

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Analýza a mapování repetice Ema25 u
tmavoskvrnáče vřesového *Hypomecis atomaria*
(Lepidoptera, Geometridae)**

Bakalářská práce

Marie Kubínová

Školitelka: RNDr. Martina Hejníčková

Školitelka – specialistka, konzultantka: RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D.

České Budějovice 2022

Bibliografické údaje

Kubínová, M., 2022: Analýza a mapování repetic Ema25 u tmavoskvrnáče vřesového *Hypomecis atomaria* (Lepidoptera, Geometridae) [Analysis and mapping of Ema25 repeat in *Hypomecis atomaria* (Lepidoptera, Geometridae), Bc. Thesis, in Czech] – 28 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace

The repetitive DNA represents a significant component of eukaryotic genomes and has an important role in evolution of Lepidoptera since it participates in degeneration of the W chromosome. This thesis focuses on repetitive DNA of *Hypomecis atomaria*. For detailed analysis, a potentially W-chromosome enriched sequence was chosen using RepeatExplorer, which annotated it as putative satellite DNA (low confidence). The repetitive sequence Ema25 was amplified by PCR, then cloned into a plasmid and then mapped by fluorescence *in situ* hybridisation. Finally, it was processed with BLAST database. The results show that repeat Ema25 is common among Lepidoptera, it is dispersed in all chromosomes regardless the sex of individuals and it is probably not arranged in tandem.

Financování práce

Tato práce byla financována z grantu 20-137843S Grantové agentury České republiky při Entomologickém ústavu BC AV ČR.

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

V Českých Budějovicích, 13. 4. 2022

.....
Marie Kubínová

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Martině Hejníčkové za vstřícnost, trpělivost, nadšení, rychlé odpovědi a spoustu času, který mi věnovala při vedení této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Magdě Zrzavé, Ph.D. za poskytnutí cenných rad, připomínek, podporu a ochotu mi vždy pomoci. Děkuji také za vřelé přijetí od celého kolektivu laboratoře. Mé díky patří také mojí rodině a přátelům.

Obsah

1. Úvod	1
1.1 Evoluce pohlavních chromozomů.....	1
1.2 Pohlavní chromozomy motýlů	1
1.3 Repetitivní DNA	2
1.4 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH)	4
1.5 Pohlavní chromozomy u píďalkovitých.....	5
2. Cíle práce	7
3. Materiál a metody	8
3.1 Sběr materiálu	8
3.2 Příprava preparátů.....	8
3.3 Izolace genomové DNA z tkání	8
3.4 Bioinformatická analýza	9
3.5 PCR (Polymerázová řetězcová reakce).....	9
3.6 Elektroforetická separace DNA fragmentů.....	10
3.7 Izolace DNA z agarozového gelu	10
3.8 Ligace a klonování	10
3.9 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace.....	12
4. Výsledky	13
4.1 PCR.....	13
4.2 Bioinformatická analýza	14
4.3 FISH – výroba sondy a mapování repetic Ema25.....	15
5. Diskuse	18
6. Závěr.....	21
7. Seznam použité literatury	22
8. Přílohy	28

1. Úvod

1.1 Evoluce pohlavních chromozomů

Pohlavní chromozomy vznikly u zvířat a rostlin několikrát nezávisle na sobě. Existují dva hlavní systémy: systém WZ/ZZ (samice/samec) a systém XY/XX (samec/samice). V systému WZ/ZZ je heterogametickým pohlavím samice. Tento typ se vyskytuje u motýlů, ptáků, některých druhů plazů, ryb a obojživelníků (Gianaroli et al., 2013). Druhým systémem je systém XY/XX, který je typický pro savce. V tomto případě je heterogametickým pohlavím samec. U některých druhů dochází ke ztrátě chromozomu Y nebo W. Vzniká tak systém XO/XX nebo ZO/ZZ. Ke ztrátě chromozomu W došlo například u vietnamské populace druhu martináče pajasanového *Samia cynthia ricini* (Yoshido et al., 2011).

Předpokládá se, že chromozomy Y a W byly původně autozomy, na kterých se objevil faktor určující pohlaví. Poblíž tohoto faktoru se začaly shromažďovat pohlavně antagonistické geny, které přináší výhodu danému pohlaví a můžou znevýhodňovat druhé pohlaví. Kvůli uchování kombinace výhodných genů oblast poblíž faktoru determinujícího pohlaví přestala rekombinovat s homologním chromozomem a postupně se rozšiřovala. Kvůli potlačení rekombinace dochází ke shromažďování repetitivních sekvencí, mutací, a vzniku pseudogenů na tomto chromozomu. Chromozom W nebo Y, který přestane rekombinovat, je tvořen především heterochromatinem a nenachází se na něm mnoho aktivních genů. Po určité době a v případě, že se nerekombinující oblast rozšíří po celém chromozomu, může dojít k jeho zániku (Rice, 1996; Wright et al., 2016).

1.2 Pohlavní chromozomy motýlů

Samičí heterogametní systém Z/ZZ se nachází u chrostíků (Trichoptera) a bazálních motýlů a je původním systémem (Traut et al., 2008). Z něj se vyvinul systém WZ/ZZ, který se u motýlů vyskytuje častěji. Předpokládá se, že chromozom W vznikl nezávisle u minovníčkovitých (Tischeriidae) a u pokročilých Ditrysiá s výjimkou čeledi vakonošovitých (Psychidae) a molovitých (Tineidae), které chromozom W postrádají. Chromozom W u Tischeriidae pravděpodobně vznikl fúzí chromozomu W s autozomem a u Ditrysiá vznikl osvojením B chromozomu (Dalíková et al., 2017; Hejníčková et al., 2019). Další skupinou, která je fylogeneticky starší než Tischeriidae a Ditrysiá a u které nezávisle vznikl chromozom

W, je čeleď hrotnokřídlcovití (Hepialidae), která patří mezi bazální motýly (Voleníková 2015).

Kromě nejčastějších systémů WZ/ZZ a Z/ZZ se u některých druhů objevují i komplikovanější varianty s multivalenty, k jejichž vzniku může dojít spojením chromozomu W nebo Z s jiným autozomem, nebo chromozomálním štěpením (Sahara et al., 2012). Jedná se například o systém W_1W_2Z/ZZ (např. u *Witlesia murana*) (Suomalainen, 1969) nebo $WZ_1Z_2/Z_1Z_1Z_2Z_2$ (např. u *Trabala vishnu*) (Rishi et al., 1999); u různých populací druhu martináče pajasanového *S. cynthia* se vyskytují tři odlišné systémy (Z/ZZ, WZ/ZZ a $WZ_1Z_2/Z_1Z_1Z_2Z_2$) (Yoshido et al., 2005).

O obsahu chromozomu W se toho ví relativně málo. Od chromozomu Z se výrazně liší tím, že u něj během samičí achiasmitické meiózy nedochází ke crossing overu, a tudíž se na něm hromadí repetitivní sekvence. Akumulace repetitivních sekvencí může způsobovat rychlejší vývoj chromozomu W a jeho částečnou či úplnou heterochromatizaci, zatímco chromozom Z je spíše podobný autosomům a má poměrně zachovanou syntenii genů (Beldade et al., 2009). Zároveň se na chromozomu W nachází velmi málo genů; jedním z nich je například *Fem* faktor, který byl objeven u bource morušového *Bombyx mori* a hraje důležitou roli v determinaci pohlaví (Kiuchi et al., 2014). U ostatních motýlů se systémem WZ/ZZ není jisté, zda je pohlaví určeno podobným determinujícím faktorem nebo počtem Z jako je tomu u systémů Z/ZZ (Sahara et al., 2012; Traut et al., 2008).

Díky převážné heterochromatinizaci chromozomu W často vzniká během interfáze v samičích somatických polyploidních jádrech heterochromatické tělísko nebo tělíška, která se také nazývají sex chromatin nebo W chromatin a jejich přítomnost se ověřuje z malpighických trubic (Traut & Marec, 1996). Poslední výzkum však ukazuje, že sex chromatin u samic je spíše orientačním znakem, a jeho velikost, tvar či počet tělísek může kolísat v závislosti na kompozici či počtu W chromozomů (Hejníčková et al., 2021).

