

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ UNIVERZITY

Katedra genetiky



**Optimalizace cytogenetických technik na modelovém
druhu mšice *Diuraphis noxia* (Aphididae)**

Bakalářská práce

Jana Novotná

2009

Novotná J. (2009) Optimalizace cytogenetických technik na modelovém druhu mšice *Diuraphis noxia* (Aphididae). [Optimization of cytogenetic techniques in a model aphid, *Diuraphis noxia* (Aphididae). Bc. Thesis, in Czech.]. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic. Pp. 30.

Annotation:

Several cytogenetical methods for investigation of karyotyp were used in an aphid species, *Diuraphis noxia* (Hemiptera: Aphididae). These methods (FISH with telomeric probe, FISH with rDNA probe, FISH with histone probe and silver staining) were optimized for application to a sister group Adelgidae, where they could be useful for better differentiation of species in particular stages of their complicated life cycle.

Vedoucí práce: RNDr. Magda Vítková, PhD.

Finanční podpora:

Práce byla financována granty GA AVČR reg. č. IAA600960705 a GAČR, reg. č. 206/06/1860, a Katedrou genetiky Přírodovědecké fakulty JU.

Prohlašuji, že jsem uvedenou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích 29.4.2009

.....

Jana Novotná

Poděkování:

Především bych chtěla poděkovat své školitelce Magdě Vítkové za skvělé vedení, ochotnou výpomoc vždy, když to bylo potřeba a za celkový přístup. Děkuji také Františku Marecovi za odborné rady a neutuchající dobrou náladu, Janu Havelkovi za poskytnutí materiálu i informací a všem členům laboratoře za příjemnou kamarádkou atmosféru. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala své rodině a blízkým za podporu a povzbuzení.

1	ÚVOD	1
1.1	Aphididae	1
1.1.1	Partenogeneze.....	1
1.2	Aphididae vs. Adelgidae	2
1.3	<i>Diuraphis noxia</i>	2
1.4	Chromosomy mšic.....	2
1.5	Metody karyotypové analýzy mšic	3
2	CÍLE PRÁCE	6
3	MATERIÁL A METODY	7
3.1	Použitý hmyz.....	7
3.2	Příprava preparátů mitotických chromozomů	7
3.3	Barvení dusičnanem stříbrným.....	8
3.4	Barvení DAPI.....	8
3.5	Fenol-chloroformová izolace DNA.....	8
3.6	18S rDNA sonda a histonové sondy H3 a H4	9
3.7	Telomerická sonda (TTAGG) _n	10
3.8	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH).....	11
3.9	Southernova hybridizace	12
4	VÝSLEDKY	14
4.1	Příprava chromosomálních preparátů korovnic, barvení DAPI a FISH s telomerickou sondou	14
4.2	Příprava chromosomálních preparátů z embryí <i>Diuraphis noxia</i>	14
4.3	Barvení preparátů z <i>D. noxia</i> dusičnanem stříbrným.....	15
4.4	18S rDNA sonda a histonové (H3, H4) sondy u <i>D. noxia</i>	15
4.5	Telomerická sonda u <i>D. noxia</i>	16
5	DISKUZE	17
5.1	Aphididae vs. Adelgidae	17
5.2	Chromosomy korovnic a mšice <i>D. noxia</i>	17
5.3	Telomerická sonda u korovnic a u mšice <i>D. noxia</i>	17
5.4	Distribuce rDNA a genů pro histony H3, H4 u mšice <i>D. noxia</i>	18
6	ZÁVĚR	19
7	LITERATURA	20
8	PŘÍLOHA	22

ÚVOD

1.1 Aphididae

Aphididae, neboli mšice, patří spolu se sesterskými skupinami Adelgidae a Phylloxeridae do skupiny Aphidoidea (Hemiptera) (Havill a Footitt, 2007). Jedná se o hmyz parazitující převážně na krytosemenných rostlinách v temperátní zóně, avšak jejich rozšíření je celosvětové. Dokáží migrovat na velké vzdálenosti hlavně díky pasivnímu přenosu větrem.

Mšice se podobně jako jiné skupiny hmyzu (např. červci nebo cikády) živí tím, že nabodávají rostlinnou tkáň ústním útvarem, tzv. styletem a sají floémovou tekutinu, ze které získávají potřebné živiny. Rostlinám však neškodí jen samotným vysáváním živin, ale především přenosem řady rostlinných virů, které posléze často rostlinu zahubí.

Dále se mšice vyznačují svými složitými životními cykly, které zahrnují střídání hostitelských rostlin a střídání pohlavního a nepohlavního rozmnožování. Takový cyklus, ve kterém se objevují jak pohlavní tak nepohlavní formy rozmnožování se označuje jako holocyklus. Během holocyklu se v jedné fázi, většinou na podzim, objevují samečci, po zbytek roku se samičky rozmnožují partenogeneticky. Oproti tomu při anholocyklu k pohlavnímu rozmnožování nedochází vůbec.

1.1.1 Partenogeneze

Partenogeneze je formou nepohlavního rozmnožování, při kterém se z vajíčka vyvíjí jedinec, aniž by vajíčko bylo oplodněno spermií. Výskyt tohoto druhu nepohlavního rozmnožování je znám především u rostlin a hmyzu, ale byl zaznamenán i u vyšších živočichů jako jsou například někteří žraloci (Chapman a kol., 2008).

Rozlišujeme několik forem partenogeneze. Méně dokonalým druhem partenogeneze je tzv. sperm-dependentní partenogeneze (např. u rybek z rodu *Poecilia*). V tomto případě je páření nutné pro indukci embryogeneze, ale samčí geny nejsou nijak využity (Heubel a Plath, 2008). Telytokní partenogeneze je typická pro hmyz a rozděluje se na dva typy – apomixis a automixis. Při apomixis neoplozené vajíčko prodělává jedno dělení podobné mitóze, které vede k vývoji potomstva zcela identického s matkou, zatímco při automixis dochází k normálnímu meiotickému dělení a následnému obnovení diploidity u potomstva (Nokkala a Golub, 2006). Jedním ze zástupců apomixis jsou právě mšice.

1.2 Aphididae vs. Adelgidae

Jak už bylo řečeno, jednou ze sesterských skupin mšic jsou Adelgidae nebo také korovnice, které jakožto skupina fytofágního hmyzu sdílí se mšicemi řadu společných znaků a vlastností. Jedním takovým znakem jsou jejich komplikované generační cykly vyznačující se cyklickou partenogenezí. Tento typ asexuálního rozmnožování, kdy se potomstvo vyvíjí z neoplozeného vajíčka, poskytuje mšicím a korovnicím mnoho výhod jako např. kolonizování nových oblastí prostřednictvím jednoho jedince, rychlé namnožení za vhodných podmínek či nezávislost rozmnožování na poměru obou pohlaví v populaci. Sexuální rozmnožování však v tomto případě rozhodně není méně důležité, protože hraje významnou roli při obměňování genotypu (rekombinace alel) a zároveň omezuje šíření mutací a repetice (Haag-Liautard a kol., 2007).

Korovnice se od mšic odlišují vedle specifických morfologických znaků také svými hostiteli, které u nich představují výhradně nahosemenné rostliny, a pak zachováním oviparity po celý život.

1.3 *Diuraphis noxia*

Diuraphis noxia je mšice parazitující na obilninách jako jsou pšenice, ječmen, žito, oves nebo *Triticale* (pšenično žitný hybrid). Někdy se pro její označení používá název „Russian wheat aphid“ neboli ruská pšeničná mšice, pravděpodobně z důvodu jejího domnělého místa původu – jižního Ruska. *D. noxia* se z oblasti jihozápadní Asie a Středomoří rozšířila do jižní Afriky, dále pak do Mexika, USA a Kanady a dnes je její výskyt patrný po celém světě v oblastech pěstujících obilniny (Havelka, ústní sdělení).

