, SpectrumOrange-dUTP, SpectrumRed-dUTP (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA) a Cy5-dUTP (Amersham Biosciences, Tokyo, Japonsko). Značící reakce byla provedena kitem Nick Translation Labeling System (Invitrogen, Tokyo, Japonsko) dle pokynů výrobce. Alternativně byl použit Nick Translation Mix (Roche Diagnostics).

Tab. 3. Primery použité ke konstrukci hybridizačních sond (a jejich délka) použitých k prohledání BAC knihovny obaleče jablečného (BAC) a Southernovým hybridizacím (Southern).

Gen	Primery (F,R)	Délka (bp)	Použití
<i>6-pgd</i>	Tpi_Sp_F2, Tpi_Sp_R3	220	Southern
<i>apterous</i>	Ap_Sp_F1, Ap_Sp_R1	170	Southern
<i>Ldh</i>	LdhBm_65F, LdhBm_255R	200	BAC
<i>kettin</i>	Ket_F01_1243, Ket_R01_1602	540	BAC
<i>Tpi</i>	Tpi_F_009-015, Tpi_R_170-164	430	BAC

3.6. Prohledání BAC knihovny

Vlastní prohledání BAC knihovny obaleče jablečného probíhalo v rámci stáže M. Dalíkové a M. Vítkové v laboratoři Lisy G. Neven (Yakima Agriculture Research Laboratory, Wapato, USA) a nebylo tedy součástí této práce. Knihovna byla prohledávána hybridizací sond značených alkali-labilním digoxigeninem na Hybond-N⁺ nylonovou membránu, na kterou byly nanесeny všechny klony knihovny, tzv. “*high-density BAC colony filter*”. Podrobné informace o způsobu prohledávání BAC knihovny obaleče jablečného je možné nalézt v práci Dalíková (2009).

3.7. BAC-FISH

Chromosomální preparáty pachytenních spermatocytů pro BAC-FISH byly připraveny tzv. “*spreading*” technikou z testes larev obaleče jablečného podle Mediouni a kol. (2004). Samotná BAC-FISH byla prováděna podle Yoshido a kol. (2005a). Ve stručnosti, chromosomální preparáty byly odvodněny v etanolové řadě (70%, 80% a 96% etanol) a po oschnutí denaturovány 3,5 minuty při 68°C v 70% formamidu v 2x SSC. Hybridizační směs pro jedno sklíčko obsahovala fluorescenčně značené sondy (viz níže) a 3 µg neznačené sonikované samčí genomové DNA obaleče jablečného v 10 µL 50% formamidu a 10% dextransulfátu v 2x SSC. Množství použité sondy záviselo na fluorochromu, kterým byla naznačena (50 ng sondy značené SpectrumOrange, 100 ng sondy značené SpectrumGreen, 200 ng sondy značené Cy5 a 500 ng sondy značené SpectrumRed). Skla byla inkubována s denaturovanou hybridizační směsí (denaturace 5 minut při 90°C) tři dny při 37°C a následně promyta v 0,1x SSC s 1% Tritonem X-100. Preparáty byly zakápnuty médiem Vectashield Mounting Medium obsahujícím DAPI (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA). Preparáty byly vyhodnoceny a zdokumentovány na fluorescenčním mikroskopu DM6000B vybaveném DFC350FX CCD kamerou (Leica Microsystems CMS, GmbH, Wetzlar, SRN).

Sondy byly odmývány dle protokolu v práci Shibata a kol. (2009). Po dokumentaci výsledků bylo opatrně odstraněno krycí sklíčko a preparát byl na 10 minut ponořen do stripovacího roztoku (50% formamid a 1% triton X-100 v 0,1x SSC) vyhřátého na 70°C a následně opláchnut v destilované vodě, dehydratován v etanolové řadě a po oschnutí skladován v -20°C pro opětovnou hybridizaci (tzv. “*reprobing*”).

3.8. Southernova hybridizace

Samčí a samičí genomová DNA byla současně naštěpena dvěma restrikcími enzymy, *EcoRI* a *PstI* (Takara). Štěpící reakce o objemu 20 µL obsahovala 5 µg genomové DNA, 1x H pufr (dodaný výrobcem společně s enzymy) a 20 U každého enzymu. Enzymy byly přidány ve dvou krocích, nejdříve 10 U a po hodinové inkubaci ve 37°C bylo přidáno zbylých 10 U. Reakce byla ponechána ve 37°C přes noc a poté zastavena přidáním nanášecího pufru. Na 1% agarozový gel v 1x TBE pufru bylo naneseno po 5 µg samčí a samičí naštěpené DNA a DIG značený velikostní DNA

marker (DNA Molecular Weight Marker III, DIG labeled; Roche Diagnostics). Fragmenty DNA byly elektroforeticky separovány rychlostí 5V/cm gelu. Přenesení DNA na membránu, její hybridizace se sondou a následná chemiluminiscenční detekce probíhala s drobnými změnami podle práce Fuková a kol. (2007). DNA byla přenesena na nylonovou membránu Hybond N⁺ (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) a fixována ve Stralinker UV Crosslinkeru (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Potom byla membrána hodinu promývána hybridizačním roztokem DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics) při 42°C a nakonec inkubována přes noc při stejné teplotě v 10 mL roztoku DIG Easy Hyb se 100 ng předem denaturované digoxigeninem značené sondy. Po skončení hybridizace byla membrána promývána 0,1% SDS v 2x SSC při pokojové teplotě a 0,1%SSC v 0,2x SSC při teplotě 68°C. Po propláchnutí v 0,3% Tweenu 20 v 1x TBS (25 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl, pH 7,5) byla membrána blokována v 5% odtučněném sušeném mléce (Difco Skim Milk, Becton, Dickinson and Company, Francie) a ve stejném blokovacím roztoku inkubována s protilátkou proti digoxigeninu konjugovanou s alkalickou fosfatázou (Anti-Digoxigenin-AP ředěný 1:10000) (Roche Diagnostics). Po důkladném promytí membrány v 0,3% Tweenu 20 v 1x TBS byla membrána opláchnuta v detekčním pufru (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5) a inkubována s chemiluminiscenčním substrátem CDP-*Star*, ready-to-use (Roche Diagnostics). Chemiluminiscence byla snímána CCD kamerou systému Lumi-Imager LAS-3000 (Fujifilm Life Science, Stamford, CT, USA).

4 Výsledky

4.1. Izolace ortologů obaleče jablečného

Hybridizační sondy určené pro prohledání BAC knihoven by neměly obsahovat repetitivní sekvence, které mohou zvýšit množství falešně pozitivních klonů. Proto byly ortology genů zpočátku izolovány z cDNA, která neobsahuje intronické sekvence. RNA byla izolována z různých tkání housenek obaleče jablečného a exprese všech zájmových genů v těchto tkáních byla ověřena v EST databázi bource morušového, *B. mori*, SilkBase (<http://morus.ab.a.u-tokyo.ac.jp/cgi-bin/index.cgi>). Pro ověření správného průběhu izolace RNA a reverzní transkripce byl použit elongační faktor *EF1 α* , který se, coby tzv. "housekeeping" gen se stálou expresí, běžně používá jako vnitřní kontrola při kvantitativní RT-PCR (Nicot a kol., 2005). Jeho úspěšná amplifikace vyloučila možnost degradace RNA nebo selhání přepisu RNA do jednovláknové cDNA. Přesto se pomocí RT-PCR s degenerovanými primery s různou úspěšností dařila pouze amplifikace jediného genu, *triosa fosfát isomerázy*. Proto bylo od tohoto postupu upuštěno. Pozdější úspěšná amplifikace těchto genů při použití stejného templátu ale se specifickými primery (neukázáno) naznačuje, že za problémy s RT-PCR s degenerovanými primery stojí patrně nižší hladina exprese zájmových genů v kombinaci s vysokou degenerovaností primerů. Součinnost těchto dvou faktorů zřejmě značně snížila efektivitu RT-PCR. Amplifikace zájmových genů z genomové DNA byla již úspěšnější. Kromě částečných sekvencí genů *6-fosfoglukonát dehydrogenáza (6-pgd)*, *apterous (Ap)*, *kettin (Ket)*, *laktát dehydrogenáza (Ldh)* a *triosa fosfát isomeráza (Tpi)* obaleče jablečného se podařilo vyizolovat také tři geny, jmenovitě *Ap*, *Ket* a *Tpi* zavíječe moučného, *Ephestia kuehniella*. Seznam získaných sekvencí jednotlivých genů společně s použitými primery, reakčními podmínkami a empiricky zjištěnou teplotou nasednutí primerů (T_A) je uveden v Tab. 2.