1.3 Repetitivní DNA

Repetitivní DNA tvoří významnou část veškeré DNA nacházející se v jádře eukaryot. Mezi nejčastější skupiny, které se řadí mezi repetitivní DNA patří satelitní DNA sekvence a transpozibilní elementy (transpozony). Transpozony jsou nejčastěji rozmístěné po celém genomu. Satelity tvoří velkou část konstitutivního heterochromatinu, který je důležitý

při zakládání a uchování centromerických, subtelomerických a telomerických oblastí. Satelity se dají rozpoznat díky štěpení restrikcími enzymy a následné elektroforéze, kdy se úseky rozdělí podle délek naštěpených sekvencí, jejichž velikosti jsou vzájemně násobitelné (Biscotti et al., 2015).

Satelity se skládají z řady za sebou opakujících se sekvencí DNA (monomerů), které mohou dosahovat velikostí v rozsahu několika desítek až stovek bazí (Palomeque & Lorite, 2008). Satelity byly řazeny mezi nekódující „junk“ DNA, ale ukazuje se, že některé mají důležitou roli v regulaci chromatinu nebo genů. Mohou být velmi variabilní jak v délce, tak v jejich složení. Zároveň se stejné rodiny satelitů mohou objevovat u příbuzných druhů nebo mohou být satelity specifické pro určitý druh (Garrido-Ramos, 2017).

Do současné doby jich bylo u motýlů analyzováno relativně málo. Mezi prozkoumané satelity patří satelitní sekvence AmTFR, která je rovnoměrně distribuována na všech chromozomech motýla *Antheraea mylitta* (Mahendran et al., 2006). Dalším objeveným satelitem je satelit CpSAT-1, který se nachází u obaleče jablečného *Cydia pomonella* v různém množství na všech chromozomech. Na chromozomu W se vyskytuje ojedinele a zároveň je poměrně hojný na chromozomu Z (Věchtová et al., 2016). Satelit MBSAT1 můry zelné *Mamestra brassicae* se nachází jak na chromozomu W, tak na chromozomu Z (Mandrioli et al., 2003). Satelitní sekvence FR u blýskavky kukuřičné *Spodoptera frugiperda* se hojněji vyskytuje na chromozomu W než na chromozomu Z (Lu et al., 1994). Satelitem, který je obohacený na chromozomu W, je sekvence PiSAT1, která se může objevit i na autozomu nebo na chromozomu Z zavíječe paprikového *Plodia interpunctella* (Dalíková et al., 2017).

Studie chromozomu W u obaleče jablečného *C. pomonella* (Fuková et al., 2007), bource morušového *B. mori* (Abe et al., 2005) i zavíječe moučného *Ephestia kuehniella* (Traut et al., 2013) potvrdila, že nejčastější složku chromozomu W těchto druhů tvoří retrotranspozibilní elementy.

Některé z nich byly popsány například ve studii Fuková et al. (2007), kde se analyzovalo 17 opakujících se sekvencí (sequence motifs) u obaleče jablečného *C. pomonella*, ze kterých 2 sekvence CpW2 a CpW5 jsou specifické pro samice. Ostatní byly nalezeny převážně na chromozomu W a/nebo na chromozomu Z nebo na autozomech. U tří z nich byla nalezena podobnost s popsány retrotranspozibilními sekvencemi v genové bance u octomilky obecné *Drosophila melanogaster* a bource morušového *B. mori*. U ostatních

nebyla nalezena shoda s žádnou popsanou sekvencí (Fuková et al., 2007). U bource morušového *B. mori* bylo zatím vyizolováno 12 náhodně amplifikovaných polymorfních DNA (RAPD) markerů, které jsou specifické pro chromozom W. Pomocí počítačové databáze BLAST (Altschul et al., 1990) byla zjištěna podobnost sekvencí s již dříve popsanými sekvencemi retrotranspozibilních elementů jiných druhů. Tyto specifické RAPD sekvence jsou tvořeny strukturami, které se skládají z více do sebe inzertovaných elementů. Díky shotgun osekvenování 14 klonů W-specifických bakteriálních umělých chromozomů (W-BAC) bylo na chromozomu W objeveno mnoho různých transpozibilních elementů. Zároveň bylo pozorováno, že se transpozibilní elementy hromadí na chromozomu W a tvoří vrstvy (strata) (Abe et al., 2002, 2005).

Poměrně nedávno byl vytvořen efektivní bioinformatický online nástroj RepeatExplorer (Novák et al., 2013), který dokáže identifikovat repetitivní sekvence na základě vytváření grafů sestavených díky podobnosti mezi jednotlivými krátkými sekvencemi genomu. Pomocí programu bylo například nalezeno 34 rodin satelitů u zákeřnice *Rhodnius prolixus* (Montiel et al., 2021) a 29 rodin satelitů u sluněčka pestrého *Hippodamia variegata* (Mora et al., 2020). Cabral-de-Mello et al. (2021) využil jako první u motýlů RepeatExplorer k identifikaci sedmi satelitů nacházejících se u čeledi travaříkovití Crambidae. Tři satelity u zavíječe zimostřázového *Cydalima perspectalis* a zavíječe kukuřičného *Ostrinia nubilalis* byly obohaceny na chromozomu W. Satelity motýla *Diatraea postlineella* byly nalezeny pouze na autozomech.

1.4 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

FISH se využívá k detekci a lokalizaci specifických sekvencí DNA na chromozomech včetně repetitivních sekvencí na pohlavních chromozomech, k identifikaci chromozomů nebo k detekci chromozomálních abnormalit (Trask, 1991).

Metoda je založena na hybridizaci značené DNA sondy s komplementární sekvencí nacházející se v tkáních na chromozomech, které jsou zafixovány na sklíčku. Sondy mohou být značeny přímo začleněním nukleotidů s navázaným fluorochromem do vlákna, nebo nepřímo, kdy se do sondy začlení nukleotidy s navázaným haptenem (látka s antigenními vlastnostmi, např. biotin), na který se následně vážou značené protilátky. Výhodou přímého značení je, že lze signál pozorovat přímo po hybridizaci, ale nelze ho zesílit – na rozdíl od nepřímého značení, jehož výhodou je amplifikace signálu. Před hybridizací musí být

sklíčka i sonda zdenaturována. Po hybridizaci jsou ze sklíček řadou promývacích kroků odstraněny nežádoucí nespecificky navázané sekvence a chromozomy jsou obarveny barvivem DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol), které se váže na AT oblasti. Výsledky jsou vyhodnoceny pod fluorescenčním mikroskopem vybaveným příslušnými filtry (Volpi & Bridger, 2008). Díky FISH bylo například zjištěno, že z univerzálních cytogenetických markerů je ke zkoumání evoluce karyotypu motýlů vhodný histon H3 (Provazníková 2021). Existuje i spousta různých variant FISH. Mezi nejznámější patří komparativní genomová hybridizace (CGH) a genomová *in situ* hybridizace (GISH) (Sahara et al., 2012). Jednotlivé techniky se vzájemně můžou kombinovat. Spojení FISH s telomerickou sondou a s GISH objasnilo složení pohlavních chromozomů samic u různých motýlů, například u štetconoše trnkového *Orgyia antiqua*, *Orgyia thyellina* nebo martináče pajasanového *S. cynthia* (Yoshido et al., 2005). Díky kombinaci těchto metod společně s CGH byly objeveny multivalenty pohlavních chromozomů u tří druhů motýlů čeledi běláskovitých *Leptidea* – běláška lučního *Leptidea juvernica*, běláška hrachorového *Leptidea sinapis* a běláška Realova *Leptidea reali*, které byly tvořeny 3-4 chromozomy W a 3-4 chromozomy Z (Šíchová et al., 2015). FISH může být také použita společně s tyramidovou amplifikací signálu (TSA-FISH), jako třeba v případě, kdy byly mapovány single-copy geny na chromozomu Z u obaleče jablečného *C. pomonella*. TSA-FISH může také současně detekovat dva markery zároveň (Carabajal Paladino et al., 2014).

1.5 Pohlavní chromozomy u píďalkovitých

Píďalkovití (Geometridae) je druhá druhově nejpočetnější skupina motýlů. Do současné doby bylo popsáno 24 000 druhů zahrnujících osm podrodin (Sihvonen et al., 2011). Geometridae patří mezi Ditrysia, pro které je charakteristické, že se v polyploidních jádrech samic během interfáze formuje sex chromatin. U poměrně velkého počtu druhů Geometridae se však vyskytuje neobvyklý sex chromatin: může být rozptýlený, může se lišit počtem, velikostí nebo tvarem. Zároveň se liší i počty chromozomů u jednotlivých druhů (Traut & Marec, 1996), a často se zde vyskytují i odlišné systémy pohlavních chromozomů, například systém $W_1W_2W_3Z/ZZ$ u píďalky obecné *Epirrhoe alternata* a píďalky podzimní *Operophtera brumata* nebo systém $W Z_1Z_2/ZZ$ u kropenatce jetelového *Chiasmia clathrata* (Hejníčková et al., 2021).