Díky rozsáhlým škodám na úrodách obilí po celém světě s velkým dopadem hlavně na země 3. světa se tato mšice stala v poslední době častým námětem pro řady výzkumů, a proto také získala titul „mšice roku 2009“.

1.4 Chromosomy mšic

Mšice, stejně jako jiní zástupci Hemiptera nebo např. Lepidoptera mají holokinetické chromosomy. Tento typ chromosomů bez lokalizované centromery vykazuje kinetickou aktivitu po celé ose chromosomu nebo její větší části. Dalšími vlastnostmi těchto chromosomů je větší odolnost vůči ionizačnímu záření a schopnost zachování vzniklých fragmentů díky kinetické aktivitě ve všech částech chromosomu. Právě zachování fragmentů

vzniklých při chromosomálních zlomech způsobuje chromosomální polymorfismy, které byly pozorovány u přírodních populací mšice *Myzus persicae* v Japonsku (Blackman a Takada, 1977).

Množství chromozomů u mšic je značně variabilní, pohybuje se v rozmezí od $2n = 8$ do $2n = 40$, přičemž nejčastější je počet $2n = 12$ chromosomů (Gut, 1976). Počet chromosomů však může značně kolísat i mezi druhy jednoho rodu. Např. u druhů z rodu *Neuquenaphis* se pohybuje u diploidních samic od 6 do 16 (Blackman a kol., 2003).

Další příčinou chromosomální abnormality či polymorfismu je vedle zachování fragmentů také výskyt tzv. B chromosomů, nadpočetných chromosomů, které se poměrně často objevují u mnoha rostlin a živočichů a jsou považovány za samostatné, parazitické elementy, které se neřídí Mendelovými zákony dědičnosti.

U druhů rodu *Euceraphis* byly objeveny nadbytečné chromosomy, které se však od jiných B chromosomů liší svou stabilitou velikosti a počtu. Tyto většinou heterochromatické elementy svým vzhledem a chováním během spermatogeneze připomínají chromosom X (Blackman, 1988).

Vznik B chromosomů může být různý (Camacho a kol., 2000 ex Maryanska-Nadachowska, 2004). Nejčastěji je jejich původ odvozován od autozomů, nicméně u mšic vznikly nejspíš prostým štěpením chromosomu X na dvě nebo více částí (Blackman, 1995 ex Maryanska-Nadachowska, 2004) a označují se tedy jako nadbytečné nefunkční chromosomy X (Blackman, 1988).

1.5 Metody karyotypové analýzy mšic

Karyotypová analýza je značně ovlivněna charakterem mšicích chromosomů, které jsou, jak už bylo uvedeno, holokinetické. Tento druh chromosomů postrádá primární i sekundární konstrikcii, které v jiných případech mohou odlišit jednotlivé nehomologní chromosomy. V tomto případě je tedy přínosné využití cytogetických metod jako jsou selektivní barvení a hybridizace *in situ* pro získání markerů pro jednotlivé chromosomy.

Jednou z těchto metod je barvení dusičnanem stříbrným (silver staining). Tato technika specificky značí oblast organizátoru jadérka (NOR), která obsahuje geny pro rRNA a zodpovídá za tvorbu jadérka.

Barvení stříbrem bylo použito např. u mšice *Aphis sambuci*, kde odhalilo NOR vždy na jednom konci u dvou nejdelších pohlavních chromosomů, ale také vytvořilo proužky po celé délce všech chromosomů. K vytvoření takového vzoru došlo díky charakteru

holokinetických chromosomů, jejichž strukturu podobně jako u polytenních či meiotických chromosomů utváří nestejněměrné skupiny zrn (Manicardi a kol., 1998).

Další tzv. „proužkovací“ technikou je C-pruhování, při kterém se pozitivně barví bloky heterochromatinu. Tato metoda odhalila u mšice *Aphis pomi* ($2n=8$) čtyři heterochromatické pruhy lokalizované na chromosomu X, zatímco autozomy nevykazovaly žádné známky pozitivního barvení. Další barvení preparátů ošetřených C-pruhováním, tentokrát pomocí fluorochromů (DAPI, CMA₃), odhalilo charakter těchto proužků, a sice že větší část heterochromatinu tvoří oblasti bohaté na AT páry (barvení DAPI), zatímco jen jeden z proužků lokalizovaný na telomeře každého chromosomu X sestává z DNA bohaté na GC páry (Criniti a kol., 2005).

Při studii chromosomů mšice *Acyrtosiphon pisum* ($2n=8$) vznikly po aplikaci C-pruhování a následném barvení DAPI dva heterochromatické bloky na obou koncích chromosomů X a na druhém páru autozomů, zatímco po barvení CMA₃ vznikl jen jeden GC bohatý pruh, a to vždy na jednom konci obou chromosomů X (Bizzaro a kol., 2000). Toto potvrzuje převahu AT bohatého heterochromatinu jako tomu bylo u *A. pomi*.

Preferenční lokalizace heterochromatinu na pohlavních chromosomech mšic je možná zapříčiněna tím, že se heterochromatin podílí na pozdržení oddělení chromosomů X při zrání partenogenetických oocytů, což je považováno za základ pohlavní determinace samců u mšic a zároveň má nejspíš velké množství heterochromatinu a malé množství genů na chromosomech X svůj význam při genové kompenzaci mezi samicemi (XX) a samci (X0). (Orlando, 1974; Blackman, 1987 ex Bizzaro a kol., 2000).

Další z metod pro získání cytogenetických markerů je fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH), která umožňuje lokalizaci specifických sekvencí pomocí značených sond. Běžnými markery pro FISH používanými u nemodelových druhů, u kterých nejsou k dispozici např. knihovny umělých bakteriálních chromosomů (BAC) nebo celochromosomové malovací sondy, jsou genové klastry. Jedná se hlavně o klastry genů pro ribosomální RNA, ale také pro histony, které jsou velmi konzervativní a díky své velikosti i snadno lokalizovatelné.

Dalšími sondami, které se často používají při FISH, jsou sondy telomerické, které slouží k detekci telomerické DNA tvořené tandemem repetitivních sekvencí. Tyto sekvence mohou být vysoce konzervativní, např. sekvence (TTAGGG)_n se vyskytuje u všech obratlovců, nicméně v některých skupinách hmyzu se předpokládána původní sekvence (TTAGG)_n liší už v rámci čeledi (brouci) (Frydrychová a Marec, 2002). Mimo to mohou tyto sondy také odhalit

případně intersticiální telomerické sekvence, které pak mohou dokázat nějakou dávnou fúzi chromosomů.

Příkladem mšice, u které byly použity sondy pro lokalizaci genů pro ribosomální RNA (28S rDNA, 5S rDNA) a sondy pro lokalizaci telomerické repetice (TTAGG)_n je *A. pisum*. rDNA sondy spolu s barvením stříbrem a CMA₃ barvením potvrdily výskyt genů pro rRNA v oblasti jedné telomery u každého chromosomu X. Telomerická sonda zanechala hybridizační signály na obou koncích všech chromosomů (Bizzaro a kol., 2000).

Stejně jako v předchozím případě i u *A.pomi* FISH s rDNA sondou (pro 28S rDNA) označila místo výskytu rDNA v oblasti jedné telomery každého chromosomu X (Criniti a kol., 2005).

2 CÍLE PRÁCE

Korovnice (Adelgidae, Hemiptera), sesterská skupina mšic, jsou z cytogenetického hlediska velmi málo prozkoumané. Důvodem toho je zřejmě obtížnost přípravy preparátů z vajíček pokrytých voskovou vrstvou a možnost sběru těchto vajíček jen po omezenou dobu roku.

Cílem mé práce byla optimalizace cytogenetických technik využívaných pro sestavení karyotypu na modelovém organismu mšice zhoubné (*Diuraphis noxia*) ze sesterské skupiny Aphididae.