4.2. Mapování získaných ortologů obaleče jablečného metodou BAC-FISH

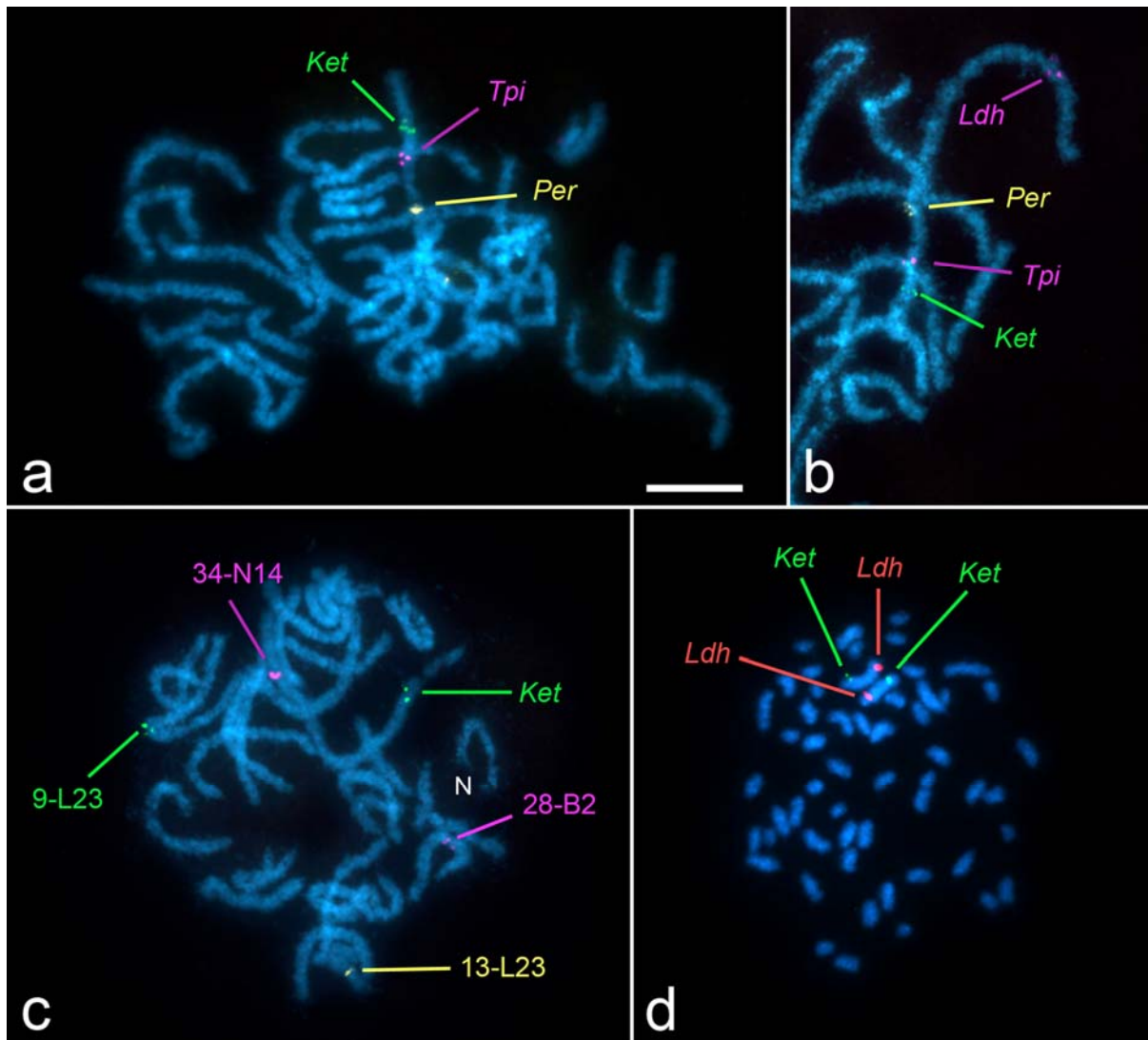
Jak již bylo zmíněno v kap. 3.6, klony BAC nesoucí ortology zájmových genů byly získány M. Dalíkovou a M. Vítkovou v rámci pracovní stáže v laboratoři Lisy G. Neven. K prohledání BAC knihovny obaleče jablečného byly použity sondy pro *Ket*, *Ldh* a *Tpi* připravené z exonů (*Ket*, *Ldh*) nebo cDNA (*Tpi*). Primery použité pro přípravu těchto sond jsou uvedeny v Tab. 3. Klony BAC identifikované hybridizací

těchto sond byly následně ověřeny polymerázovou řetězovou reakcí. Přestože byly jako sondy použity výhradně kódující sekvence, odhalila PCR velké množství falešně pozitivních klonů (Tab. 4). Z BAC-DNA takto ověřených klonů nesoucích ortology genů *Ket*, *Ldh* a *Tpi* a klonu BAC obsahujícího ortolog genu *period*, *Cpper*, který byl u obaleče jablečného nedávno izolován (Fuková et al., 2009), byly následně připraveny hybridizační sondy pro BAC FISH.

Při FISH bylo možné použít současně sondy značené až čtyřmi různými fluorochromy (viz. kap. 3.7). Emisní spektrum fluorochromu SpectrumRed se však částečně překrývalo s emisními spektry fluorochromů Cy5 a SpectrumOrange, a proto nebyl tento fluorochrom při FISH s větším počtem sond používán. Namísto toho byly po FISH zdokumentovány na sklech všechny hodnotitelné komplementy pachytenních bivalentů a v případě potřeby byla skla odmyta a následně hybridizována s dalšími sondami.

Nejdříve byly na samčí chromosomální preparáty obaleče jablečného hybridizovány sondy pro *Ket*, *Per* a *Tpi*. Všechny sondy hybridizovaly k jedinému pachytennímu bivalentu (Obr. 2a). Signály byly lokalizovány v oblasti odpovídající asi jedné jeho třetině v pořadí od konce *Ket* – *Tpi* – *Per*. Preparáty byly odmyty a opětovně hybridizovány se sondou pro *Ldh*. Tato sonda hybridizovala ke stejnému páru chromosomů jako sondy pro *Ket*, *Tpi* a *Per*. Signál byl umístěn na opačném konci bivalentu (Obr. 2b). Na samčích chromosomálních preparátech se vedle pachytenních jader příležitostně vyskytovala také jádra mitotická. V nich sondy hybridizovaly ke dvěma největším chromosomům mitotického komplementu (Obr. 2d). Tyto dva největší elementy v samčím karyotypu obaleče jablečného byly v práci Fuková a kol. (2005) označeny jako chromosomy Z.

Sondy byly připraveny také z BAC klonů 9L-23, 13-L23 a 28-B2, které byly podle PCR kontroly falešně pozitivní pro gen *Ldh*. Tyto sondy byly společně s *Ldh* sondou 34-N14 hybridizovány k samčím chromosomálním preparátům. Sklíčko bylo následně odmyto a znovu hybridizováno se sondou pro *Ket* (Obr. 2c). Sondy pro *Ket* a *Ldh* (34-N14) dle očekávání ležely na stejném chromosomu. Signály zbylých tří klonů BAC však ležely v intersticiálních oblastech tří dalších chromosomů. V budoucnu by tedy mohly posloužit jako chromosomálně specifické markery.