U námi zkoumaného druhu tmavoskrvnáče vřesovového (*Hypomecis atomaria*, dříve známý jako *Ematurga atomaria*, Ennominae; Murillo-Ramos et al., 2021) mají obě pohlaví stejný diploidní počet chromozomů a to $2n = 62$. Samice *H. atomaria* mají normální, kulatý, viditelný sex chromatin, který se vyskytuje pouze u samic. Chromozom W u *H. atomaria* je malý a plně heterochromatizovaný a často je celý obklopen chromozomem Z. Zároveň díky rovnoměrné hybridizaci samčí a samičí genomické sondy na chromozom W se předpokládá, že je složen převážně z běžné repetitivní DNA, která se vyskytuje u obou pohlaví stejně často (Hejníčková et al. 2021). Cílem této práce bylo pokusit se charakterizovat repeticce nacházející se na chromozomu W tmavoskrvnáče vřesového a případně ověřit, je-li jejich výskyt na chromozomu W častější v porovnání s autosomy.

2. Cíle práce

1. Na základě výsledků nástroje RepeatExplorer vytipovat potenciálně zajímavé (na chromozomu W obohacené) repetitivní sekvence
2. Amplifikovat vytipované sekvence PCR a vybraný fragment zaklonovat
3. Ověřit totožnost zaklonovaného fragmentu pomocí bioinformatických nástrojů
4. Danou repetici lokalizovat na chromozomech pomocí FISH

3. Materiál a metody

3.1 Sběr materiálu

V této práci se využívaly dospělé samice tmavoskvrnáče vřesového *H. atomaria*, (Murillo-Ramos et al., 2021), které se řadí mezi píďalkovité (Geometridae). Hmyz byl odchycen do sítě na loukách v okolí Českých Budějovic během května až července v letech 2020-2021. Samice snesly vajíčka odděleně ve vlhkých plastových krabičkách, které obsahovaly živné rostliny. Larvy byly ponechány na živných rostlinách do doby, než dosáhly posledního instaru nebo kukly. Poté byly vypitvány, z pohlavních orgánů byly připraveny chromozomální preparáty a jejich zbývající tkáň byla zmražena v tekutém dusíku a uschována v -20 °C do dalšího použití.

3.2 Příprava preparátů

Samčí a samičí gonády byly z larev vypreparovány ve fyziologickém roztoku (0,9% NaCl, 0,042% KCl, 0,025% CaCl₂, 0,02% NaOH₃, Lockwood 1961). Pouze samčí pohlavní orgány byly před fixací vloženy na 10 minut do hypotonického roztoku (0,075M KCl). Poté byl materiál z ovárií a testes 15 minut fixován ve fixačním roztoku Carnoy (etanol, chloroform a kyselina octová v poměru 6:3:1). Materiál byl pomocí wolframových jehel přemístěn na etanolem vyčištěné sklíčko do kapky 60% kyseliny octové, kde byl rozmělněn. Sklíčko bylo přesunuto na plotýnku předehřátou na 45 °C, kde byla kapka posouváním po sklíčku rozetřena. Sklíčka s chromozomy byla odvodněna v etanolové řadě (70%, 80% a 100% etanol, v každém 30 sekund) a po uschnutí skladována při -20 °C.

3.3 Izolace genomové DNA z tkání

Genomová DNA byla izolována z tkání pomocí CTAB (cetyltrimethylammonium bromid, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Německo). Extrakční pufr o objemu 10 ml byl připraven z 5,33 ml vody, 1 ml 1M TrisHCl (pH 8), 2,8 ml 5M NaCl, 0,8 ml 0,5M EDTA (pH 5), 0,2 g CTAB, 20 µl β-mercaptoethanol (Fluka Chemie GmbH, Buchs, Švýcarsko), 50 µl proteinázy K (0,1 mg/ml) (Macherey-Nagel GmbH & Co KG, Düren, Německo). V 800 µl extrakčním pufru byla pomocí tloučku zhomogenizována tkáň z larvy, která se

nechala inkubovat za mírného třepání přes noc v 60 °C. Následující den bylo přidáno stejné množství chloroformu, které se s roztokem promíchalo převrácením zkumavky a poté bylo centrifugováno 10 minut při 14 000 rpm v 4 °C. Pomocí pipety byla přesunuta vodná fáze do nové zkumavky. Extrakční krok s chloroformem byl zopakován. Poté bylo do zkumavky přidáno 3 µl RNázy A (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a směs se nechala inkubovat v 37 °C po dobu 30 minut. Bylo přidáno 2/3 objemu isopropanolu. Obsah byl promíchán převrácením zkumavky za vzniku vláken vysrážené DNA a byl inkubován 30 minut v pokojové teplotě. Následně byl 10 minut centrifugován při 14 000 rpm ve 4 °C. Přebývající supernatant byl odsán. K peletu bylo napipetováno 500 µl 70% etanolu. Opět byl supernatant pečlivě odsán a pelet v otevřené zkumavce se nechal oschnout. Poté byl pelet rozmíchán ve vodě a byl uložen v -20 °C. Koncentrace DNA byla změřena pomocí fluorometru Qubit 3.0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) a čistota byla zjištěna pomocí spektrofotometru Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

3.4 Bioinformatická analýza

Z celkem 600 000 readů ze 3 samic a ze 3 samců, které byly získány náhodným vzorkováním sekvenačních dat, které připravila firma Novogene (Hong Kong, Čína) na platformě Illumina HiSeq 4000, byly pomocí komparativní analýzy RepeatExplorer2 (Novák et al., 2013) vytipovány sekvence repetice potenciálně obohacené na chromozomu W. Tato část byla provedena školitelkou. Primery k repetici Ema25 byly navrženy pomocí programu Geneious prime version 2022.0.1. a jsou uvedeny v Tabulce 1. Konsenzuální sekvence dané repetice má 761 bazí a je uvedena v Příloze 1.

Tabulka 1: Primery.

Název primeru	Sekvence
Ema25 – F	CGGTGGTTATGTGGGAGTCT
Ema25 – R	GTGGGTTCCCGCCTTGTC

3.5 PCR (Polymerázová řetězcová reakce)

Reakční směs pro PCR o objemu 25 µl byla připravena smícháním 15,3 µl vody, 2,5 µl 10 x ExTaq pufru (TaKaRa, Otsu, Japan), 2,5 µl od každého z primerů F a R (10 µM)

(TaKaRa, Otsu, Japonsko) 2 μ l dNTPs (každý nukleotid 2.5 mM), 0,2 μ l ExTaq polymerázy (TaKaRa) a 1 μ l gDNA templátu o koncentraci 10 ng/ μ l. Počáteční teplota PCR byla nastavena na 94 °C na 3 minuty. Poté následovalo 30 cyklů skládajících se z denaturace při 94 °C na 30 sekund, annealingu při 57 °C na 30 sekund a extenze při 72 °C na 1 minutu. Poslední fáze zahrnovala třiminutovou finální extenzi při 72 °C. Po ukončení programu se teplota zchladila na 4 °C.

3.6 Elektroforetická separace DNA fragmentů

Pro vizualizaci výsledků byla použita elektroforetická separace DNA fragmentů. Byl připraven 1,5% agarozový gel v TAE pufu. Elektroforéza probíhala při 100 V 30 minut. Gel byl následně barven v ethidium bromidu po dobu 20 minut. Vzorky byly prohlédnuty pod UV světlem a zdokumentovány.

3.7 Izolace DNA z agarozového gelu

Vybrané fragmenty byly vyříznuty z gelu a následně byla DNA vyizolována z gelu pomocí kitu Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison WI, USA) podle uvedeného návodu a její koncentrace byla změřena pomocí fluorometru Qubit 3.0 (Invitrogen).

3.8 Ligace a klonování

Při ligační reakci byl využit kit pGEM-T easy vector (Promega). Do 10 μ l ligační směsi bylo přidáno 5 μ l 2x ligačního pufu, 1 μ l plasmidu (50 ng), 1 μ l T4 ligázy a 3 μ l DNA (50 ng). Směs byla inkubována 18 hodin v ledničce (4 °C).