Dílčími úkoly bylo:

1. Příprava preparátů mitotických chromozomů „spreading“ technikou z embryí mšice.
2. Otestování klasických a fluorescenčních technik barvení chromozomálních preparátů.
3. Lokalizace klastrů rDNA genů a lokalizace telomerické repetice (TTAGG)_n na chromozomech pomocí techniky FISH.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Použitý hmyz

Pro pokusy byly použity mšice *Diuraphis noxia* z laboratorního chovu, a sice partenogenetické samice chované při teplotě 20°C a fotoperiodě 18/6, jejichž potomstvo tvoří výhradně samice a dále pak samice chované při teplotě 15°-17°C a fotoperiodě 12/12, které produkují potomstvo obojího pohlaví.

Dalšími zkoumanými organismy byly vybrané druhy koronic (Adelgidae), které byly nasbírány a určeny Ing. Janem Havelkou, PhD. - *Adelges tardus* (v Českých Budějovicích), *Adelges laricis* (ve Strmilově) a *Dreyfusia prelli* (v Buchlovicích).

3.2 Příprava preparátů mitotických chromozomů

Preparáty z *D. noxia* byly pořízeny z embryí viviparních samic pomocí „spreading“ techniky. Embrya byla nejdříve vypitvána z těla samice ve fyziologickém roztoku, poté byla přenesena na cca. 7 minut (max. 10 minut) do hypotonického roztoku (0,075M KCl) a posléze byla ponechána nejméně 15 minut v čerstvě připravené fixáži Carnoy (ethanol-chloroform-kyselina octová, 6:3:1). Po nafixování byla embrya (1 embryo na preparát), nejlépe časná stádia, přenesena do kapky 60% kyseliny octové na podložním sklíčku, které bylo předem očištěno v kyselém ethanolu (1% HCl v 96% ethanolu). Na podložním skle pak byla jednotlivá embrya rozmacerována pomocí wolframových jehel. Po maceraci byla sklíčka položena na histologickou ploténku vyhřátou na 45°C, kde byly buňky rozptýleny posouváním odpařující se kapky pomocí wolframové jehly. Preparáty pak byly odvodněny v alkoholové řadě (70%-80%-96% ethanol, po 30 sekund v každém) a následně skladovány při -20°C.

V případě korovnic byly preparáty připraveny z nakladených vajíček téměř stejným postupem. Vajíčka byla nejprve hypotonizována v hypotonickém roztoku s detergentem (10 ml 0,075M KCl + 2µl detergentu Joy) po dobu max. 10 minut, pak byla přenesena do fixáže Carnoy na minimálně 15 minut a macerována v kapce 60% kyseliny octové na podložním skle. Buňky byly na sklíčku rozptýleny výše popsaným způsobem, preparáty byly následně odvodněny v alkoholové řadě a uskladněny při -20°C.

3.3 Barvení dusičnanem stříbrným

Tato metoda byla provedena podle práce Manicardi a kol., 1998. Chromozomální preparáty byly vyjmuty z -20°C a odvodněny v alkoholové řadě. Poté byly inkubovány po dobu 30 minut v 0,2M HCl při pokojové teplotě a opláchnuty vodou. Po oschnutí byla na preparáty přenesena barvicí suspenze na krycím skle, na které byly předtím pomocí skleněné tyčinky nanесeny a smíchány 2 kapky 50% AgNO_3 (5g/10 ml dest. H_2O) a 1 kapka 2% želatiny (2 g práškové želatiny na 100 ml destilované H_2O a 1 ml kyseliny mravenčí). Následovalo vlastní barvení, které probíhalo na různých sklech po různou dobu (1. sklo – 30 minut, 2. sklo – 45 minut a 3. sklo – 60 minut) za účelem stanovení doby optimálního nabarvení. Pak bylo krycí sklo spolu s přebytečným barvivem odmyto proudem tekoucí vody a po oschnutí byly preparáty prohlíženy pod světelným mikroskopem Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Jena, Německo). Černobílé digitální fotografie preparátů byly pořízeny chlazenou CCD kamerou F-View a programem AnalySIS Software a zpracovány byly v programu Adobe Photoshop, verze 5.0.

3.4 Barvení DAPI

Barvení pomocí DAPI (Sigma-Aldrich) sestávalo z těchto kroků: promytí v 1% Triton X/1x PBS (PBS – 0,15M NaCl, 0,05M NaH_2PO_4 , pH 7,4; Triton – Sigma-Aldrich) 5 minut při RT, barvení 15 minut při RT v DAPI v 1% Triton X-100/1x PBS (výsledná koncentrace DAPI – 100 ng/ml), promytí 3 minuty v 1% Kodak PhotoFlo/1x PBS při RT, promytí 1 minutu při RT v 1% Kodak PhotoFlo/miliQ H_2O . Na závěr byla skla zakápnuta 20 μl antifade DABCO (Sigma-Aldrich), zakryta krycím sklem, jehož okraje byly uzavřeny lakem na nehty a po zaschnutí byla pozorována pod fluorescenčním mikroskopem Zeiss Axioplan 2. Černobílé digitální fotografie preparátů byly pořízeny chlazenou CCD kamerou F-View s příslušným fluorescenčním filtrem a programem AnalySIS Software a zpracovány byly v programu Adobe Photoshop, verze 5.0.

3.5 Fenol-chloroformová izolace DNA

Na izolaci genomové DNA bylo použito cca. 40 samic mšice *D. noxia*, které byly zhomogenizovány v 500 μl extrakčního pufru o složení s výslednými koncentracemi: 100mM NaCl; 10mM Tris-HCl o pH 8,0; 50mM EDTA o pH 8,0; 100 $\mu\text{g/ml}$ proteinázy K; 0,5% Sarkosyl (přičemž proteináza K byla přidána až těsně před použitím). Homogenát se nechal 2

hodiny inkubovat při 37°C a poté k němu bylo přidáno 10 µl Rnázy A (o koncentraci 10 mg/ml) a směs se nechala další hodinu inkubovat při 37°C. Po inkubaci následovalo přidání 500 µl fenolu, vortexování 15 s a centrifugace 15 minut při 5000 g. Vrchní fáze vzniklá během centrifugace byla přenesena do čisté mikrokumavky a spolu s 500 µl fenolu byla opět zvortexována 15 s a centrifugována 15 minut při 5000 g. Vrchní fáze byla následně přenesena do čisté mikrokumavky a k roztoku bylo přidáno 400 µl směsi fenol-chloroform-isoamylalkohol (25:24:1). Následovalo opět vortexování 15 s a centrifugace 15 minut při 5000 g. Dalším krokem bylo opět přenesení vrchní fáze do čisté mikrokumavky, zalití 400 µl směsi chloroform-isoamylalkohol (24:1), vortexování 15 s a centrifugace 15 minut při 5000 g. Další vzniklá vrchní fáze byla v čisté mikrokumavce zalita 1/10 objemu 3M octanu sodného, promíchána a zalita 7/10 objemu isopropanolu a znovu promíchána. Nakonec byla tato směs zcentrifugována 10 minut na nejvyšší rychlost, čímž se vytvořil pelet obsahující DNA. Ten byl posléze ještě 2x promyt 1 ml 70% ethanolu při centrifugaci 5 minut na nejvyšší rychlost, osušen a rozpuštěn ve 20 µl miliQ H₂O.

Koncentrace vyizolované DNA byla změřena na fluorimetru DyNA Quant (Hoefler, Jolliston, Massachusetts). Výsledná koncentrace byla 447 ng/µl. Čistota DNA byla ověřena kontrolní restriční reakcí o objemu 10 µl s následujícími komponenty: 0,5 µl enzymu EcoR I (Takara, Otsu, Japonsko), 1 µl pufru H, 1 µl DNA a 7,5 µl miliQ H₂O. Tato směs byla po dobu jedné hodiny inkubována při teplotě 37°C a následně elektroforeticky separována v 1% agarózovém gelu. Spolu s naštěpenou DNA byl na gel nanesen i vzorek neštěpené DNA, který měl ukázat, zda DNA není fragmentovaná a zda je ve vzorku přítomna kontaminace RNA. Takto získaná DNA byla použita jako templát pro PCR reakce a pro Southernovu hybridizaci.