Obr. 2. Výsledky fyzického mapování genů obaleče jablečného metodou BAC-FISH. Sondy byly značeny fluorochromy SpectrumGreen (zelená), SpectrumOrange (žlutá), Cy5 (fialová) a SpectrumRed (červená, použita jen na Obr. 2d). Chromosomy jsou podbarveny DAPI (modrá). **a** Samčí pachytenní jádro se signály klonů BAC nesoucích *Ket* (33-L16), *Per* (23-C16) a *Tpi* (32-P12) lokalizovaných na jediném bivalentu. **b** Detail pachytenního bivalentu nesoucího geny *Ket*, *Ldh*, *Per* a *Tpi*. Po hybridizaci sond pro *Ket* (33-L16), *Per* (23-C16) a *Tpi* (32-P12) bylo sklíčko odmyto a opětovně hybridizováno se sondou pro *Ldh* (34-N14). **c** Samčí pachytenní jádro po hybridizaci BAC klonů selektovaných sondou připravenou z genu *Ldh* (9-L23, 13-L23, 28-B2, 34-N14). Klony 28-B2 a *Ldh* jsou naznačeny stejným fluorochromem. Pro identifikaci chromosomu Z byl preparát odmyt a opětovně hybridizován s BAC klonem nesoucím gen *Ket*. Na periférii jádra je patrný chromosom nesoucí na obou koncích organizátory jadérka (N). **d** Hybridizace sond pro *Ket* a *Ldh* k samčím mitotickým chromosomům obaleče jablečného. Sondy označily dva největší elementy mitotického komplementu. Měřítka = 10 μ m.

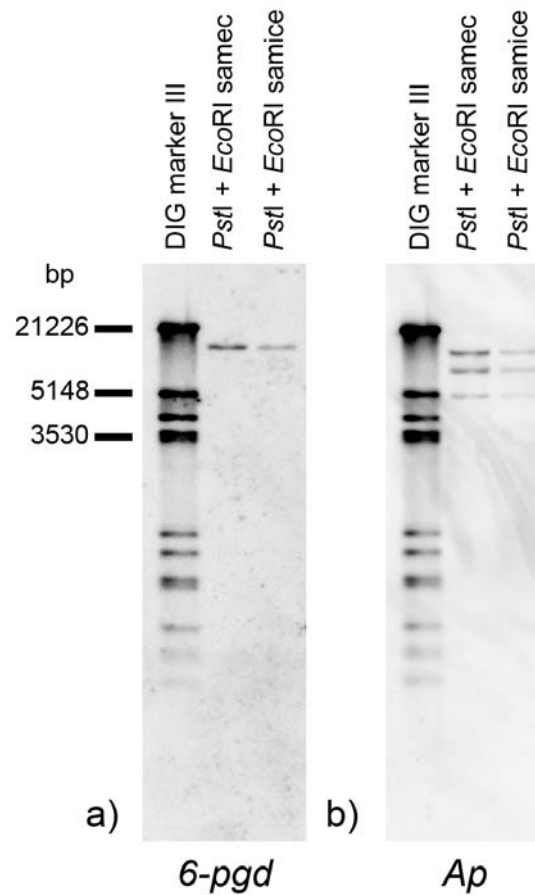
Tab. 4. Klony získané z BAC knihovny obaleče jablečného.

Gen	BAC klon	Ověřeno PCR s primery	Výsledek ^a
<i>kettin</i>	19-B19	Ket_F01_1243, Ket_R01_1602	-
	33-L16		+
<i>laktát dehydrogenáza</i>	28-B2	LdhBm_65F, LdhBm_255R	-
	9-L23		-
	13-L23		-
	34-N14		+
<i>period</i>	23-C16		
<i>triosa fosfát isomeráza</i>	32-P12	Tpi_Sp_F2, Tpi_Sp_R2	+
	14-G3		-
	44-O23		-
	12-G20		-
	10-P22		-

^aVýsledek: +, přítomnost příslušného genu byla potvrzena PCR se specifickými primery; -, falešně pozitivní klon.

4.3. Ověření vazby genů na chromosom Z pomocí Southernovy hybridizace

Sekvence genů *6-pgd* a *Ap* byly vyizolovány příliš pozdě na to, aby mohly být použity k prohledání BAC knihovny obaleče jablečného, a tak nebylo možné jejich lokalizaci v genomu fyzicky stanovit. Vazbu genu na pohlaví je však také možné nepřímo prokázat Southernovou hybridizací (Nanda a kol., 2000; Itoh a Arnold, 2005; Fuková a kol., 2007, 2009). Hybridizace *6-pgd* sondy (podrobnosti v Tab. 3) se samčí a samičí genomovou DNA štěpenou restričními enzymy *Pst*I a *Eco*RI ukázala jediný proužek lišící se svou intenzitou mezi pohlavími. Proužek v dráze se samčí DNA byl mnohem výraznější, než proužek samičí (Obr. 3a). To naznačuje, že gen pro *6-pgd* leží na chromosomu Z. Southernova hybridizace *Ap* sondy se samčí a samičí genomovou DNA štěpenou restričními enzymy *Pst*I a *Eco*RI odhalila hned tři proužky. Všechny se lišily svou intenzitou mezi samčí a samičí genomovou DNA (Obr. 3b). Jim odpovídající sekvence tedy patrně leží na chromosomu Z. Podrobnější analýza použité sondy (viz. Tab. 3) odhalila, že její sekvence kóduje konzervativní homeodoménu. Prohledání genomové databáze bource morušového, KaikoBase, aminokyselinovou sekvencí proteinu *Apteros octomilky* (přístupové číslo v databázi GenBank: acc. no. NP_724428) nástrojem tBLASTn odhalilo na chromosomu Z čtyři homologické sekvence. Kromě genu *apterous* zde leží tři další homeoboxy (identifikační číslo genu v KaikoBase: ID BGIBMGA002125-7). Hybridizace sond ke konzervativním sekvencím kódujícím proteinové domény bude patrně zodpovědná také za falešnou pozitivitu klonů BAC izolovaných z BAC knihovny obaleče.



Obr. 3. Výsledky Southernovy hybridizace sond připravených z genů **a)** *6-pgd* a **b)** *Ap* k 5 μ g samčí a samičí genomové DNA štěpené současně restričními enzymy *PstI* a *EcoRI*. Přestože byla nanáška samčí i samičí genomové DNA stejná, liší se signály svou intenzitou. Ta závisí na počtu kopií dané sekvence v genomu. V obou případech výraznější proužky u samců obaleče jablečného naznačují vazbu těchto genů na chromosom Z. Sonda pro *Ap* patrně hybridizovala k sekvencím konzervativních homeodomén nalezeným v genomu bource (podrobnosti v kap. 4.3).

5 Diskuse

Cílem této práce bylo ověřit syntenii chromosomu Z obaleče jablečného, *Cydia pomonella* (Tortricoidea), pomocí srovnávacího mapování genů fluorescenční *in situ* hybridizací s bakteriálními umělými chromosomy (BAC-FISH). Za tímto účelem byly z genomu obaleče jablečného polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) získány částečné sekvence pěti ortologů genů vázaných na chromosom Z bource morušového, *B. mori* (Bombycoidea). Na základě sekvencí genů *kettin* (*Ket*), *laktát dehydrogenáza* (*Ldh*), *period* (*Per*) a *triosa fosfát isomeráza* (*Tpi*) byly zkonstruovány hybridizační sondy, s jejichž pomocí byla prohledána BAC knihovna obaleče jablečného. K vyloučení falešné positivity byla použita PCR. Takto vyselektované BAC klony byly hybridizovány k samčím chromosomálním preparátům obaleče jablečného. Všechny čtyři sondy hybridizovaly k jednomu pachytennímu bivalentu v pořadí *Ket* – *Tpi* – *Per* – *Ldh*, které odpovídá vzájemné poloze těchto genů na chromosomu Z bource morušového (Obr. 4). V jiném experimentu sondy pro *Ket* a *Ldh* označily pár dvou největších chromosomů mitotického komplementu, označených v práci Fuková a kol. (2005) jako chromosom Z. Vazba genu *kettin* na chromosom Z byla také nezávisle ověřena hybridizací BAC klonu pro *Ket* spolu s klonem specifickým pro chromosom W obaleče jablečného k samičím pachytenním jádrům. Oba klony označili v samičím pachytenním jádře jediný bivalent (Dalíková, 2009). Vazba genů *6-fosfoglukonát dehydrogenáza* (*6-pgd*) a *apterous* (*Ap*) na chromosom Z byla prokázána Southernovou hybridizací. Na základě získaných poznatků lze tedy konstatovat, že mezi chromosomy Z obaleče jablečného a bource morušového existuje značná míra syntenie. Také pořadí zkoumaných genů zůstalo na těchto chromosomech zachováno, nelze však vyloučit, že na chromosomu Z obaleče jablečného došlo k intrachromosomálním přestavbám malého rozsahu, tak jak to bylo zjištěno u jiných druhů motýlů (Beldade a kol., 2009; Yasukochi a kol., v oponentním řízení).