LB médium o objemu 1 litr se skládalo z 20 g LB broth (Thermo Fisher Scientific) a 10 g agaru (Thermo Fisher Scientific). Bylo sterilizováno autoklávováním. Po vychladnutí na 50 °C do něj byly přidány 2 ml ampicilinu o koncentraci 50 mg/ml. Petriho misky byly nejprve vysvíceny pod UV (20 minut) a poté bylo do nich nalito 20 ml LB média. Následně byly plotny opět vysvíceny pod UV (30 minut), zaparafilmovány a uloženy do lednice (4 °C). Aby mohlo dojít k modro-bílé selekci, bylo hokejkou, která byla namočená

do etanolu a opálena nad kahanem, rozetřeno na každé plotně 14 μ l X-Galu (50 mg/ml) (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid) a 70 μ l 100mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactosid). Následovala transformace DNA do kompetentních buněk (*E. coli*, kmen DH5 α) následujícím způsobem. Buňky byly přesunuty z -80 °C na led, kde se nechaly 15 minut. 50 μ l buněk bylo rozpipetováno do 1,5 ml zkumavek a do každé bylo přidáno 2,5 μ l ligační směsi a mix se nechal inkubovat na ledě po dobu 30 minut. Poté se zkumavky nechaly inkubovat 90 sekund na termobloku předeřátém na 42 °C. Pak byly přesunuty na led. Po dvouminutové inkubaci bylo do zkumavek přidáno 800 μ l LB média a následovala inkubace při 37 °C na 50 minut. Pak byly buňky zkoncentrovány centrifugací při 7500 g 30 s. Většina supernatantu byla odstraněna, ve zbývajících cca 100 μ l byl pelet s buňkami resuspendován. Na každou plotnu byla přidána polovina směsi s bakteriemi, která byla rozetřena pomocí hokejky, namočené do etanolu a poté opálené nad kahanem. Plotny se nechaly inkubovat přes noc v termoboxu (37 °C).

Následující den byly bílé pozitivní kolonie přeočkovány pomocí 10 μ l špičky na plotnu s ampicilinem. Zároveň byl proveden i test jednotlivých klonů pomocí PCR pro ověření správné velikosti zaklonovaných inzertů. Byla namíchána PCR reakce o celkovém objemu 10 μ l, která obsahovala 6,1 μ l vody, 2 μ l (10x) OneTaq pufru (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 0,8 μ l dNTPs, 0,5 μ l od každého primeru M13 (10 μ M), 0,1 μ l OneTaq polymerázy (New England Biolabs) a templát byl přidán pomocí dotyku špičky do kolonie bakterií. Současně byly vybrané kolonie přeočkovány na novou plotnu. Výsledky byly ověřeny pomocí elektroforézy.

Plazmidy byly vyizolovány pomocí kitu NucleoSpinPlasmid (Macherey-Nagel) podle návodu výrobce. Koncentrace plazmidů byla změřená pomocí spektrofotometru Nanodrop2000 (Thermo Fisher Scientific).

Plazmidy byly přečištěny pomocí kitu ExoSap-ITTM (Thermo Fisher Scientific) smícháním 5 μ l DNA a 2 μ l ExoSap. Směs byla spuštěna v PCR termocykleru na program, který byl nastaven 15 minut na 37 °C a dalších 15 minut na 80 °C. Poté se do 7 μ l směsi přidaly 3 μ l primeru M13. Vzorky byly připraveny podle požadavků firmy SEQme (Dobříš, Česká republika), kam byly odeslány na osekvenování Sangerovou metodou.

3.9 Fluorescenční *in situ* hybridizace

Sonda byla značena nepřímo biotinem pomocí PCR. Směs o objemu 25 μ l byla připravena smícháním 14,8 μ l vody, 2,5 μ l ExTaq pufru (TaKaRa), 4 μ l high dNTPs (0,25 mM dATP, 0,25 dCTP mM, 0,025 mM dGTP, 0,09 mM dTTP, 0,16 mM biotin-16-dUTP; Jena Bioscience, Jena, Německo), 10 ng plazmidové DNA, 1,25 μ l od každého z primerů (10 μ M) a 0,125 μ l ExTaq polymerázy (TaKaRa). PCR probíhala za podmínek popsanych výše.

Při nepřímé FISH se postupovalo podle návodu Cabral-de-Mello & Marec (2021), ve kterém byly některé kroky upraveny.

Pro každé sklíčko byla smíchána sonda značená biotinem (50 ng/sklíčko) s 2,5 μ l DNA ze spermií lososa o koncentraci 10 mg/ml (Thermo Fisher Scientific). Byla přidána 1/10 objemu 3M octanu sodného a 2,5 objemu 100% etanolu. Směs byla 15 minut centrifugována při 13 000 rpm v 4 °C. Byl odsán supernatant a do zkumavky bylo přidáno 400 μ l vychlazeného 70% etanolu. Znovu byla směs zcentrifugována při stejných otáčkách ve 4 °C na 10 minut. Opět byl pečlivě odsán supernatant. Pelet usazený na dně byl rozpouštěn v 37 °C po dobu 30 minut v 5 μ l přehřátého deionizovaného formamidu. Dále bylo přidáno 5 μ l 20% dextran sulfátu v 4x SSC přehřátého na 37 °C. Sonda byla zdenaturována v 90 °C po dobu 5 minut a ihned byla ochlazená na ledu alespoň na 3 minuty.

Současně byla připravována sklíčka s preparáty z testes a ovarii. Sklíčka byla vyndána z lednice z -20 °C a ihned vložena do 70% etanolu, kde byla nechána 2 minuty. Poté byla přesunuta na 30 vteřin postupně do 80% etanolu a do 100% etanolu. Sklíčka byla 30 minut zapékána v 65 °C. Dále byla sklíčka inkubována po dobu 5 minut v 37 °C v 1x PBS, které obsahovalo 4 ml 10x PBS, 36 ml vody a 2 μ l proteinázy K o koncentraci 20 mg/ml. Pak byla dvakrát na 5 minut promyta v 1x PBS v 37 °C. K odstranění RNA bylo na každé sklíčko napipetováno 100 μ l RNázy A (Sigma-Aldrich), která se skládala z 2 μ l RNázy o koncentraci 10 mg/ml, 10 μ l 20x SSC a 88 μ l vody. Sklíčka se nechala inkubovat hodinu v 37 °C. Následně byla dvakrát na 5 minut promyta v 2x SSC v pokojové teplotě. Sklíčka překrytá krycím sklíčkem o velikosti 24x50 mm byla denaturována v 100 μ l 70% formamidu v 2x SSC po dobu 3,5 minut v 68 °C. Po denuraci byla krycí sklíčka odstraněna a sklíčka byla vložena do studeného 70% etanolu (-20 °C) na 1 minutu. Poté byla sklíčka dehydratována v 80% etanolu a 100% etanolu v každém 30 sekund a osušena na vzduchu.

Na každé sklíčko bylo napipetováno 10 μl hybridizační směsi a vše bylo překryto krycím sklíčkem o velikosti 24x32 mm a utěsněno lepidlem. Sklíčka byla přes noc inkubována v 37 °C ve vlhké komůrce (plastová krabička s ubrouskem vlhčeným v 2x SSC na dně).