3.6 18S rDNA sonda a histonové sondy H3 a H4

Neznačená 18S rDNA sonda byla zhotovena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) s primery 18S-Ins-forward primer: 5'-CCTGAGAAACGGCTACACATC-3' a 18S-Ins-reverse primer: 5'-GAGTCTCGTTCGTTATCGGA-3' (Generi Biotech, Hradec Králové, Česká republika), které byly navrženy v práci Perrot a Minnot, 2004. 25 µl této reakce obsahovalo oba primery o výsledné koncentraci 0,5µM, směs dNTP s celkovou výslednou koncentrací 0,2mM, 1x *Ex Taq* pufr, 2U *Takara Ex Taq HS* DNA polymerázu (Takara) a 100 ng templátové DNA. Reakce probíhala při těchto podmínkách: počáteční denaturace 3 minuty při 94°C, 30 cyklů zahrnujících denaturaci 1 minutu při 94°C, annealing 1 minutu při 51°C a

extenzi 1,5 minuty při 72°C. Závěrem proběhla extenze 10 minut při 72°C. Jako templátová DNA byla použita celogenomová DNA z *D. noxia* vyextrahovaná klasickou fenol-chloroformovou izolací DNA. Výsledný PCR produkt byl použit pro elektroforetickou separaci na 1% agarózovém gelu, kde vytvořil proužek o očekávané velikosti cca 1 kbp. Ten byl vyříznut a vyextrahován pomocí kitu QIAquick Gel Extraction (Qiagen GmbH, Hilden, Německo), a následně použit jako templát pro výrobu sondy pomocí PCR se značenými nukleotidy. Složení reakční směsi bylo stejné jako u prvního kola PCR, pouze zásobní roztok nukleotidů měl následující složení: 1mM dGTP, 1mM dATP, 1mM dCTP, 0,65mM dTTP, 0,35mM biotin-dUTP (jednotlivé neznačené nukleotidy byly vyrobeny firmou Takara, biotin-16-dUTP a digoxigenin-11-dUTP jsou od firmy Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo).

Sondy pro geny kódující histony H3 a H4 byly získány pomocí PCR s primery navrženými v práci Pineau a kol., 2005 (histon H4) a primery podle Cabrero a kol., 2009 (histon H3). Koncentrace jednotlivých složek reakční směsi byla stejná jako v případě výroby 18S rDNA sondy. Průběh reakce se skládal z počáteční denaturace 5 minut při 95°C, po které následovalo 30 cyklů obsahující denaturaci 15 sekund při 94°C, annealing 15 sekund při 48°C pro H3 nebo při 58°C pro H4 a extenzi 1 minutu při 72°C. Na závěr přišla extenze 7 minut při 72°C. Produkty PCR byly elektroforeticky separovány na 1% agarózovém gelu, vyizolovány z gelu a naznačeny biotinem nebo digoxigeninem (DIG) stejným způsobem jako v případě 18S rDNA sondy.

3.7 Telomerická sonda (TTAGG)_n

Pro výrobu hmyzí telomerické sondy byla použita metoda beztemplátové PCR (Sahara a kol., 1999) s následujícími komponenty: primery TELO 1 a TELO 2 s výslednými koncentracemi 0,5μM, 1x PCR pufr, směs dNTP s koncentrací 0,8mM a 2 U/μl *Taq* polymerázy. Reakce probíhala v těchto krocích: počáteční denaturace 90 sekund při 94°C, 30 cyklů obsahujících denaturaci 45 sekund při 94°C, annealing 30 sekund při 52°C a extenzi 60 sekund při 72°C. Závěrečná extenze trvala 10 minut při 72°C. Výchozí PCR produkt byl přečištěn etanolovou precipitací a značen biotinem metodou Nick translace pomocí kitu BioNick Labeling System (Invitrogen, Life Technologies Inc., San Diego, Kalifornie). Telomerická sonda (TTAGG)_n značená digoxigeninem pro Southernovu hybridizaci byla poskytnuta Magdou Vítkovou (sonda byla značena pomocí kitu DIG DNA Labeling and Detection Kit (Roche Diagnostics GmbH) podle manuálu výrobce).

3.8 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

Metodika FISH byla provedena s menšími obměnami podle postupu v publikaci Sahara a kol., 1999. Chromosomální preparáty byly vyjmuty z -20°C a ihned odvodněny v alkoholové řadě (po 30 s v 70%, 80% a 96% alkoholu). Po oschnutí byly preparáty určené pro hybridizaci s 18S rDNA, H3 nebo H4 sondou vystaveny předpůsobení Rnázou A ($2\ \mu\text{g}$ Rnázy A v $100\ \mu\text{l}$ $2\times$ SSC) po 1 hodinu při 37°C a opláchnuty ve dvou kyvetách s $2\times$ SSC ($1\times$ SSC: $0,15\text{M}$ citrát sodný, $0,015\text{M}$ NaCl, pH 7,0) po pěti minutách za pokojové teploty. Všechny preparáty byly pro snížení pozadí dále inkubovány v $5\times$ koncentrovaném Denhardtově roztoku ($50\times$ Denhardtův roztok: 1% Ficcol, 1% polyvinylpyrrolidon, 1% hovězí serum albumin) 30 minut při 37°C . Následovala denaturace skel v 70% deionizovaném formamidu (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, Missouri, USA) v $2\times$ SSC 3 minuty a 30 vteřin při 68°C . Pro zastavení denaturace byla skla ponořena do předchlazeného 70% ethanolu (-20°C) na 1 minutu, dále pak na 30 sekund do 80% ethanolu a na 30 sekund do 96% ethanolu.

Hybridizační směs byla připravena smícháním $50\ \text{ng}$ značené sondy s $25\ \mu\text{g}$ DNA lososích spermií (Sigma-Aldrich), poté byla precipitována 3M octanem sodným ($1/10$ objemu hybridizační směsi) a předchlazeným 100% ethanolem ($2,5$ objemu hybridizační směsi) při -80°C po dobu 1 hodiny. Pak byla směs 20 minut centrifugována při $13000\ \text{rpm}$. Po centrifugaci byl slit supernatant a k peletu bylo přidáno $200\ \mu\text{l}$ předchlazeného 70% ethanolu. Vzorek byl znovu centrifugován při $13000\ \text{rpm}$ po dobu 15 minut a pak byl zbaven supernatantu. Vzniklý pelet se nechal oschnout v mikrozkuhavce s otevřeným víčkem do termostatu s teplotou 37°C . Po přidání $5\ \mu\text{l}$ 100% deionizovaného formamidu se pelet nechal 30 minut rozpouštět při teplotě 37°C . Následovalo přidání $5\ \mu\text{l}$ 20% dextran sulfátu v $4\times$ SSC a denaturace vzniklé směsi při 90°C po dobu 5 minut. Poté se směs rychle zchladila vložáním na 3 minuty na led. Po promíchání a centrifugaci byla hybridizační směs připravena pro nanesení na dobře oschlá sklíčka. Na každé sklíčko přišlo $10\ \mu\text{l}$ denaturované směsi, vše bylo přikryto krycím sklem ($24\times 32\text{mm}$), jehož okraje byly zalepeny lepidlem Rubber cement. Hybridizace probíhala 16-20 hodin v termostatu při 37°C v neprůhledné krabičce s filtračním papírem navlhčeným $2\times$ SSC.