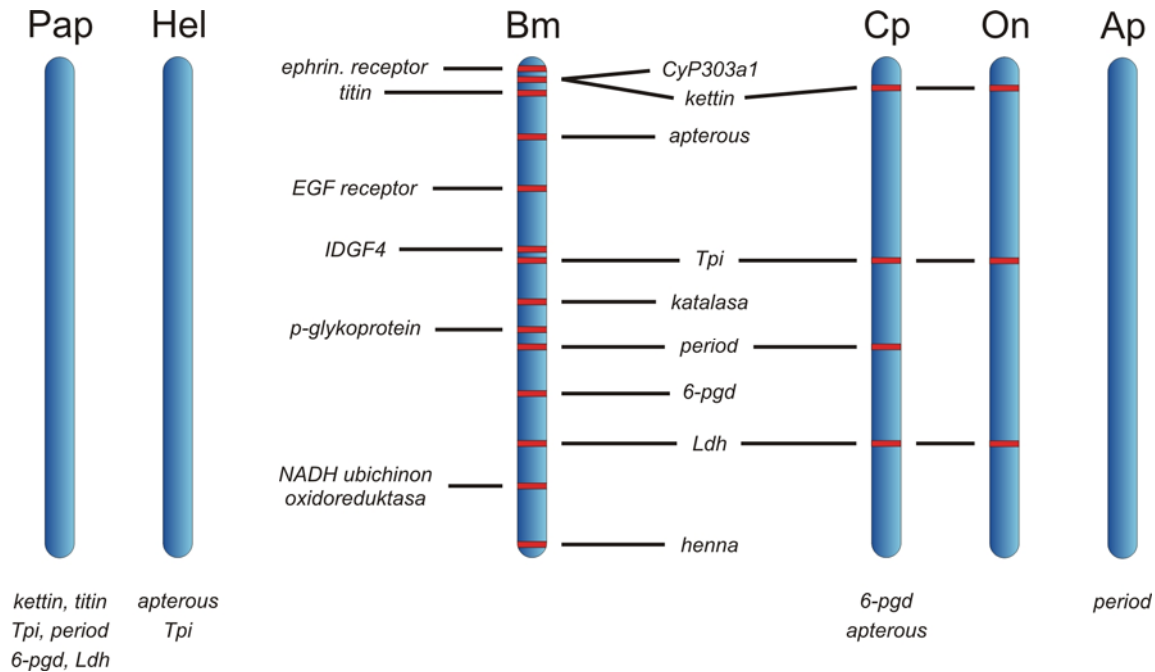
Srovnání syntenie mezi chromosomy Z obaleče jablečného a dalšími druhy motýlů je možné díky datům pocházejícím ze studia hybridních zón a dostupnosti genetických map u modelových druhů (Obr. 4 a 5). U druhů *Papilio glaucus* a *P. canadensis* tvořících hybridní zónu na východě Spojených států amerických bylo identifikováno několik znaků vázaných na chromosom Z. Vedle lokusů kontrolujících

pupální diapauzu, polymorfismus ve zbarvení samic a ovipoziční preference to byly také allozomy *Ldh* a *6-pgd* (Papilionidae, Papilionoidea) (Hagen a Scriber, 1989; Sperling, 1994). Později byly u těchto druhů na základě odhadnuté doby divergence pěti genů vázaných na chromosom Z, *Ket*, *Ldh*, *Per*, *Tpi* a *titin*, testovány alternativní speciální modely. Vazba těchto genů na chromosom Z byla v tomto případě prokázána pouze přítomností a absencí heterozygotních míst v sekvencích samců a samic (Putnam a kol., 2007). Také srovnání vazby genů *Ket*, *Ldh*, *Per* a *Tpi* u obaleče jablečného a otakárků rodu *Papilio* tedy potvrzuje syntenii chromosomu Z, tentokrát mezi nadčeledmi Tortricoidea a Papillioidea (Obr. 4). Poloha genu *titin* není sice u obaleče jablečného známa, u bource morušového ale také on leží na chromosomu Z (Koike a kol., 2003).

Také zavíječ kukuřičný, *Ostrinia nubilalis*, (Crambidae, Pyraloidea) představuje se svými dvěma liniemi lišícími se produkcí samičího feromonu a behaviorální odpovědí samce na tento feromon výjimečný modelový systém pro studium genetické podstaty speciace. Bylo zjištěno, že faktor ovlivňující behaviorální odpověď samce a *Tpi* obaleče kukuřičného leží na chromosomu Z (Sperling, 1994; Prowell, 1998; Dopman a kol., 2004). Dopman a kol. (2005) vytvořil později vazebnou mapu chromosomu Z zavíječe kukuřičného obsahující geny *Ket*, *Ldh* a *Tpi* a faktory, které ovlivňují samčí behaviorální odpověď k samičímu feromonu (*Resp*) a délku post-diapauzního vývoje (*Pdd*). Syntenie chromozomu Z včetně pořadí genů, je tedy, zdá se, zachována i v nadčeledi Pyraloidea (Obr. 4).

Významným modelem pro studium ekologické speciace jsou také mimetické babočky rodu *Heliconius* (Nymphalidae, Papilionoidea). Při studiu speciace, Haldanova pravidla a sterility hybridů mezi různými populacemi *H. melpomene* nebo *H. melpomene* a *H. cydno* byl pro vazebnou analýzu jako marker vázaný na pohlavní chromosom Z použit gen *Tpi* (Jiggins a kol., 2001; Naisbit a kol., 2002). Později Jiggins a kol. (2005) sestavil také genetickou mapu *H. melpomene*, která vedle AFLP a mikrosatelitových markerů obsahovala také 19 jaderných genů. Ke chromosomu Z byl vedle genu *Tpi* přiřazen i gen *apterous*, jeho přesnou pozici se však nepodařilo určit (Obr. 4). Tato mapa byla následně obohacena o další geny, žádný z nich však k chromosomu Z přiřazen nebyl (Pringle a kol., 2007). Srovnání genetické mapy babočky *H. melpomene* obsahující 72 genů s mapou bource morušového tak odhalilo vysokou míru zachované syntenie mezi jejich chromosomy, chromosom

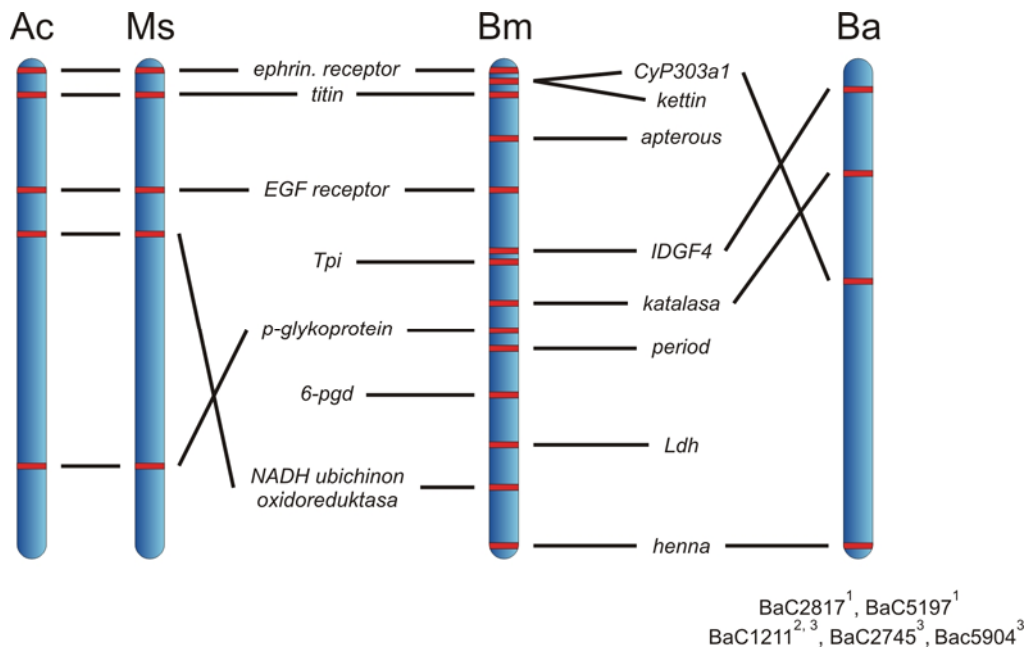
Z nevyjímaje (Yasukochi a kol., 2006; Pringle a kol., 2007). Bylo také prokázáno, že gen *period*, který hraje významnou úlohu v řízení cirkadiálních rytmů, leží na chromosomu Z martináče *Antheraea pernyi* (Saturnidae, Bombycoidea) (Gotter a kol., 1999; Obr. 4).