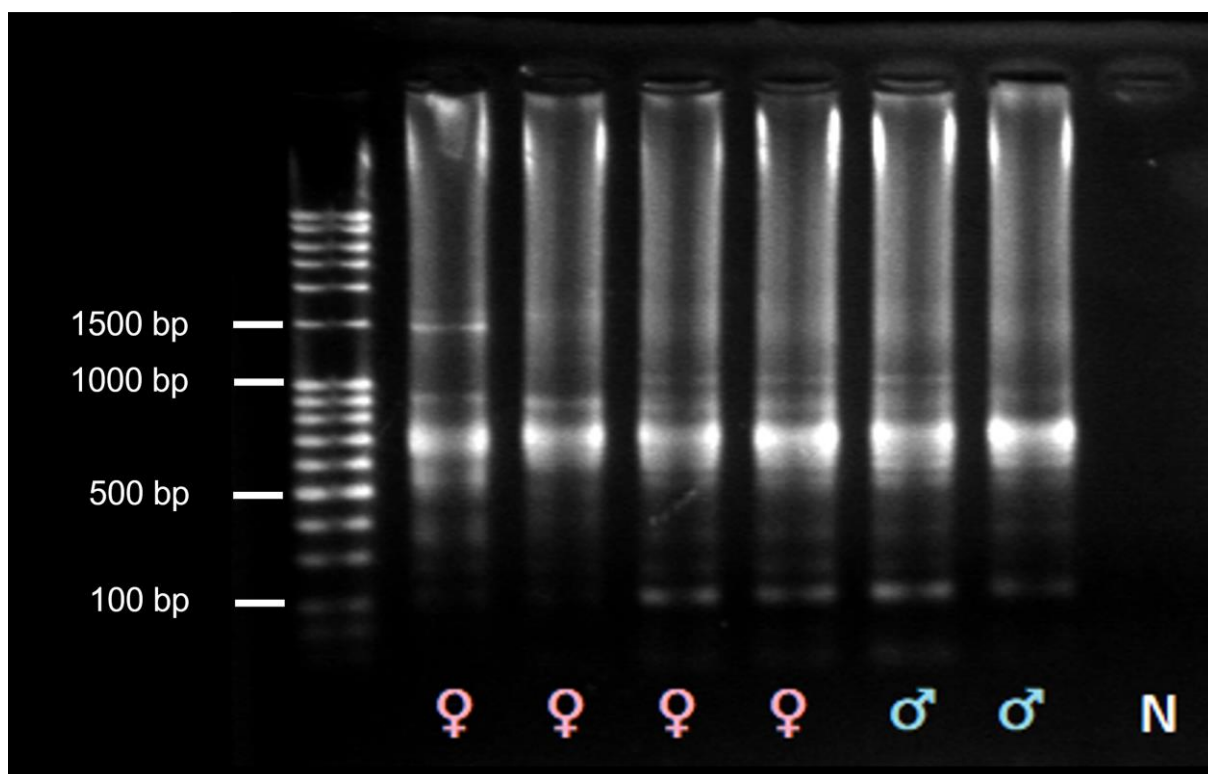
Následující den byla po odstranění krycího skla provedena řada promývání. Byly připraveny roztoky: 2x SSC, 0,1x SSC a WBB (washing blocking buffer), který byl připraven z 48 ml 20x SSC, 190 ml miliQ H₂O, 240 μl Tweenu a 2,4 g sušeného odtučněného mléka (Lab M, Heywood, UK). Nejprve byla sklíčka promývána dvakrát v 2x SSC v 42 °C po dobu 5 minut, poté dvakrát v 0,1x SSC v 42 °C po dobu 5 minut, jednou v 2x SSC v 42 °C na 5 minut a jednou v 2x SSC po dobu 10 minut v pokojové teplotě. Všechny promývací kroky probíhaly v kyvetách za mírného třepání. Poté se sklíčka nechala 15 minut inkubovat ve WBB v pokojové teplotě. Byl připraven roztok ze Streptavidinu-Cy3 (Jackson ImmunoRes. Labs. Inc, USA) ve WBB o finální koncentraci 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Na sklíčka bylo nanášeno 100 μl této směsi a poté byla překryta krycím sklíčkem a inkubována ve vlhké komůrce v 37 °C 1 hodinu. Následně byla sklíčka dvakrát promyta ve WBB na 5 minut v 45 °C v kyvetě za mírného třepání. Sklíčka byla obarvena 25 μl směsi DAPI (Sigma-Aldrich) a DABCO (1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan) (Sigma-Aldrich) o koncentraci 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a byla překryta krycím sklíčkem. Byly odstraněny bubliny a přebytek roztoku byl odsán filtračním papírem. Okraje sklíček byly zalakovány lakem. Sklíčka byla uskladněna ve tmě v 4 °C.

Vzorky byly pozorovány pod fluorescenčním mikroskopem Zeiss Axioplan 2. Snímky byly pořízeny pomocí fotoaparátu Olympus CCD XM10 a zpracovány v programu Adobe Photoshop version 13.0.1.

4. Výsledky

4.1 PCR

Délka fragmentu repetice Ema25, který byl vyříznut z gelu, zaklonován do plazmidu a využit k tvorbě sondy, byla přibližně 700 bp. Z výsledků PCR na genomové DNA byla u odlišných jedinců *H. atomaria* pozorována vnitrodruhová variabilita. U samice 1 se objevil kromě hlavního fragmentu i produkt o délce 1500 bp, který nebyl nalezen u žádného z dalších testovaných jedinců; u samic 3 a 4 a samce 5 se vyskytoval navíc produkt o velikosti 1000 bp a malý produkt o cca 100 bp byl pozorován u samic 3 a 4 a samců 5 a 6 a zároveň u ostatních chyběl (obr. 1).



Obr. 1: PCR na genomové DNA vykazující vnitrodruhovou variabilitu repetice Ema25 u *H. atomaria*. Legenda: zleva – marker, samice 1-4, samec 5 a 6, N=negativní kontrola.

4.2 Bioinformatická analýza

Podle výsledků programu RepeatExplorer zabírá repetice Ema25 0,3 % genomu. Identita konsenzu a osekvenované zaklonované sekvence o délce 664 bazí (Příloha 2) je 87,9 % a je zaznamenaná na obrázku 2. Při porovnání konsenzu a osekvenované repetice

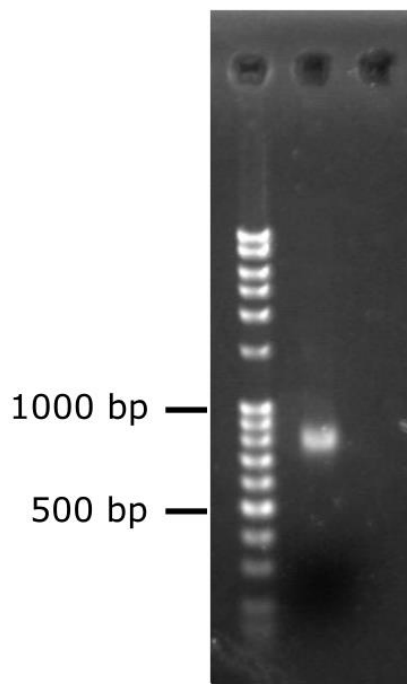
Ema25 bylo pozorováno 34 SNPs (jednonukleotidových polymorfismů-single nucleotide polymorphisms), které byly relativně rovnoměrně rozmístěny. Zároveň jsme pozorovaly tři významnější insertované/deletované úseky (indely): mezi 98. a 100. a mezi 527. – 529. bází se objevila delece v sekvenci konsenzu, a dále byly deletovány úseky na zaklonované sekvenci mezi 181. a 193. a mezi 564. a 571. bází. Analýza vybrané sekvence pomocí databáze BLAST (Altschul et al., 1990) zjistila 80% podobnost sekvence se sekvencemi na různých chromozomech včetně chromozomu Z u travařky hlinožluté *Luperina testacea*, která patří mezi Noctuidae (můrovití). Sekvence se také podobala druhům, kteří se řadí do stejné čeledi jako *H. atomaria* a to Geometridae. Sekvence z *H. atomaria* měla 76% shodu u různých chromozomů včetně Z s druhem drsnokřídlec březový *Biston betularia* (Ennominae), přičemž jedna z uvedených sekvencí (přístupové číslo v databázi GenBank KT182637.1) byla publikována v článku o mutacích melanismu u *B. betularia* (van't Hof et al., 2016). Dále program našel 70% podobnost sekvence na různých chromozomech včetně chromozomu Z s různorožcem trnkovým *Peribatodes rhomboidaria* a 70% podobnost na chromozomech tmavoskvrnáče zlatavého *Agriopsis aurantiaria*. Kromě výše zmíněné sekvence z *B. betularia* pocházela všechna ostatní data z genomického projektu Tree of Life (Simonson et al., 2005).



Obr. 2: Alignment konsenzu z RepeatExplorer a zaklonované sekvence repeticce Ema25. Legenda shora: číslované pozice nukleotidů (barevně), identita mezi oběma sekvencemi (zeleně), zaklonovaná sekvence Ema25, konsenzus z RepeatExplorer.