Druhý den byla skla vyjmuta z termostatu, zbavena krycího skla (nejprve se odstranil Rubber cement pomocí pinzety, pak sklíčko krátkým namočením do první prací lázně) a promývána 3×5 minut v 50% formamidu v $2\times$ SSC pufru při 46°C , 5×2 minuty v $2\times$ SSC pufru při 46°C , 3×5 minut v $0,1\times$ SSC pufru při 62°C . Nakonec byla skla inkubována minimálně 5 minut v $4\times$ SSC pufru s 0,1% Tween 20 ve tmě při pokojové teplotě (RT). Po

zablokování reakce pomocí 2,5% BSA (bovinní sérový albumin) v 4x SSC ve tmě při RT po dobu 20 minut byly hybridizační signály detekovány streptavidinem konjugovaným s fluorochromem Cy3 (Jackson ImmunoRes. Labs., Inc., Burlingame, Kalifornie) v 2,5% BSA v 4x SSC (100 μ l 2,5% BSA; 0,1 μ l streptavidinu Cy3) 30 minut při RT. (Pokud byly hybridizovány dvě sondy, jedna značená biotinem a druhá digoxigeninem, bylo složení prvního barvicího roztoku následující: 100 μ l 2,5% BSA v 4x SSC, 0,1 μ l streptavidinu-Cy3, 4 μ l AntiDIG myší protilátky.) Následovalo praní preparátů 3x3 minuty v 4xSSC s 0,1% Tween 20 ve vodní lázni vyhřáté na 37°C. Na další zablokování reakce pomocí 2,5% BSA v 4x SSC 10 minut ve tmě při RT navazovalo zesílení signálu inkubací v biotinilovaném antistreptavidinu (Vector Labs., Inc., Burlingame, Kalifornie) v 2,5% BSA v 4x SSC (2 μ l biotinilovaném antistreptavidinu, 50 μ l 2,5% BSA v 4x SSC) 20 minut ve tmě při 37°C. (Pro dvě různě značené sondy: 2 μ l biotinilovaném antistreptavidinu, 4 μ l DIG-značené anti-myší protilátky, 50 μ l 2,5% BSA v 4x SSC.) Skla byla dále prána 3x3 minuty v 4x SSC s 0,1% Tween 20 při 37°C a opět blokována 10 minut ve tmě při RT pomocí 2,5% BSA v 4x SSC. Poté přišla další detekce streptavidinem-Cy3 20 minut ve tmě při 37°C (pro dvě různě značené sondy: 100 μ l 2,5% BSA v 4x SSC, 0,1 μ l streptavidinu-Cy3, 4 μ l protilátky AntiDIG značené Fluoresceinem) a praní 3x3 minuty v 4x SSC s 0,1% Tween 20 při 37°C. AntiDIG myší protilátka, DIG-značená anti-myší protilátka a protilátka AntiDIG značená Fluoresceinem byly součástí kitu Fluorescent Antibody Enhancer Set for DIG Detection (Roche Diagnostics GmbH).

Poslední fází bylo barvení DAPI podle výše uvedeného postupu, pozorování pod fluorescenčním mikroskopem Zeiss AxioPlan 2 a zdokumentování pomocí CCD kamery F-View s příslušnými fluorescenčními filtry a programem AnalySIS Software. Černobílé digitální fotografie byly pak zpracovány pomocí programu Adobe Photoshop, verze 5.0

3.9 Southernova hybridizace

Tato metoda byla použita pro zjištění přítomnosti telomerické sekvence (TTAGG)_n v genomu *D. noxia*. Celogenomová DNA byla naštěpena při restriční reakci, která obsahovala: směs restričních enzymů Hinf I (New England Biolabs) a Rsa I (New England Biolabs) (od každého 5 U), 2 μ l pufru 10x NEBuffer 4 a 1 μ g DNA. Celkový objem reakce byl 20 μ l a inkubace probíhala přes noc při 37°C. Naštěpená DNA pak byla elektroforeticky rozdělena na 1% agarózovém gelu v TBE pufru (45mM Trisborát, 1mM EDTA) s velikostním markerem DNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled (Roche Diagnostics GmbH). Pro depurinaci

dlouhých fragmentů byl gel s DNA ponořen na 10 minut do 0,25M HCl. Poté následovalo promývání v denaturačním roztoku (50mM NaOH; 0,15M NaCl) 2x 15 minut při RT a v neutralizačním roztoku (50mM Tris-HCl; 0,3M NaCl; pH 7,5) opět 2x 15 minut při RT. (Mezi jednotlivými inkubacemi v roztocích byl gel vždy opláchnut destilovanou vodou.) Přenos DNA z gelu na nylonovou membránu Hybond N+ (GE Healthcare) byl proveden pomocí kapilárního přenosu v tzv. sendvičovém můstku s 20x SSC pufrům jako přenosným médiem a probíhal více než 15 hodin (přes noc). Poté byla membrána oplachována 5 minut v 6x SSC pufru a po krátkém oschnutí byla zafixována v Stralinker UV crosslinkeru (Stratagene, La Jolla, USA). Následovalo opláchnutí membrány v 2x SSC a prehybridizace 30 minut při 42°C v prehybridizačním roztoku (5 ml 10% SDS, 40 ml 2,5M NaCl, 10 ml 50x Denhardtova roztoku, 40 ml formamidu, 0,2 ml 0,5M EDTA, 1 ml 1M Tris-HCl). Po odstranění prehybridizačního roztoku byla membrána ihned zalita hybridizačním roztokem (6,5 ml prehybridizačního roztoku a 100 ng denaturované sondy značené alkali-labilním digoxigeninem) a ponechána 3 hodiny hybridizovat při 42°C. Po odstranění hybridizačního roztoku byla membrána promývána 2x 5 minut při RT v promývacím pufru I (2x SSC, 0,1% SDS) a 15 minut při 68°C v promývacím pufru II (0,2x SSC, 0,1% SDS). Poté následovala chemiluminiscenční detekce, která obsahovala: promývání v promývacím pufru III (0,3% Tween v 1x TBS) 5 minut při RT, inkubaci v blokovacím roztoku (5% odtučněné sušené mléko v 1x TBS) 30 minut při RT, inkubaci v roztoku Anti-DIG-AP (70 ml blokovacího roztoku, 7 µl Anti-DIG-AP (Roche Diagnostics GmbH)) 30 minut při RT, promývání 2x 15 minut promývacím pufru III při RT a inkubaci v detekčním pufru (1M Tris-HCl, 1M NaCl) 2-5 minut při RT. Nakonec byla vlhká membrána vložena do hybridizačního sáčku s přibližně 40 kapkami roztoku chemoluminiscenčního substrátu pro alkalickou fosfatázu CDP Star, Ready-to-use (Roche Diagnostics GmbH) a inkubována 5 minut při RT. Okraje sáčku byly po vymačkání přebytečného substrátu zataveny. Chemiluminiscence na membráně byla snímána pomocí CCD kamery LAS-3000 Lumi-Imager (Fuji Photo Film. Europe GmbH, Düsseldorf, Německo).

4 VÝSLEDKY

4.1 Příprava chromosomálních preparátů korovnic, barvení DAPI a FISH s telomerickou sondou

Preparáty s mitotickými chromosomy korovnic byly připraveny z nakladených vajíček, která byla před vlastní „spreading“ technikou hypotonizována v hypotonickém roztoku s přídavkem detergentu, který se osvědčil při narušení povrchové voskové vrstvy vajíček. Testované druhy byly *Adelges laricis*, *A. tardus* a *Dreifusia prelli*. Několik preparátů každého druhu bylo obarveno DAPI a jednotlivé mitózy zdokumentovány kvůli následnému odečtu chromosomů a sestavení karyotypu (Příloha: **Obr. 1-3**). Z každého druhu bylo odečteno minimálně 20 mitóz, nicméně počet chromosomů v diploidní sadě nebylo možné jednoznačně určit vzhledem k tomu, že chromosomy mají tendenci se řadit do řetízkových útvarů, ve kterých nejsou patrné konce jednotlivých chromosomů. Počet chromosomů v hodnocených mitózách *A. laricis* (Příloha: **Obr. 1a**) se pohyboval v rozsahu $2n = 17 - 21$ s nejčastějším počtem chromosomů $2n = 20$, u *A. tardus* (Příloha: **Obr. 2**) se počet chromosomů pohyboval v rozsahu $2n = 18 - 22$, s nejčastějším počtem $2n = 20$, a konečně u *D. prelli* (Příloha: **Obr. 3**) byly zjištěny hodnoty v rozsahu $2n = 16 - 20$, přičemž nejčastější počet byl $2n = 18$. Pro vizualizaci koncových částí chromosomů v řetízku byla použita metoda FISH s hmyzí telomerickou sondou (TTAGG)_n. Přítomnost telomerické sekvence byla potvrzena slabými hybridizačními signály (Příloha: **Obr. 1b**), které však nebyly pozorovány na všech koncích chromosomů, a proto příliš nepřispěly k vyřešení daného problému.