Obr. 4 Schematický přehled genů u nichž je známa vazba na chromosom Z. Syntenie a srovnání pořadí genů, pokud je známo, ležících na chromosomu Z mezi obalečem jablečným, *Cydia pomonella* (**Cp**) (tato práce) a zavíječem kukuřičným, *Ostrinia nubilalis* (**On**) (Sperling, 1994; Prowell, 1998; Dopman a kol., 2004), otakárky *Papilio glaucus* a *P. canadensis* (**Pap**) (Hagen a Scriber, 1989; Sperling, 1994; Putnam a kol., 2007), babočkami rodu *Heliconius* (**Hel**) (Jiggins a kol., 2001; Naisbit a kol., 2002; Jiggins a kol., 2005) a martináčem *Antheraea pernyi* (**Ap**) (Gotter a kol., 1999). Chromosom bource morušového je možné použít jak referenční bod pro srovnání syntenie mezi všemi druhy. Poloha a pořadí genů na chromosomu bource byla získána z genomové databáze bource KaikoBase.

Dalším cenným zdrojem informací o syntonii chromosomu Z pro nás mohou být nejnovější vazebné a fyzické mapy postavené na EST markerech, které umožňují srovnání pozice ortologních genů s referenčním genomem bource morušového (Obr. 5). Ve vazebné mapě okáče *Bicyclus anynana* (Nymphalidae, Papilionoidea), který je předním motýlím modelem pro evoluční a vývojovou (tzv. “evo-devo”) analýzu

komplexních znaků, bylo k chromosomu Z přiřazeno celkem devět EST markerů. Chromosomální pozici tří markerů se nepodařilo určit, ortolog jednoho z nich (BaC1211) v mapě bource morušového neleží na chromosomu Z. Syntenie zbylých genů je mezi bourcem morušovým a *B. anynana* zachována. Vzájemná poloha genů však nasvědčuje tomu, že chromosom Z u okáče *B. anynana* prodělal několik intrachromosomálních přestaveb (Beldade a kol., 2009).



Obr. 5. Schematický přehled genů u nichž je známa vazba na chromosom Z. Syntenie genů zjištěná na základě srovnání genetické mapy okáče *Bicyclus anynana* (**Ba**) (Beldade a kol., 2009) a fyzické mapy lišaje tabákového *Manduca sexta* (**Ms**) a lišaje svlačcového *Agrius convolvuli* (**Ac**) s genomem bource morušového (**Bm**) (Yasukochi a kol., v oponentním řízení). Chromosom bource morušového je možné použít jako referenční bod pro srovnání syntenie mezi všemi druhy. Poloha a pořadí genů na chromosomu bource byla získána z genomové databáze bource KaikoBase. ¹ Ortology těchto genů se autorovi této práce nepodařilo v genomu bource najít a nebylo tedy možné určit jejich polohu vůči ostatním genům; ² ortolog tohoto genu v genomu bource neleží na chromosomu Z; ³ poloha těchto genů na chromosomu Z není známa.

Zatím nejnovější, tentokrát fyzickou mapou je BAC karyotyp lišaje tabákového, *Manduca sexta* (Sphingidae, Bombycoidea). Na chromosom Z je v něm zamapováno pět genů, jejichž ortology jsou v genomu bource morušového ve vazbě na chromosom Z (Obr. 5). I v tomto případě je zde však patrná rozsáhlá inverze (Yasukochi a kol., v oponentním řízení). Stejně BAC klony byly hybridizovány i na chromosomální preparáty dalšího, blízce příbuzného, druhu lišaje *Agrius convolvuli*. I zde všechny geny náleží k jediné vazebné skupině (Obr. 5). Mezi lišaji *A. convolvuli* a *M. sexta* je navíc zachováno i pořadí studovaných genů na chromosomu (Yasukochi a kol., v oponentním řízení). K výše zmíněné inverzi tedy zřejmě došlo u společného předka obou lišajů. Ukazuje se tedy, že mezi chromosomem Z zástupců nadčeledí Tortricoidea, Pyraloidea, Bombycoidea a Papilionoidea zůstala, i přes jejich značnou divergenci, zachována značná syntenie genů a v některých případech také jejich pořadí na chromosomu. Pringle a kol. (2007) na základě molekulární analýzy odhadli dobu divergence mezi bourcem morušovým a babočkou *H. melpomene* na 100 milionů let. Sto milionů let izolace tedy nezanechalo na genovém obsahu chromosomů *B. mori* a *H. melpomene* žádné stopy. Konzervovaná syntenie genů chromosomu Z obaleče jablečného zjištěná v této práci dobu této evoluční stáze dále zvyšuje.

K uchování syntenie genů ležících na chromosomu Z došlo i během evoluce ptáků. Itoh a kol. (2006) odhalil pomocí BAC-FISH syntentii 14 genů mezi chromosomy Z zebřičky *Taeniopygia guttata* a kurem bankivským, *G. gallus*. Syntenie celkem 23 genů byla zaznamenána také mezi chromosomy Z kura a lejska bělokrkého, *Ficedula albicollis* (Backström a kol., 2006). Společný předek těchto druhů přitom žil před sto miliony let (Backström a kol., 2008). Značnou homologii chromosomu Z mezi kurem a pštroskem emu (*Dromaius novaehollandiae*) ukázalo i komparativní barvení chromosomů (“*comparative chromosome painting*”), tzv. Zoo-FISH (Shetty a kol., 1999).

Shetty a kol. (1999) vysvětluje konzervovanost chromosomu Z jako důsledek neobyčejné stability celého karyotypu ptáků. Také Backström a kol. (2006) preferuje možnost, že se syntenie genů u ptáků neomezuje jen na pohlavní chromosom Z, ale je typická pro většinu jejich chromosomů. To potvrzuje také porovnání vazebné mapy lejska bělokrkého s genomem kura (Backström a kol., 2008), které odhalilo, že je

rychlost extrachromosomálních přestaveb u ptáků podstatně nižší (asi jedna přestavba za 66 milionů let) než u savců (jedna přestavba za deset milionů let) (Wienberg, 2004). Za mimořádně stabilní je považována také organizace genomu motýlů. Jak už bylo uvedeno v kap. 1.3.1, modální, tj. nejčastější, počet chromosomů $n=31$ je současně považován za ancestrální karyotyp motýlů zachovaný u primitivních i odvozených taxonů (Suomalainen, 1966; Lukhtanov, 2000; De Prins a Saitoh, 2003). Tuto představu podporuje také makrosyntenie genů mezi *B. anynana* a *B. mori*. Oba druhy mají haploidní počet chromosomů $n=28$. Porovnání jejich map odhalilo jen tři velké extrachromosomální přestavby, nezávislé fúze, které zjevně vedly k jejich redukovanému počtu chromosomů (Beldade a kol., 2009). I haploidní karyotyp společného předka okáče *B. anynana* a bource *B. mori* tedy zřejmě sestával z 31 elementů.