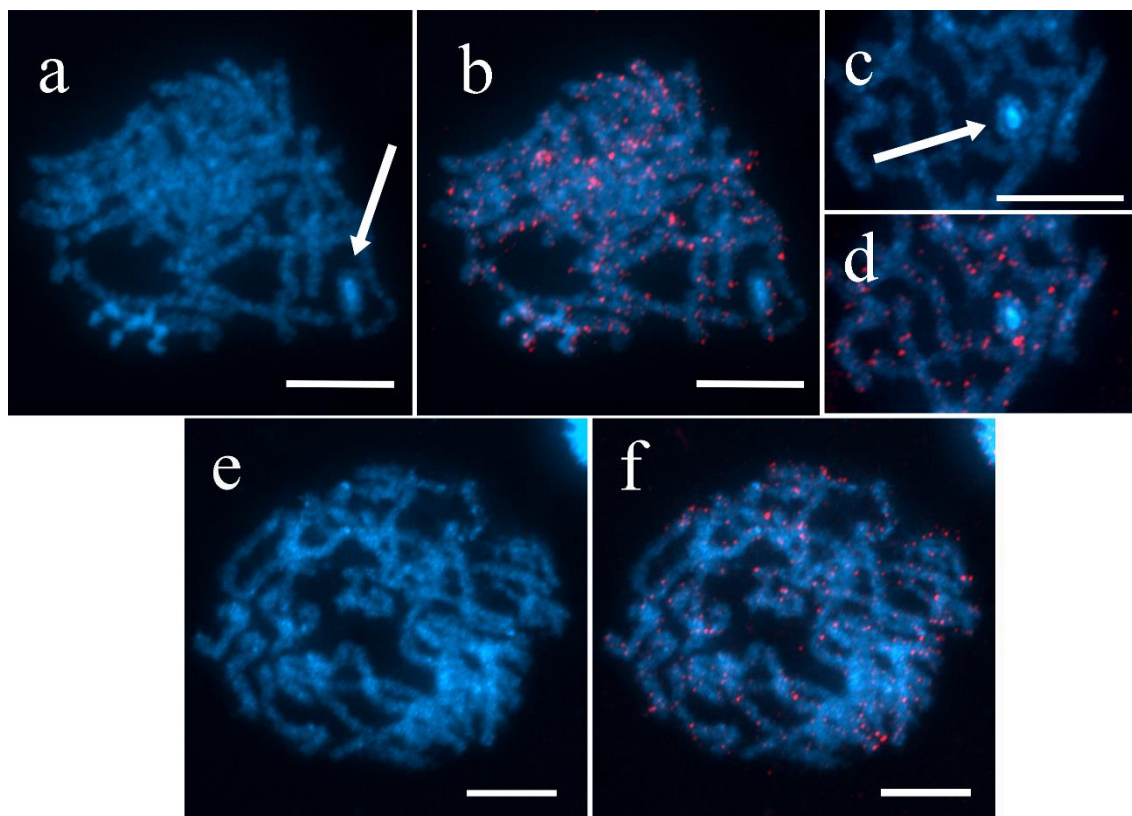
4.3 FISH – výroba sondy a mapování repeticce Ema25

K výrobě sondy pro FISH nepřímo značené biotinem byl použit zaklonovaný fragment. Sonda byla zkontrolována pomocí elektroforézy (obr. 3).



Obr. 3: Sonda značená biotinem na 1.5% agarózovém gelu (zleva: marker, sonda).

Pomocí metody FISH byla sekvence lokalizována na chromozomech u obou pohlaví. Roztroušené, mnohočetné signály se vyskytovaly na autozomech i pohlavních chromozomech se stejnou četností (obr. 4).



Obr. 4: Fluorescenční *in situ* hybridizace sondy Ema25 na pachytenním jádře tmavoskvrnáče vřesového *H. atomaria*. Chromozomy podbarvené DAPI; samičí pachytenní jádra (a-d), detail bivalentu WZ (c, d), samčí pachytenní jádra (e, f), sonda značená červeně (b, d, f). Šipkou označen bivalent WZ (a, c). Měřítko = 10 μm .

5. Diskuse

Cílem práce bylo ověřit, zda je repetice vytipovaná pomocí programu RepeatExplorer (Novák et al., 2013) obohacená na chromozomu W. Nejprve byly k vybrané sekvenci navrhnuty primery pomocí programu Geneious prime version 2022.0.1., které byly využity při amplifikaci sekvence pomocí PCR. Následně byl požadovaný fragment vyříznut z gelu a zaklonován do plazmidu. Ten byl použit pro výrobu značené sondy a sekvence byla namapována díky nepřímé FISH. Zkoumaná repetice byla porovnána s jinými sekvencemi pomocí programu BLAST (Altschul et al., 1990). Díky metodě FISH bylo zjištěno, že repetice Ema25 není obohacena na chromozomu W, ale je rovnoměrně roztroušená na všech chromozomech nezávisle na pohlaví.

Výsledky PCR na genomové DNA u šesti různých jedinců *H. atomaria* odhalily vnitrodruhovou variabilitu repetice Ema25. Vnitrodruhová variabilita je u repetice běžným jevem a může se projevovat v různých počtech opakování monomerů, které mohou mutovat rychleji než zbylá DNA. (Ramel, 1998). Vnitrodruhová variabilita se používá například k rozlišení jedinců na základě porovnávání odlišností v počtu opakování monomerů v metodě DNA fingerprinting, která se využívá například ve forenzní analýze nebo k určování příbuzenských vztahů. Tyto polymorfismy lze detekovat pomocí porovnávání RFLP (polymorfismus délky restrikčních fragmentů), VNTR (variabilní počet tandemových repetice, minisatelity) nebo STR (krátké tandemové repetice, mikrosatelity) (Parson, 2018).

Stejně běžná je potom variabilita/divergence přímo v sekvencích dané repetice způsobená četnými mutacemi v průběhu její evoluce. V případě Ema25 činila identita konsenzu z RepeatExplorer a námi zaklonované sekvence 87,9 %. Příčinou této míry divergence byly v našem případě četné SNP a několik insercí/deleci. Při srovnání sekvence repetice a konsenzu bylo celkem nalezeno 34 SNPs a došlo ke čtyřem větším insercím/delecím (na základě dostupných dat nelze mezi nimi rozlišovat), kdy největší deletovaná oblast měla velikost 13 bazí. Ve studii sedmi satelitních sekvencí u třech druhů motýlů čeledi travaříkovití Crambidae (zavíječ zimostřezový *C. perspectalis*, *D. postlineella* a zavíječ kukuřičný *O. nubilalis*; Cabral-de-Mello et al., 2021) byla identita jednotlivých satelitních rodin v rozsahu přibližně 88,66 - 98,68 %. Zkoumané satelitní rodiny zabíraly pouze 0,019 až 0,154 % genomu, přičemž proporce repetice Ema25 činila až 0.3 % genomu, což může vysvětlovat její vyšší divergenci.

Zajímavé je, že analýza repetice Ema25 pomocí programu BLAST (Altschul et al., 1990) vyhodnotila jako nejpodobnější sekvenci pocházející z travařky hlínožluté *Luperina testacea*, která patří do čeledi můrovitých Noctuidae. Nicméně, skupiny Geometridae a Noctuidae jsou blízce příbuzné, a tudíž přítomnost podobných typů repetitivních sekvencí v těchto skupinách není moc překvapivá (Mitter et al., 2017). Zkoumaná sekvence vykazovala podobnost i s mnoha dalšími sekvencemi jiných druhů motýlů, převážně se však jednalo o Geometridae. Téměř všechny sekvence kromě jedné pochází z projektu Tree of Life, který se snaží zdokumentovat všechny druhy organismů na Zemi, poskytnout základní informace o fylogenezi života a získané informace sdílet s dalšími databázemi a analytickými nástroji (Maddison et al., 2007). Jediná sekvence, která byla identifikována i mimo projekt Tree of Life, pocházela z drsnokřídlece březového *B. betularia* a byla nalezena uvnitř delšího úseku DNA, publikovaného v rámci objasňování příčin industriálního melanismu (van't Hof et al., 2016).

Anotace repetice Ema25 bohužel na základě získaných dat není možná. Automatická klasifikace programu RepeatExplorer jí sice zařadila mezi pravděpodobné satelity, ovšem s nízkou mírou jistoty. Zároveň ani výsledky PCR nenaznačují tandemové uspořádání monomerů typické pro satelity. Výsledky FISH ukazují, že se hybridizační signály neshlukují ve větších clusterech, jak tomu bývá u většiny satelitů. Nicméně, výjimečně se satelity mohou vyskytovat v genomu i jednotlivě díky vnitřetězcové homologní rekombinaci. Tyto disperzní sekvence mohou být roztroušeny po celém chromozomu včetně euchromatinu v blízkosti genů, a přispívat k regulaci genů například modulováním chromatinu (Sproul et al., 2020). Jedním z takových satelitů je například Tcast2c, který byl nalezen u potměníka hnědého *Tribolium castaneum*, který je součástí rodiny satelitů TCAST2, do které se řadí i další dvě satelitní subrodiny Tcast2a a Tcast2b, které se nacházejí v tandemovém uspořádání v heterochromatinu pericentromerických oblastí (Felicciello et al., 2014), nebo satelitní DNA 1.688 u octomilky obecné *Drosophila melanogaster* (Kuhn et al., 2012). Jedná se ovšem spíše o ojedinělý jev, a je tedy nepravděpodobné že by podobné uspořádání bylo důvodem pro pozorované výsledky u repetice Ema25. Ty nenasvědčují ani skutečnosti, že by se jednalo o známý typ mobilního elementu, jelikož anotace RepeatExplorer neodhalila žádné typické funkční domény.