Další pokusy již byly prováděny na modelovém organismu ze sesterské skupiny z důvodu nedostatku materiálu – vajíček, jejichž sběr je možný jen v omezeném ročním období.

4.2 Příprava chromosomálních preparátů z embryí *Diuraphis noxia*

Pro přípravu preparátů mitotických chromosomů z *D. noxia* pomocí „spreading“ techniky byla použita časná stádia embryí z těl viviparních samic. Samičí embrya byla pořízena z partenogenetických samic chovaných uměle při fotoperiodě 18/6 a teplotě 20°C, zatímco samčí emrya byla vyjmuta ze samic chovaných při fotoperiodě 12/12 a teplotě 15 – 17°C . Poté byly některé preparáty obarveny DAPI za účelem pozorování mitóz a odečtení chromosomů. Počet chromosomů u preparátů samic byl $2n = 10$ sestávající z jednoho páru malých chromosomů, tří párů chromosomů střední velikosti a jednoho páru velkých

chromosomů. U samčích preparátů byly pozorovány chromosomy o celkovém počtu $2n = 9$, s tím že jeden z páru největších chromosomů chyběl, z čehož vyplývá, že největší chromosomy jsou chromosomy X. Jelikož chromosomy po barvení DAPI nevykazovaly známky obarvených bloků heterochromatinu, byly za účelem rozlišení třech párů chromosomů prostřední velikosti použity následující metody.

4.3 Barvení preparátů z *D. noxia* dusičnanem stříbrným

Jednotlivé preparáty mitotických chromosomů z embryí viviparních samic byly ošetřeny barvicím roztokem po různě dlouhou dobu za účelem zjištění optimální doby nabarvení. Optimální dobou bylo 60 minut, kdy byly proužky nejintenzivnější. U takto obarvených preparátů samic s $2n=10$ byly pozorovány silně obarvené oblasti NOR na jednom konci každého chromosomu X (Příloha: **Obr. 4-5**). Na ostatních chromosomech byly zřetelné proužky po celé délce, ty ale díky své pravidelnosti neumožnily od sebe odlišit tři páry homologních chromosomů prostřední velikosti.

4.4 18S rDNA sonda a histonové (H3, H4) sondy u *D. noxia*

FISH s rDNA sondou byla aplikována nejprve na preparáty mitotických chromosomů samic, kde podobně jako při barvení stříbrem označila na jednom konci oba chromosomy X (Příloha: **Obr. 6a,b**), čímž bylo prokázáno, že tyto chromosomy nesou shluk genů pro 18S rRNA. Pro ověření domněnky, že tento pár homologů představuje pohlavní chromosomy X, byla sonda použita na chromosomální preparáty samců ($2n=9$). Tím, že zde signál vykazoval jediný největší chromosom bez homologního partnera (Příloha: **Obr. 7a,b**), byla potvrzena přítomnost NOR na chromosomech X.

Pro hybridizaci s histonovými sondami byly použity preparáty mitotických chromosomů samic. Na chromosomech byly po hybridizaci s H4 sondou pozorovány velmi slabé signály, které neměly, jak tomu v jiných případech běžně bývá, formu shluků, ale byly nestejně rozptýlené (Příloha: **Obr. 8**). Hybridizace se sondou H3 se nepodařila.

4.5 Telomerická sonda u *D. noxia*

Stejně jako u korovnic i u *D. noxia* byla použita telomerická sonda. Ta však ani při jednom z pokusů nejevila známky hybridizace (Příloha: **Obr. 9a**), z čehož bylo usuzováno, že v telomerické DNA je buď používán jiný motiv nebo jsou jednotlivé repeticce přerušovány jinými vmezeřenými sekvencemi a tudíž jsou příliš krátké pro navázání sondy (František Marec, ústní sdělení). Jako pozitivní kontrola byl při FISH použit preparát pachytenních chromosomů motýla *Ephestia kuehniella* (Příloha: **Obr. 9b**), který se stejnou sondou perfektně hybridizoval.

Aby bylo zjištěno, zda u tohoto druhu mšice sekvence (TTAGG)_n skutečně není, byla genomová DNA z *D. noxia* otestována pomocí Southernovy hybridizace s hmyzí telomerickou sondou (TTAGG)_n. Zároveň byla se sondou hybridizována i pozitivní kontrola (genomová DNA z *E. kuehniella*) a negativní kontrola (lidská genomová DNA) (Příloha: **Obr. 10a**). Výsledek této hybridizace následně potvrdil nepřítomnost hledané sekvence v genomu *D. noxia*. Sonda rovněž nehybridizovala k negativní kontrole, zatímco vizualizovala hledanou sekvenci u pozitivní kontroly (Příloha: **Obr. 10b**).

5 DISKUZE

5.1 Aphididae vs. Adelgidae

Mšice a korovnice jsou dvě sesterské skupiny z nadčeledi Aphidoidea, které pojí podobný způsob života (fytofágie a střídání partenogenetické a sexuální fáze), z cytogenetického hlediska např. přítomnost holokinetických chromosomů. Zatímco mšice jsou cytogenetiky relativně zkoumány, korovnice zůstávají z tohoto hlediska na okraji zájmu. Hlavním důvodem je zřejmě kombinace obtížnosti přípravy chromosomálních preparátů z vajíček korovnic a sezónní výskyt těchto vajíček v přírodě. Oproti tomu příprava chromosomálních preparátů z embryí viviparních mšic je poměrně snadná. Navíc se mšice mohou chovat uměle v laboratoři, kde se dá pomocí změny podmínek (fotoperioda, teplota) navodit produkce sexuálního potomstva, hlavně samců, což se hodí např. ke studiu pohlavních chromosomů a meiózy.

5.2 Chromosomy korovnic a mšice *D. noxia*

Počet chromosomů u vybraných druhů korovnic (*Adelges laricis*, *A. tardus* a *Dreyfusia prelli*) se pohyboval kolem $2n = 20$, ale přesný počet se nepodařilo stanovit z několika důvodů. Jednak mají tyto chromosomy tendenci se řadit do jakýchsi řetízků, ve kterých nelze určit konce jednotlivých chromosomů, a pak je také možné uvažovat o výskytu B chromosomů, jak je tomu např. u některých mšic (Blackman, 1988). Dalším možným důvodem kolísání počtu chromosomů v pozorovaných preparátech korovnic je samotná příprava chromosomálních preparátů, protože k homogenizaci vajíčka je zapotřebí větší razance, která možná způsobila přílišné rozeznání chromosomů od sebe. U mšice *D. noxia* problémy s odečtem chromosomů nebyly.