Nic však nedokládá evoluční konzervovanost homomorfních pohlavních chromosomů lépe, než relativní nestabilita savčího karyotypu. Už Ohno, mimo jiné také na základě dostupných genetických dat dokládajících syntenii některých genů, předpokládal konzervovanost genového obsahu chromosomu X savců (Ohno, 1967; citován v Pathak a Stock, 1974). Komparativní mapování genů ukázalo, že chromosom X skutečně představuje zdaleka nejzachovalejší uspořádání genů mezi placentálními savci (Murphy a kol., 1999; Kohn a kol., 2004). Podobně také fyzické mapování genomu bělásků *Pieris rapae* ($n=25$) a *P. brassicae* ($n=15$) (Pieridae, Papilionoidea) oproti všem očekáváním odhalilo rozsáhlou reorganizaci celého genomu s výjimkou chromosomu Z (Naito Y, nepublikované výsledky). Zdá se tedy, že je evoluční stabilita obecnou vlastností homomorfních pohlavních chromosomů. Ohno hledal příčinu stability genového obsahu pohlavního chromosomu X v mechanismu kompenzace genové dávky savců. Translokace genu na nebo z chromosomu X podle jeho hypotézy způsobí nevyváženost genové dávky mezi dvěma pohlavími, která bude pravděpodobně pod silným selekčním tlakem (Ohno, 1967; citován v Backström a kol., 2006). Jak už bylo zmíněno výše (kap. 1.2 a 1.3.1), ptáci a motýli postrádají kompenzaci genové dávky. To však neznamená, že by Ohnova hypotéza zcela ztrácela na platnosti. U ptáků kontrola exprese genů vázaných na chromosom Z probíhá individuálně a liší se v závislosti na tkáni a vývojovém stadiu. Samci ptáků jsou schopni tolerovat vyšší hladiny exprese většiny genů ležících na chromosomu Z a genovou dávku kompenzují dle potřeby jen u

některých genů (Mank a Ellegren, 2009). Právě ty budou patrně hrát roli v klíčových vývojových procesech a budou tedy vůči změně genové dávky obzvlášť citlivé. Také akumulace sexuálně antagonistických a speciálních genů na chromosomech X a Z (viz. kap. 1.2) jistě ovlivňuje jejich stabilitu. Translokace genů z pohlavních chromosomů pravděpodobně povede k narušení vazebné nerovnováhy vytvořené dlouhým procesem jejich diferenciací. Vzhledem k tomu, že jsou na pohlavních chromosomech akumulovány geny úzce související s reprodukční úspěšností jedince, bude taková změna pod silným selekčním tlakem. V této souvislosti je zajímavá mutantní linie ASF-3 zavíječe moučného, *Ephestia kuehniella*, nesoucí zářením indukovanou translokaci části chromosomu Z na autosom. U této linie byla zaznamenána embryonální letalita samců nesoucích translokovaný fragment (Marec a kol., 2001). Embryonální letalita by tak mohla být způsobena trisomií části chromosomu Z. Alternativním vysvětlením může být narušení vazebné nerovnováhy genu s pohlavně specifickou expresí a jeho cis-modifikátoru (Hurst a Randerson, 1999; Vicoso a Charlesworth, 2006).

Stabilita chromosomu Z je základní podmínkou pro budoucí studium evoluce pohlavních chromosomů motýlů. Tato práce prokázala zachovalou syntenii genů chromosomu Z mezi obalečem jablečným, patřícím do nadčeledi Tortricoidea, jedné z bazálních linií skupiny Ditrysia (Grimaldi a Engel, 2005), a druhy z nadčeledí Pyraloidea, Bombycoidea a Papilionoidea. Podporuje tedy hypotézu o společném původu chromosomu Z druhů skupiny Ditrysia a otevírá cestu k odhalení evolučního původu chromosomu W motýlů.

6 Souhrn

Tato práce se zabývá studiem syntenie genů pohlavního chromosomu Z obaleče jablečného, *Cydia pomonella*, který je řazen do nadčeledi Tortricoidea, jedné z bazálních linií skupiny Ditrysia. Celkem bylo v rámci této práce izolováno a sekvenováním ověřeno šest ortologů ke genům lokalizovaným u modelových druhů motýlů na chromosomu Z, jmenovitě ortologů pro *6-fosfoglukonát dehydrogenázu* (*6-pgd*), *apterous* (*Ap*), *kettin* (*Ket*), *laktát dehydrogenázu* (*Ldh*), *period* (*Per*), *triosa fosfát isomerázu* (*Tpi*). S výjimkou genu *titin* byly tedy u obaleče jablečného získány sekvence všech známých genů vázaných na chromosom Z nadčeledí Pyraloidea a Papilionoidea. To společně s osekvenovaným genomem bource morušového (*Bombyx mori*) umožnilo srovnání syntenie chromosomu Z napříč skupinou Ditrysia, zahrnující 98% žijících druhů motýlů. Čtyři z těchto genů posloužily jako sondy k prohledání BAC knihovny obaleče jablečného. Získané klony BAC byly použity k fyzickému mapování genů metodou BAC-FISH. Vazba dalších dvou ortologů obaleče jablečného na chromosom Z byla potvrzena Southernovou hybridizací. Výsledky této práce spolu s údaji dostupnými v literatuře prokázaly zachovanou syntentii genů chromosomu Z mezi skupinami Tortricoidea, Pyraloidea, Papilionoidea a Bombycoidea. Významně tak podpořily hypotézu o společném původu a stabilitě chromosomu Z skupiny Ditrysia. Prokázání společného původu nám umožní využití chromosomu Z pro studium evoluční historie pohlavních chromosomů motýlů obecně a napomůže k odhalení původu chromosomu W.

7 Reference

- Abe H, Mita K, Yasukochi Y, Oshiki T, Shimada T (2005) Retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Cytogenet. Genome Res.* **110**:144-151.
- Ayling LJ, Griffin DK (2002) The evolution of sex chromosomes. *Cytogenet. Genome Res.* **99**:125-140.
- Backström N, Brandström M, Gustafsson L, Qvarnström A, Cheng H, Ellegren H (2006) Genetic mapping in a natural population of collared flycatchers (*Ficedula albicollis*): Conserved synteny but gene order rearrangements on the avian Z chromosome. *Genetics* **174**:377-386.
- Backström N, Karaiskou N, Leder EH, Gustafsson L, Primmer CR, Qvarnström A, Ellegren H (2008) A gene-based genetic linkage map of the collared flycatcher (*Ficedula albicollis*) reveals extensive synteny, gene-order conservation during 100 million years of avian evolution. *Genetics* **179**:1479-1495.
- Bedo DG (1984) Karyotypic, chromosome banding studies of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera, Gelechiidae). *Can. J. Genet. Cytol.* **26**:141-145.
- Beldade P, Saenko SV, Pul N, Long AD (2009) A gene-based linkage map for *Bicyclus anynana* butterflies allows for a comprehensive analysis of synteny with the lepidopteran reference genome. *PLoS Genet* **5**:e1000366.
- Bergero R, Charlesworth D (2009) The evolution of restricted recombination in sex chromosomes. *Trends Ecol. Evol.* **24**:94-102.
- Carvalho AB (2002) Origin and evolution of the *Drosophila* Y chromosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**:664-668.
- Carvalho AB, Clark AG (2005) Y chromosome of *D. pseudoobscura* is not homologous to the ancestral *Drosophila* Y. *Science* **307**:108-110.
- Charlesworth B, Charlesworth D (1978) Model for evolution of dioecy and gynodioecy. *Am. Nat.* **112**:975-997.
- Charlesworth B (1996) The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Curr. Biol.* **6**:149-162.
- Dalíková M (2009) Využití BAC klonů při studiu pohlavního chromosomu W obaleče jablečného *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). Diplomová práce, v češtině, 30 p., Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Česká republika.
- De Prins J, Saitoh K (2003) Karyology and sex determination.. In: Kristensen NP (ed.) *Lepidoptera, moths and butterflies 2: morphology, physiology, and development*, pp. 449–468. Walter de Gruyter, Berlin – New York.
- Dopman EB, Bogdanowicz SM, Harrison RG (2004) Genetic mapping of sexual isolation between E and Z pheromone strains of the european corn borer (*Ostrinia nubilalis*). *Genetics* **167**:301-309.
- Dopman EB, Perez L, Bogdanowicz SM, Harrison RG (2005) Consequences of reproductive barriers for genealogical discordance in the european corn borer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**:14706-14711.
- Fuková I, Nguyen P, Marec F (2005) Codling moth cytogenetics: karyotype, chromosomal location of rDNA, and molecular differentiation of sex chromosomes. *Genome* **48**:1083-1092.
- Fuková I, Traut W, Vitková M, Nguyen P, Kubicková S, Marec F (2007) Probing the W chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin. *Chromosoma* **116**:135-145.