Co se týče chromozomální distribuce repetice Ema25, sekvence se po hybridizaci na chromozomálních preparátech vyskytovala roztroušeně po celých chromozomech bez rozdílů, zda se jedná o pohlavní chromozom nebo autozom a výsledky se mezi samci a

samicemi nelišily. Z toho usuzujeme, že Ema25 není obohacená na W chromozomu, a jedná se tudíž spíše o běžnou všudypřítomnou repetitivní sekvenci.

6. Závěr

Cílem této práce byla analýza a mapování repetitivní DNA, která by mohla být obohacena na chromozomu W u tmavoskvrnáče vřesového *H. atomaria*. Repetice Ema25 byla vybrána na základě analýzy genomu tmavoskvrnáče vřesového *H. atomaria* pomocí bioinformatického nástroje RepeatExplorer. Sekvence byla amplifikována pomocí PCR, následně zaklonována do plazmidů a poté byla lokalizována na chromozomech pomocí nepřímé FISH. Výsledky odhalily, že repetice Ema25 se u samic i samců vyskytuje stejně pravidelně a je rovnoměrně rozptýlena po všech chromozomech. Zároveň byla sekvence porovnána s databází BLAST, která odhalila podobnost s mnoha dalšími druhy motýlů. Z toho lze usuzovat, že se jedná o repetitivní sekvenci nacházející se běžně jak v genomu tmavoskvrnáče vřesového *H. atomaria* tak i u ostatních druhů Lepidoptera.

7. Seznam použité literatury

- Abe, H., Mita, K., Yasukochi, Y., Oshiki, T., & Shimada, T. (2005). Retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Cytogenetic and Genome Research*, 110(1-4). <https://doi.org/10.1159/000084946>
- Abe, H., Sugasaki, T., Terada, T., Kanehara, M., Ohbayashi, F., Shimada, T., Kawai, S., Mita, K., & Oshiki, T. (2002). Nested retrotransposons on the W chromosome of the wild silkworm *Bombyx mandarina*. *Insect Molecular Biology*, 11(4). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2583.2002.00339.x>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3). [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Beldade, P., Saenko, S. v., Pul, N., & 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). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000366>
- Biscotti, M. A., Olmo, E., & Heslop-Harrison, J. S. (Pat). (2015). Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome Research*, 23(3). <https://doi.org/10.1007/s10577-015-9499-z>
- Cabral-de-Mello, D. C., & Marec, F. (2021). Universal fluorescence *in situ* hybridization (FISH) protocol for mapping repetitive DNAs in insects and other arthropods. *Molecular Genetics and Genomics*, 296(3). <https://doi.org/10.1007/s00438-021-01765-2>
- Cabral-de-Mello, D. C., Zrzavá, M., Kubičková, S., Rendón, P., & Marec, F. (2021). The Role of Satellite DNAs in Genome Architecture and Sex Chromosome Evolution in Crambidae Moths. *Frontiers in Genetics*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.661417>
- Carabajal Paladino, L. Z., Nguyen, P., Šíchová, J., & Marec, F. (2014). Mapping of single-copy genes by TSA-FISH in the codling moth, *Cydia pomonella*. *BMC Genetics*, 15. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-15-S2-S15>
- Dalíková, M., Zrzavá, M., Hladová, I., Nguyen, P., Šonský, I., Flegrová, M., Kubičková, S., Voleníková, A., Kawahara, A. Y., Peters, R. S., Marec, F., & Sayres, M. W. (2017). New

- Insights into the Evolution of the W Chromosome in Lepidoptera. *Journal of Heredity*, 108(7). <https://doi.org/10.1093/jhered/esx063>
- Dalíková, M., Zrzavá, M., Kubíčková, S., & Marec, F. (2017). W-enriched satellite sequence in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae). *Chromosome Research*, 25(3–4). <https://doi.org/10.1007/s10577-017-9558-8>
- Feliciello, I., Akrap, I., Brajkovi, J., Zlatar, I., & Ugarkovic, D. (2014). Satellite DNA as a driver of population divergence in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Genome Biology and Evolution*, 7(1). <https://doi.org/10.1093/gbe/evu280>
- Fuková, I., Traut, W., Vítková, M., Nguyen, P., Kubíčková, S., & Marec, F. (2007). Probing the W chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin. *Chromosoma*, 116(2). <https://doi.org/10.1007/s00412-006-0086-0>
- Garrido-Ramos, M. A. (2017). Satellite DNA: An evolving topic. In *Genes* (Vol. 8, Issue 9). <https://doi.org/10.3390/genes8090230>
- Gianaroli, L., Magli, M. C., & Ferraretti, A. P. (2013). Sex Chromosomes. *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition*, 4. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01401-7>
- Hejníčková, M., Dalíková, M., Potocký, P., Tammaru, T., Trehubenko, M., Kubíčková, S., Marec, F., & Zrzavá, M. (2021). Degenerated, undifferentiated, rearranged, lost: High variability of sex chromosomes in Geometridae (Lepidoptera) identified by sex chromatin. *Cells*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/cells10092230>
- Hejníčková, M., Koutecký, P., Potocký, P., Provazníková, I., Voleníková, A., Dalíková, M., Visser, S., Marec, F., & Zrzavá, M. (2019). Absence of W chromosome in Psychidae moths and implications for the theory of sex chromosome evolution in Lepidoptera. *Genes*, 10(12). <https://doi.org/10.3390/genes10121016>
- Kiuchi, T., Koga, H., Kawamoto, M., Shoji, K., Sakai, H., Arai, Y., Ishihara, G., Kawaoka, S., Sugano, S., Shimada, T., Suzuki, Y., Suzuki, M. G., & Katsuma, S. (2014). A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm. *Nature*, 509(7502). <https://doi.org/10.1038/nature13315>

- Kuhn, G. C. S., Küttler, H., Moreira-Filho, O., & Heslop-Harrison, J. S. (2012). The 1.688 repetitive DNA of drosophila: Concerted evolution at different genomic scales and association with genes. *Molecular Biology and Evolution*, 29(1). <https://doi.org/10.1093/molbev/msr173>
- Lockwood APM (1961) “Ringer”, solutions and some notes on the physiological basis of their ionic composition.
- Lu, Y. -J, Kochert, G. D., Isenhour, D. J., & Adang, M. J. (1994). Molecular characterization of a strain-specific repeated DNA sequence in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Molecular Biology*, 3(2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.1994.tb00159.x>
- Maddison, D. R., Schulz, K. S., & Maddison, W. P. (2007). The tree of life web project. *Zootaxa*, 1668(1). <https://doi.org/10.11646/zootaxa.1668.1.4>
- Mahendran, B., Acharya, C., Dash, R., Ghosh, S. K., & Kundu, S. C. (2006). Repetitive DNA in tropical tasar silkworm *Antheraea mylitta*. *Gene*, 370(1–2). <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.11.010>
- Mandrioli, M., Manicardi, G. C., & Marec, F. (2003). Cytogenetic and molecular characterization of the MBSAT1 satellite DNA in holokinetic chromosomes of the cabbage moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera). *Chromosome Research*, 11(1). <https://doi.org/10.1023/A:1022058032217>
- Mitter, C., Davis, D. R., & Cummings, M. P. (2017). Phylogeny and Evolution of Lepidoptera. In *Annual Review of Entomology* (Vol. 62). <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-031616-035125>
- Montiel, E. E., Panzera, F., Palomeque, T., Lorite, P., & Pita, S. (2021). Satellitome analysis of *Rhodnius prolixus*, one of the main chagas disease vector species. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11). <https://doi.org/10.3390/ijms22116052>
- Mora, P., Vela, J., Ruiz-Ruano, F. J., Ruiz-Mena, A., Montiel, E. E., Palomeque, T., & Lorite, P. (2020). Satellitome analysis in the ladybird beetle *Hippodamia variegata* (Coleoptera, Coccinellidae). *Genes*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/genes11070783>
- Murillo-Ramos, L., Chazot, N., Sihvonen, P., Öunap, E., Jiang, N., Han, H., Clarke, J. T., Davis, R. B., Tammaru, T., & Wahlberg, N. (2021). Molecular phylogeny, classification,