5.3 Telomerická sonda u korovnic a u mšice *D. noxia*

Telomerická sekvence (TTAGG)_n je původním motivem členovců (Vítková a kol., 2005) a byla nalezena u většiny hmyzu, včetně obou zkoumaných mšic (Frydrychová a kol., 2004; Bizzaro a kol., 2000; Spence a kol., 1998). Hybridizace (TTAGG)_n sondy s chromosomálními preparáty vybraných druhů korovnic byla prokázána signály, které sice nebyly příliš výrazné, nicméně přece jen poukazyvaly na přítomnost dané sekvence. Slabé hybridizační signály

mohly být způsobeny přítomností cytoplazmy, která bránila průniku sondy na všechna cílová místa. Další možností je počínající náhrada telomerické sekvence (TTAGG)_n za alternativní mechanismus, jako jsou např. transposony Het-A a TART u *Drosophila melanogaster* (Pardue a DeBaryshe, 2003), kdy repetice (TTAGG)_n postupně ztratí svou funkci a zmizí.

Oproti tomu u mšice *D. noxia* hybridizace prokázána nebyla a následným otestováním genomové DNA této mšice Southernovou hybridizací bylo zjištěno, že sekvence (TTAGG)_n se v jejím genomu nevyskytuje. Protože v jiných pracích zabývajících se chromosomy mšic tato sekvence prokázána byla (Spence a kol., 1998; Bizzaro a kol., 2000), je možné, že u mšic je výskyt původní telomerické sekvence (TTAGG)_n stejně heterogenní, jako např. u brouků, kde je u některých druhů zřejmě ztracena a druhotně nahrazena jiným motivem (Frydrychová a Marec, 2002).

5.4 Distribuce rDNA a genů pro histony H3, H4 u mšice *D. noxia*

Obě metody, FISH s 18S rDNA sondou a barvení dusičnanem stříbrným, běžně používané k lokalizaci NOR potvrdily u *D. noxia* výskyt těchto oblastí na jednom konci každého chromosomu X. Stejně výsledky s výskytem NOR na chromosomech X byly vyhodnoceny i v jiných pracích na mšicích (Manicardi a kol., 1998; Bizzaro a kol., 2000; Criniti a kol., 2005). Z toho by se dalo usuzovat, že chromosomy X nesoucí NOR jsou pro mšice typické.

Barvení dusičnanem stříbrným kromě označení NOR vytvořilo na všech ostatních chromosomech po celé jejich délce proužky, stejně jako tomu bylo u chromosomů v práci Manicardi a kol., 1998. Na rozdíl od této práce však tyto proužky neumožnily rozlišení nehomologních chromosomů, protože jejich rozložení na jednotlivých chromosomech bylo příliš pravidelné. Příčinou vzniku proužkového vzoru na chromosomech je granulární charakter holokinetických chromosomů (viz kapitola *Metody karyotypové analýzy mšic*).

Dalšími sondami, které byly aplikovány na chromosomální preparáty za účelem získání potřebného markeru byly sondy hybridizující s geny pro histony H3 a H4. Histonové geny tvoří komplexní soubor zahrnující různé množství kopií, které jsou shlukovány do jedné či více oblastí chromosomu (Cabrero a kol., 2009). Histony, a to zvláště H3 a H4, jsou vysoce konzervované mezi eukaryotními organizmy, a proto mohou sloužit jako dobrý chromosomální marker. U chromosomů mšice *D. noxia* však hybridizací nevznikly očekávané shluky, ale slabé signály, které byly rozprostřeny různě na chromosomech. To může být

způsobeno tím, že histonové geny v tomto případě nemají příliš velké množství kopií a ty se vyskytují v genomu spíše samostatně než ve shlucích.

6 ZÁVĚR

Tato práce zabývající se hledáním vhodných chromosomálních markerů pro sestavení karyotypu mšice zhoubné (*Diuraphis noxia*) slouží pro optimalizaci cytogenetických a molekulárně cytogenetických technik, které mohou být následně využity při studiu chromosomů korovnic, sesterské skupiny mšic.

Chromosomální preparáty byly připraveny jednak z vajíček vybraných druhů korovnic (*Adelges laricis*, *A. tardus* a *Dreyfusia prelyi*) a posléze také z embryí viviparních samic mšice *D. noxia*. Preparáty mitotických chromosomů korovnic neposkytly dostačující informaci pro odečet chromosomů, protože v pozorovaných mitózách měly chromosomy tendenci vytvářet řetízky, u kterých nebyly zřejmé konce jednotlivých chromosomů. Pro objasnění tohoto problému byla použita FISH s telomerickou sondou. Jelikož je sběr vajíček potřebných pro tvorbu preparátů omezen na určité roční období, byla pro hledání dalších chromosomálních markerů použita mšice zhoubná (*D. noxia*) z laboratorního chovu.

Hledanými markery byly klastry genů pro ribosomální RNA, které byly lokalizovány u *D. noxia* pomocí FISH s 18S rDNA sondou a barvením dusičnanem stříbrným, přičemž obě techniky potvrdily výskyt shluků těchto genů na jednom konci chromosomů X. Dalším použitým markerem byl klastr genů pro histon H4. Ten však nebyl pozorován jako předpokládaný shluk, nýbrž jako roztroušené signály.

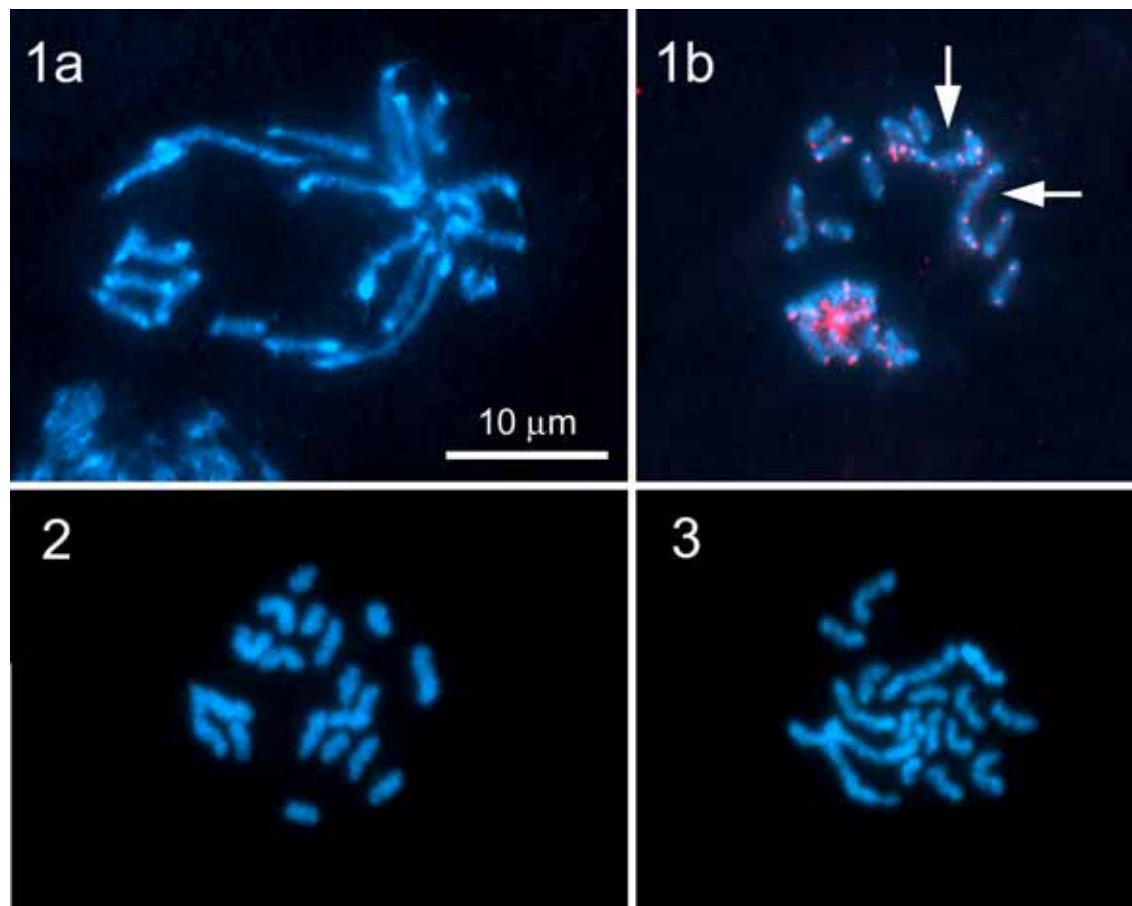
Telomerická sonda v podobě sekvence (TTAGG)_n byla aplikována jak u zástupců korovnic, tak u *D. noxia* a odhalila u korovnic slabé hybridizační signály, svědčící o přítomnosti této sekvence, zatímco u *D. noxia* sonda nehybridizovala. Následným otestováním Southernovou hybridizací s touto hmyzí telomerickou sondou bylo potvrzeno, že hledaná sekvence u *D. noxia* není.