- Fuková I, Neven LG, Bárcenas NM, Gund NA, Dalíková M, Marec F (2009) Rapid assessment of the sex of codling moth *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae) eggs and larvae. *J. Appl. Entomol.* **133**:249-261.
- Gotter AL, Levine JD, Reppert SM (1999) Sex-linked period genes in the silkworm, *Antheraea pernyi*: Implications for circadian clock regulation and the evolution of sex chromosomes. *Neuron* **24**:953-965.
- Graves JAM (2000) Human Y chromosome, sex determination, and spermatogenesis - A feminist view. *Biol. Reprod.* **63**:667-676.
- Graves JAM (2005) Recycling the Y chromosome. *Science* **307**:50-51.
- Graves JAM (2006) Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. *Cell* **124**:901-914.
- Grimaldi D, Engel MS (2005) *Evolution of the insects*. Cambridge university press, Cambridge.
- Gruha JW, Taylor OR (1980) The effect of X chromosome inheritance on mate selection behavior in the sulfur butterflies, *Colias eurytheme* and *Colias philodice*. *Evolution* **34**:688-695.
- Hagen RH, Scriber JM (1989) Sex-linked diapause, color, and allozyme loci in *Papilio glaucus* - Linkage analysis and significance in a hybrid zone. *J. Hered.* **80**:179-185.
- Hughes JF, Skaletsky H, Pyntikova T, Minx PJ, Graves T, Rozen S, Wilson RK, Page DC (2005) Conservation of Y-linked genes during human evolution revealed by comparative sequencing in chimpanzee. *Nature* **437**:101-104.
- Hurst LD, Randerson JP (1999) An eXceptional chromosome. *Trends Genet.* **15**:383-385.
- Itoh Y, Kampf K, Arnold AP (2006) Comparison of the chicken and zebra finch Z chromosomes shows evolutionary rearrangements. *Chromosome Res.* **14**:805-815.
- Iyengar VK, Reeve HK, Eisner T (2002) Paternal inheritance of a female moth's mating preference. *Nature* **419**:830-832.
- Jiggins CD, Linares M, Naisbit RE, Salazar C, Yang ZH, Mallet J (2001) Sex-linked hybrid sterility in a butterfly. *Evolution* **55**:1631-1638.
- Jiggins CD, Mavarez J, Beltran M, McMillan WO, Johnston JS, Bermingham E (2005) A genetic linkage map of the mimetic butterfly *Heliconius melpomene*. *Genetics* **171**:557-570.
- Just W, Baumstark A, Hameister H, Schreiner B, Reisert I, Hakhverdyan M, Vogel W (2002) The sex determination in *Ellobius lutescens* remains bizarre. *Cytogenet. Genome Res.* **96**:146-153.
- Kaiser VB, Ellegren H (2006) Nonrandom distribution of genes with sex-biased expression in the chicken genome. *Evolution* **60**:1945-1951.
- Kandul NP, Lukhtanov VA, Dantchenko AV, Coleman JWS, Sekercioglu CH, Haig D, Pierce NE (2004) Phylogeny of *Agrodiaetus* Hübner 1822 (Lepidoptera : Lycaenidae) inferred from mtDNA sequences of *COI* and *COII* and nuclear sequences of *EF1 α* : Karyotype diversification and species radiation. *Syst. Biol.* **53**: 278-298.
- Kawai A, Nishida-Umehara C, Ishijima J, Tsuda Y, Ota H, Matsuda Y (2007) Different origins of bird and reptile sex chromosomes inferred from comparative mapping of chicken Z-linked genes. *Cytogenet. Genome Res.* **117**:92-102.
- Khil PP, Smirnova NA, Romanienko PJ, Camerini-Otero RD (2004) The mouse X chromosome is enriched for sex-biased genes not subject to selection by meiotic sex chromosome inactivation. *Nat. Genet.* **36**:642-646.
- Kirkpatrick M, Hall DW (2004) Sexual selection and sex linkage. *Evolution* **58**:683-691.

- Kohn M, Kehrer-Sawatzki H, Vogel W, Graves JAM, Hameister H (2004) Wide genome comparisons reveal the origins of the human X chromosome. *Trends Genet.* **20**:598-603.
- Koike Y, Mita K, Suzuki MG, Maeda S, Abe H, Osoegawa K, Dejong PJ, Shimada T (2003) Genomic sequence of a 320-kb segment of the Z chromosome of *Bombyx mori* containing a *kettin* ortholog. *Mol. Genet. Genomics* **269**:137-149.
- Kronforst MR (2005) Primers for the amplification of nuclear introns in *Heliconius* butterflies. *Mol. Ecol. Notes* **5**:158-162.
- Larsson J, Meller VH (2006) Dosage compensation, the origin and the afterlife of sex chromosomes. *Chromosome Res.* **14**:417-431.
- Lukhtanov VA (2000) Sex chromatin and sex chromosome systems in nonditrysian Lepidoptera (Insecta). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **38**:73-79.
- Mank JE, Ellegren H (2009) All dosage compensation is local: Gene-by-gene regulation of sex-biased expression on the chicken Z chromosome. *Heredity* **102**:312-320.
- Marec F (1990) Genetic control of pest Lepidoptera - Induction of sex linked recessive lethal mutations in *Ephestia kuehniella* (Pyralidae). *Acta Entomol. Bohemoslov.* **87**:445-458.
- Marec F, Traut W (1993) Synaptonemal complexes in female and male meiotic prophase of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). *Heredity* **71**:394-404.
- Marec F, Novak K (1998) Absence of sex chromatin corresponds with a sex-chromosome univalent in females of Trichoptera. *Eur. J. Entomol.* **95**:197-209.
- Marec F, Tothova A, Sahara K, Traut W (2001) Meiotic pairing of sex chromosome, fragments and its relation to atypical transmission of a sex-linked marker in *Ephestia kuehniella* (Insecta: Lepidoptera). *Heredity* **87**:659-671.
- Mediouni J, Fukova I, Frydrychova R, Dhouibi MH, Marec F (2004) Karyotype, sex chromatin and sex chromosome differentiation in the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae). *Caryologia* **57**:184-194.
- Ming R, Moore PH (2007) Genomics of sex chromosomes. *Curr. Opin. Plant Biol.* **10**:123-130.
- Mita K, Kasahara M, Sasaki S a kol. (2004) The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Res.* **11**:27-35.
- Murakami A, Imai HT (1974) Cytological evidence for holocentric chromosomes of silkworms, *Bombyx mori* and *B. mandarina*, (Bombycidae, Lepidoptera). *Chromosoma* **47**:167-178.
- Murphy WJ, Sun S, Chen ZQ, Pecon-Slattey J, O'Brien SJ (1999) Extensive conservation of sex chromosome organization between cat and human revealed by parallel radiation hybrid mapping. *Genome Res.* **9**:1223-1230.
- Naisbit RE, Jiggins CD, Linares M, Salazar C, Mallet J (2002) Hybrid sterility, Haldane's rule and speciation in *Heliconius cydno* and *H. melpomene*. *Genetics* **161**:1517-1526.
- Nanda I, Zend-Ajus E, Shan Z, Grutzner F, Scharl M, Burt DW, Koehler M, Fowler VM, Goodwin G, Schneider WJ, Mizuno S, Dechant G, Haaf T, Schmid M (2000) Conserved synteny between the chicken Z sex chromosome and human chromosome 9 includes the male regulatory gene DMRT1: a comparative (re)view on avian sex determination. *Cytogenet. Cell Genet.* **89**:67-78.
- Nguyen P, Sahara K, Yoshido A, Marec F (v oponentním řízení) Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera).
- Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J. Exp. Bot.* **56**:2907-2914.