- biogeography and diversification patterns of a diverse group of moths (Geometridae: Boarmiini). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 162. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2021.107198>
- Novák, P., Neumann, P., Pech, J., Steinhaisl, J., & MacAs, J. (2013). RepeatExplorer: A Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. *Bioinformatics*, 29(6). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt054>
- Palomeque, T., & Lorite, P. (2008). Satellite DNA in insects: A review. *Heredity*, 100(6). <https://doi.org/10.1038/hdy.2008.24>
- Parson, W. (2018). Age estimation with DNA: From forensic DNA fingerprinting to forensic (Epi)genomics: A mini-review. *Gerontology*, 64(4). <https://doi.org/10.1159/000486239>
- Provazníková, I., Hejníčková, M., Visser, S., Dalíková, M., Carabajal Paladino, L. Z., Zrzavá, M., Voleníková, A., Marec, F., & Nguyen, P. (2021). Large-scale comparative analysis of cytogenetic markers across Lepidoptera. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91665-7>
- Ramel, C. (1998). Biodiversity and intraspecific genetic variation. *Pure and Applied Chemistry*, 70(11). <https://doi.org/10.1351/pac199870112079>
- Rice, W. R. (1996). Evolution of the Y sex chromosome in animals. *BioScience*, 46(5). <https://doi.org/10.2307/1312947>
- Rishi, S., Sahni, G., & Rishi, K. K. (1999). Inheritance of unusual sex chromosome evidenced by AAWZ sex trivalent in *Trabala vishnu* (Lasiocampidae, Lepidoptera). *Cytobios*, 1999(394).
- Sahara, K., Yoshido, A., & Traut, W. (2012). Sex chromosome evolution in moths and butterflies. *Chromosome Research*, 20(1). <https://doi.org/10.1007/s10577-011-9262-z>
- Šíchová, J., Voleníková, A., Dincă, V., Nguyen, P., Vila, R., Sahara, K., & Marec, F. (2015). Dynamic karyotype evolution and unique sex determination systems in Leptidea wood white butterflies Speciation and evolutionary genetics. *BMC Evolutionary Biology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0375-4>
- Sihvonen, P., Mutanen, M., Kaila, L., Brehm, G., Hausmann, A., & Staude, H. S. (2011). Comprehensive molecular sampling yields a robust phylogeny for geometrid moths

(Lepidoptera: Geometridae). *PLoS ONE*, 6(6).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020356>

- Simonson, A. B., Servin, J. A., Skophammer, R. G., Herbold, C. W., Rivera, M. C., & Lake, J. A. (2005). Decoding the genomic tree of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501996102>
- Sproul, J. S., Khost, D. E., Eickbush, D. G., Negm, S., Wei, X., Wong, I., & Larracuent, A. M. (2020). Dynamic evolution of euchromatic satellites on the x chromosome in *Drosophila melanogaster* and the simulans clade. *Molecular Biology and Evolution*, 37(8). <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSAA078>
- Suomalainen, E. (1969). On the sex chromosome trivalent in some Lepidoptera females. *Chromosoma*, 28(3). <https://doi.org/10.1007/BF00284928>
- Trask, B. J. (1991). Fluorescence in situ hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. *Trends in Genetics*, 7(5). [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(91\)90378-4](https://doi.org/10.1016/0168-9525(91)90378-4)
- Traut, W., & Marec, F. (1996). Sex chromatin in Lepidoptera. *Quarterly Review of Biology*, 71(2). <https://doi.org/10.1086/419371>
- Traut, W., Sahara, K., & Marec, F. (2008). Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sexual Development*, 1(6). <https://doi.org/10.1159/000111765>
- Traut, W., Vogel, H., Glöckner, G., Hartmann, E., & Heckel, D. G. (2013). High-throughput sequencing of a single chromosome: A moth W chromosome. *Chromosome Research*, 21(5). <https://doi.org/10.1007/s10577-013-9376-6>
- van't Hof, A. E., Campagne, P., Rigden, D. J., Yung, C. J., Lingley, J., Quail, M. A., Hall, N., Darby, A. C., & Saccheri, I. J. (2016). The industrial melanism mutation in British peppered moths is a transposable element. *Nature*, 534(7605). <https://doi.org/10.1038/nature17951>
- Věchtová, P., Dalíková, M., Sýkorová, M., Žurovcová, M., Füssy, Z., & Zrzavá, M. (2016). CpSAT-1, a transcribed satellite sequence from the codling moth, *Cydia pomonella*. *Genetica*, 144(4). <https://doi.org/10.1007/s10709-016-9907-0>
- Voleníková, A. (2015). Analýza pohlavních chromosomů vybraných druhů primitivních motýlů z čeledi hrotnokřídlecovití (Lepidoptera: Hepialoidea). *Diplomová práce, Jihočeská univerzita*.

- Volpi, E. v., & Bridger, J. M. (2008). FISH glossary: An overview of the fluorescence *in situ* hybridization technique. *BioTechniques*, 45(4). <https://doi.org/10.2144/000112811>
- Wright, A. E., Dean, R., Zimmer, F., & Mank, J. E. (2016). How to make a sex chromosome. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/ncomms12087>
- Yoshido, A., Marec, F., & Sahara, K. (2005). 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(3). <https://doi.org/10.1007/s00412-005-0013-9>
- Yoshido, A., Yasukochi, Y., & Sahara, K. (2011). *Samia cynthia* versus *Bombyx mori*: Comparative gene mapping between a species with a low-number karyotype and the model species of Lepidoptera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(6). <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.005>

8. Přílohy

Příloha 1:

Konsenzuální sekvence repetice Ema25 vygenerovaná programem RepeatExplorer.

```
CTAACCTAACCTTTTTTTTTTTTTTTTACCAGGGGAAATCTTTTATAGATAC
CACCACACCTCGAGGGCAGGCGGGTGGTTATGTGGGAGTCTGCCGACTG
GACAGTATACCCACCAAACCCCTGGGTGTTCCACCACTGCGCCTGGTGT
CGGGGCTACGGGCACGCTTGCGCACTCCTCCGCGGCACCCGACAGCGCT
GGCCCAACTCGGGCCCCACCACGGAGCTTCGGCTCCCGCCAGAATGACG
ATGTGCCGAACACCAGACACATCGTCATCCACCACCTGGGACCAACCAG
CACTGGGCGTCAGACAGCACCCGTGTCCGACAGCCCTGGTCCCGATGCA
ACGGGTCAATTAAGTGGCCCCGCGCCTGCCACTACGGCTGCAGAGGAT
AGGGAGAACGGCCGTCGCGATACCGACACTCCTCTTCCCCTGCAGCCCCA
CCGCCTCCGCCAACACGTTGGCGGCACCCGTTAGGGCCGCTGGCAGGAC
GGATAGGCAGCGGCATACTCGCCGCCCGTCCATCCCGTCGCCGCCCGCCG
CTCGATGGGCTCGGCCGCGGTATCGCGACGAGCGCGACACCGCAGTCCA
CCTCAGTCGGCAAGCCGACCTACTGGCCAGCCTCCGCACGGGCTTGTCTA
GGCCAAGACCCGGAGAGGCCGCCCCACCTCGGGTTCCTCTTCGTTTAC
CAGGCTGGCGAGACCTGGCTACTAAGCCCCCCCCGCCACGACAAGGCGGG
AACCCACTCGGGGGGGAAC
```

Příloha 2:

Sekvence zaklonované části repetice Ema25

```
CGGTGGTTATGTGGGAGTCTCCGCCATTGCTGGACGGTATACCCACCAA
AACCCCTGGGTGTTCCGCCACTGCGCCTGGTGTCTGGGGCTACGGGCACGC
TTGCGCACCCGACAGTGCTGGCCTAAAGCAGGCCCCACCACGGAGCATA
GGCTCCCGCAAGAATGACGATGTGTTGAACACCAGACACATCGCCACCC
ACCACCTGGGACCAACCAGCACTGGGCGTCGGACAGCACCCGTATCCGA
CAGCCCTGGTCCCGATGCAACGGGTCAATTAAGTGGCCCCGCGCCTGCC
ACTACGGCTGCAGAGGATAGGGAGAGCGGCCATCGCGATACCGACACTC
CTCTTTCCCCTGCAGCCCCACCGCTTCCGCCAACACGTTGGCAAACCCGT
TAGGTCCGCTGGCAGGTAGGACGGGCAGCGGCTTTCTCACCGCCCGTCTA
TCCCGTAGCCGCCCGCCCTCGATGGGCTCGATCGCGACAAGCGCGACAC
CGCAGTCCACCTCAGTCGGCAAGCCGACCTACTGGCCAGCCTCCACACGG
GCTTGTCCAGGGCCTAGACCCGGGGTGGTGGCCCCACCACGGGTTCTCT
TTGCTTACCAGGCTGGTCAGACCTGGCTACTACTAAGCTACCCCGCCAC
GACAAGGCGGGAACCCAC
```