- Nokkala S, Grozeva S, Kuznetsova V, Maryanska-Nadachowska A (2003) The origin of the achiasmatic XY sex chromosome system in *Cacopsylla peregrina* (Frst.) (Psylloidea, Homoptera). *Genetica* **119**:327-332.
- Pathak S, Stock AD (1974) X chromosomes of mammals - Karyological homology as revealed by banding techniques. *Genetics* **78**:703-714.
- Presgraves DC (2002) Patterns of postzygotic isolation in Lepidoptera. *Evolution* **56**:1168-1183.
- Pringle EG, Baxter SW, Webster CL, Papanicolaou A, Lee SF, Jiggins CD (2007) Synteny and chromosome evolution in the Lepidoptera: Evidence from mapping in *Heliconius melpomene*. *Genetics* **177**:417-426.
- Provazník J (2008) Identifikace genů chromosomu Z pro studium evoluce pohlavních chromosomů motýlů. Bakalářská práce, v češtině, 22 p., Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Česká republika.
- Prowell DP (1998) Sex linkage and speciation in Lepidoptera., *In*: Howard DJ, Berlocher (eds) *Endless forms: Species and speciation*, pp. 309–319. Oxford University Press, Oxford.
- Putnam AS, Scriber JM, Andolfatto P (2007) Discordant divergence times among Z-chromosome regions between two ecologically distinct swallowtail butterfly species. *Evolution* **61**:912-927.
- Qvarnstrom A, Bailey RI (2009) Speciation through evolution of sex-linked genes. *Heredity* **102**:4-15.
- Reeve HK, Pfennig DW (2003) Genetic biases for showy males: Are some genetic systems especially conducive to sexual selection? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**:1089-1094.
- Rego A, Marec F (2003) Telomeric and interstitial telomeric sequences in holokinetic chromosomes of Lepidoptera: Telomeric DNA mediates association between postpachytene bivalents in achiasmatic meiosis of females. *Chromosome Res.* **11**:681-694.
- Reinhold K (1998) Sex linkage among genes controlling sexually selected traits. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **44**:1-7.
- Rice WR (1984) Sex chromosomes and the evolution of sexual dimorphism. *Evolution* **38**:735-742.
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *In*: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics methods and protocols: Methods in molecular biology*, pp 365-386. Humana Press, Totowa.
- Saether SA, Saetre GP, Borge T, Wiley C, Svedin N, Andersson G, Veen T, Haavie J, Servedio MR, Bures S, Kral M, Hjernquist MB, Gustafsson L, Traff J, Qvarnstrom A (2007) Sex chromosome-linked species recognition and evolution of reproductive isolation in flycatchers. *Science* **318**:95-97.
- Saetre GP, Borge T, Lindroos K, Haavie J, Sheldon BC, Primmer C, Syvanen AC (2003) Sex chromosome evolution and speciation in *Ficedula* flycatchers. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **270**:53-59.
- Sahara K, Marec F, Traut W (1999) TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Res.* **7**:449-460.
- Sahara K, Yoshido A, Kawamura N, Ohnuma A, Abe H, Mita K, Oshiki T, Shimada T, Asano S, Bando H, Yasukochi Y (2003a) W-derived BAC probes as a new tool for identification of the W chromosome and its aberrations in *Bombyx mori*. *Chromosoma* **112**:48-55.
- Sahara K, Marec F, Eickhoff U, Traut W (2003b) Moth sex chromatin probed by comparative genomic hybridization (CGH). *Genome* **46**:339-342.

- Sahara K, Yoshido A, Marec F, Fukova I, Zhang HB, Wu CC, Goldsmith MR, Yasukochi Y (2007) Conserved synteny of genes between chromosome 15 of *Bombyx mori* and a chromosome of *Manduca sexta* shown by five-color BAC-FISH. *Genome* **50**:1061-1065.
- Saifi GM, Chandra HS (1999) An apparent excess of sex- and reproduction-related genes on the human X chromosome. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **266**:203-209.
- Servedio MR, Saetre GP (2003) Speciation as a positive feedback loop between postzygotic and prezygotic barriers to gene flow. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **270**:1473-1479.
- Shetty S, Griffin DK, Graves JAM (1999) Comparative painting reveals strong chromosome homology over 80 million years of bird evolution. *Chromosome Res.* **7**:289-295.
- Shibata F, Sahara K, Naito Y, Yasukochi Y (2009) Reprobing Multicolor FISH Preparations in Lepidopteran Chromosome. *Zool. Sci.* **26**:187-190.
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ a kol. (2003) The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* **423**:825-8U2.
- Sperling FAH (1994) Sex linked genes and species differences in Lepidoptera. *Canadian Entomol.* **126**:807-818.
- Spigler RB, Lewers KS, Main DS, Ashman TL (2008) Genetic mapping of sex determination in a wild strawberry, *Fragaria virginiana*, reveals earliest form of sex chromosome. *Heredity* **101**:507-517.
- Šíchová J (2009) Analýza pohlavního chromosomu Z obaleče jablečného (*Cydia pomonella*) pomocí laserové mikrodisekce. Bakalářská práce, v češtině, 45 p., Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Česká republika.
- Storchova R, Divina P (2006) Nonrandom representation of sex-biased genes on chicken Z chromosome. *J. Mol. Evol.* **63**:676-681.
- Suomalainen E (1966) Achiasmatische Oogenese Bei Trichopteren. *Chromosoma* **18**:201-207.
- Suomalainen E (1969) Chromosome evolution in the Lepidoptera. In: Darlington CD, Lewis KR (Eds.) *Chromosomes Today* **2**, pp. 132-138. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Suzuki MG, Shimada T, Kobayashi M (1998) Absence of dosage compensation at the transcription level of a sex-linked gene in a female heterogametic insect, *Bombyx mori*. *Heredity* **81**:275-283.
- Suzuki MG, Shimada T, Kobayashi M (1999) *Bm kettin*, homologue of the *Drosophila kettin* gene, is located on the Z chromosome in *Bombyx mori* and is not dosage compensated. *Heredity* **82**:170-179.
- Traut W (1976) Pachytene mapping in female silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera). *Chromosoma* **58**:275-284.
- Traut W, Clarke CA (1997) Karyotype evolution by chromosome fusion in the moth genus *Orgyia*. *Hereditas* **126**:77-84.
- Traut W, Eickhof U, Schorch JC (2001) Identification and analysis of sex chromosomes by comparative genomic hybridization (CGH). *Methods. Cell. Sci.* **23**: 155-161.
- Traut W, Marec F (1996) Sex chromatin in Lepidoptera. *Q. Rev. Biol.* **71**:239-256.
- Traut W, Marec F (1997) Sex chromosome differentiation in some species of Lepidoptera (Insecta). *Chromosome Res.* **5**:283-291.
- Traut W, Sahara K, Marec F (2007) Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sex. Dev.* **1**:332-346.

- Traut W, Sahara K, Otto TD, Marec F (1999) Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma* **108**:173-180.
- Veyrunes F, Waters PD, Miethke P, Rens W, McMillan D, Alsop AE, Gruzner F, Deakin JE, Whittington CM, Schatzkamer K, Kremitzki CL, Graves T, Ferguson-Smith MA, Warren W, Graves JAM (2008) Bird-like sex chromosomes of platypus imply recent origin of mammal sex chromosomes. *Genome Res.* **18**:965-973.
- Vicoso B, Charlesworth B (2006) Evolution on the X chromosome: unusual patterns and processes. *Nat. Rev. Genet.* **7**:645-653.
- Vitková M, Fuková I, Kubicková S, Marec F (2007) Molecular divergence of the W chromosomes in pyralid moths (Lepidoptera). *Chromosome Res.* **15**:917-930.
- Wang PJ, McCarrey JR, Yang F, Page DC (2001) An abundance of X-linked genes expressed in spermatogonia. *Nat. Genet.* **27**:422-426.
- Wienberg J (2004) The evolution of eutherian chromosomes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **14**:657-666.
- Wolf KW, Novak K, Marec F (1997) Kinetic organization of metaphase I bivalents in spermatogenesis of Lepidoptera and Trichoptera species with small chromosome numbers. *Heredity* **79**:135-143.
- Xia QY, Zhou ZY, Lu C a kol. (2004) A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science* **306**:1937-1940.
- Yasukochi Y (1998) A dense genetic map of the silkworm, *Bombyx mori*, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers. *Genetics* **150**:1513-1525.
- Yasukochi Y, Ashakumary LA, Baba K, Yoshido A, Sahara K (2006) A second-generation integrated map of the silkworm reveals synteny and conserved gene order between lepidopteran insects. *Genetics* **173**:1319-1328.
- Yasukochi Y, Tanaka-Okuyama M, Shibata F, Yoshido A, Marec F, Wu C, Zhang H-B, Goldsmith MR, Sahara K (v oponentním řízení) Extensive conserved synteny of genes between the karyotypes of *Manduca sexta* and *Bombyx mori* revealed by BAC-FISH mapping.
- Yoshido A, Bando H, Yasukochi Y, Sahara K (2005a) The *Bombyx mori* karyotype and the assignment of linkage groups. *Genetics* **170**:675-685.
- Yoshido A, Marec F, Sahara K (2005b) Resolution of sex chromosome constitution by genomic in situ hybridization and fluorescence in situ hybridization with (TTAGG)_n telomeric probe in some species of Lepidoptera. *Chromosoma* **114**:193-202.
- Zechner U, Wilda M, Kehrer-Sawatzki H, Vogel W, Fundele R, Hameister H (2001) A high density of X-linked genes for general cognitive ability: a run-away process shaping human evolution? *Trends Genet.* **17**:697-701.