7 LITERATURA

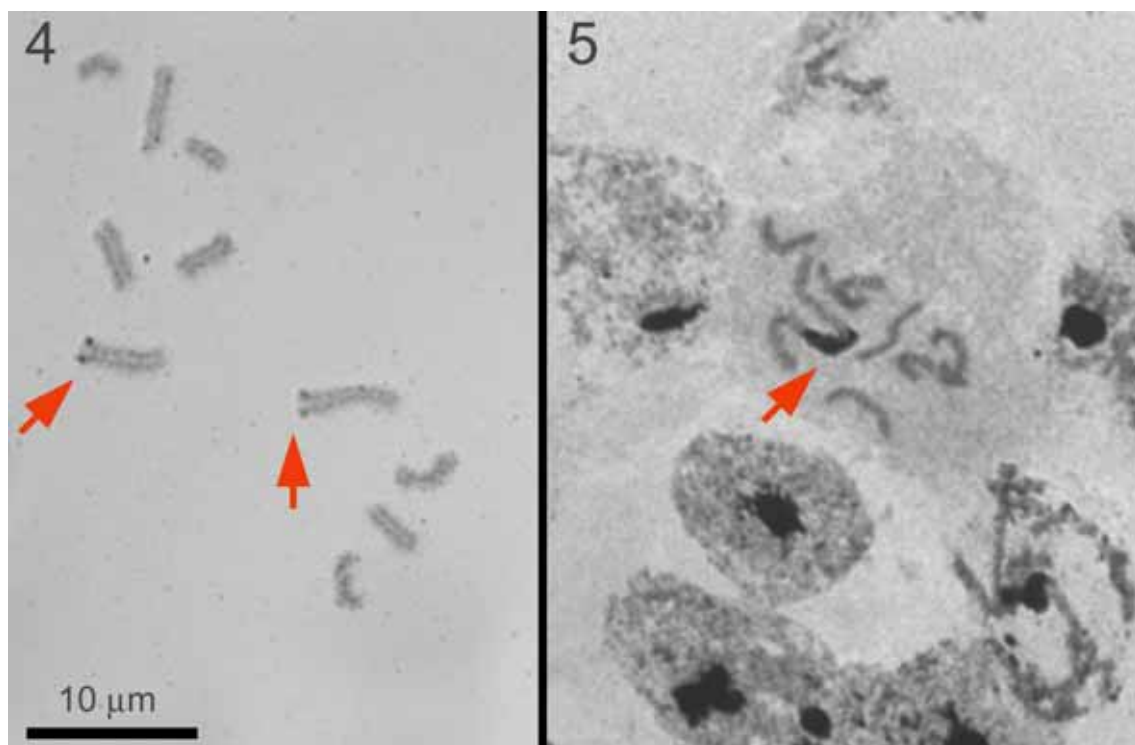
- Bizzaro D., Mandrioli M., Zanotti M. a kol. (2000) Chromosome analysis and molecular characterization of highly repeated DNAs in the aphid *Acyrtosiphon pisum* (Aphididae, Hemiptera), *Genetica* **108**: 197-202
- Blackman R. L. (1988) Stability of a multiple X chromosome system and associated B chromosomes in birch aphid (*Euceraphis* ssp.; Homoptera: Aphididae), *Chromosoma* (Berl) **96**: 318-324
- Blackman R. L., Brown P. A., Ramirez C. C. a kol. (2003) Karyotype variation in the South American aphid genus *Neuquenaphis* (Hemiptera, Aphididae, Neuquenaphidinae), *Hereditas* **138**: 6-10
- Blackman R. L., Takada H. (1977) The inheritance of natural chromosomal polymorphisms in the aphid *Myzus persicae* (Sulcer), *Genetica* **47(1)**: 9-15
- Cabrero J., López-León M. D., Teruell M. a kol. Chromosome mapping of H3 and H4 histone gene clusters in 35 species of acridid grasshoppers, *Chromosome Res* DOI: 10.1007/s10577-009-9030-5
- Criniti A., Simonazzi G., Cassanelli S. a kol. (2005) X-linked heterochromatin distribution in the holocentric chromosomes of the green apple aphid *Aphis pomi*, *Genetica* **124**: 93-98
- Frydrychová R., Grossmann P., Trubač P. a kol. (2004) Phylogenetic distribution of TTAGG telomeric repeats in insect, *Genome* **47**: 163-178
- Frydrychová R., Marec F. (2002) Repeated losses of TTAGG telomere repeats in evolution of beetles (Coleoptera), *Genetica* **115**: 179-187
- Gut J. (1976) Chromosome numbers of parthenogenetic females of fifty-five species of Aphididae (Homoptera) new to cytology, *Genetica* **46**: 279-285
- Haag-Liautard C., Dorris M., Maside X. a kol. (2007) Direct estimation of per nucleotide and genomic deleterious mutation rates in *Drosophila*, *Nature* **445(7123)**: 82-85
- Havill N. P., Footitt R. G. (2007) Biology and Evolution of Adelgidae, *Annu Rev Entomol* **52**: 325-49
- Heubel K. U., Plath M. (2008) Influence of male harassment and female competition on female feeding behaviour in a sexual-asexual mating complex of mollies (*Poecilia mexicana*, *P. formosa*), *Behav Ecol and Sociobiol* **62(11)**: 1689-1699
- Chapman D. D., Firchau B., Shivji M. S. (2008) Parthenogenesis in a large-bodied requiem shark, the blacktip *Carcharhinus limbatus*, *J Fish Biol* **73(6)**: 1473-1477

- Manicardi G. C., Bizzaro D., Mandrioli M. a kol. (1998) Silver staining as a new banding technique to identify aphid chromosomes, *Chromosome Res* **6**: 55-57
- Maryanska-Nadachovska A. (2004) B chromosomes in Sternorrhyncha (Hemiptera, Insecta), *Cytogenet Genome Res* **106**: 210-214
- Nokkala S., Golub V. (2006) Automictic and Apomictic Parthenogenesis in Psocids (Insecta: Psocoptera), *Folia biol (Krakow)* **54**: 19-22
- Pardue M. L., DeBaryshe P. G. (2003) Retrotransposons provide an evolutionarily robust on-telomerase mechanism to maintain telomeres, *Annu Rev Genet* **37**: 485–511
- Perrot M., Minnot J. (2004) Larval morphology, genetic divergence, and contrasting level of host manipulation between forms of *Pomphorhynchus laevis* (Acanthocephala), *Int J Parasitol* **34**: 45-54
- Pineau P., Henry M., Suspene R. a kol. (2005) A universal primer set for PCR amplification of nuclear histone H4 genes from all animal species, *Mol Biol Evol* **22(3)**: 582-588
- Sahara K., Marec F., Traut W. (1999) TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods, *Chromosome Res* **7**: 449-460
- Spence J. M., Blackman R. L., Testa J. M. a kol. (1998) A 169-base pair tandem repeat DNA marker for subtelomeric heterochromatin and chromosomal rearrangements in aphids of the *Myzus persicae* group, *Chromosome Res* **6**: 167-175
- Vítková M., Král J., Traut W. a kol. (2005) The evolutionary origin of insect telomeric repeats, (TTAGG)_n, *Chromosome Res* **13**: 145-156

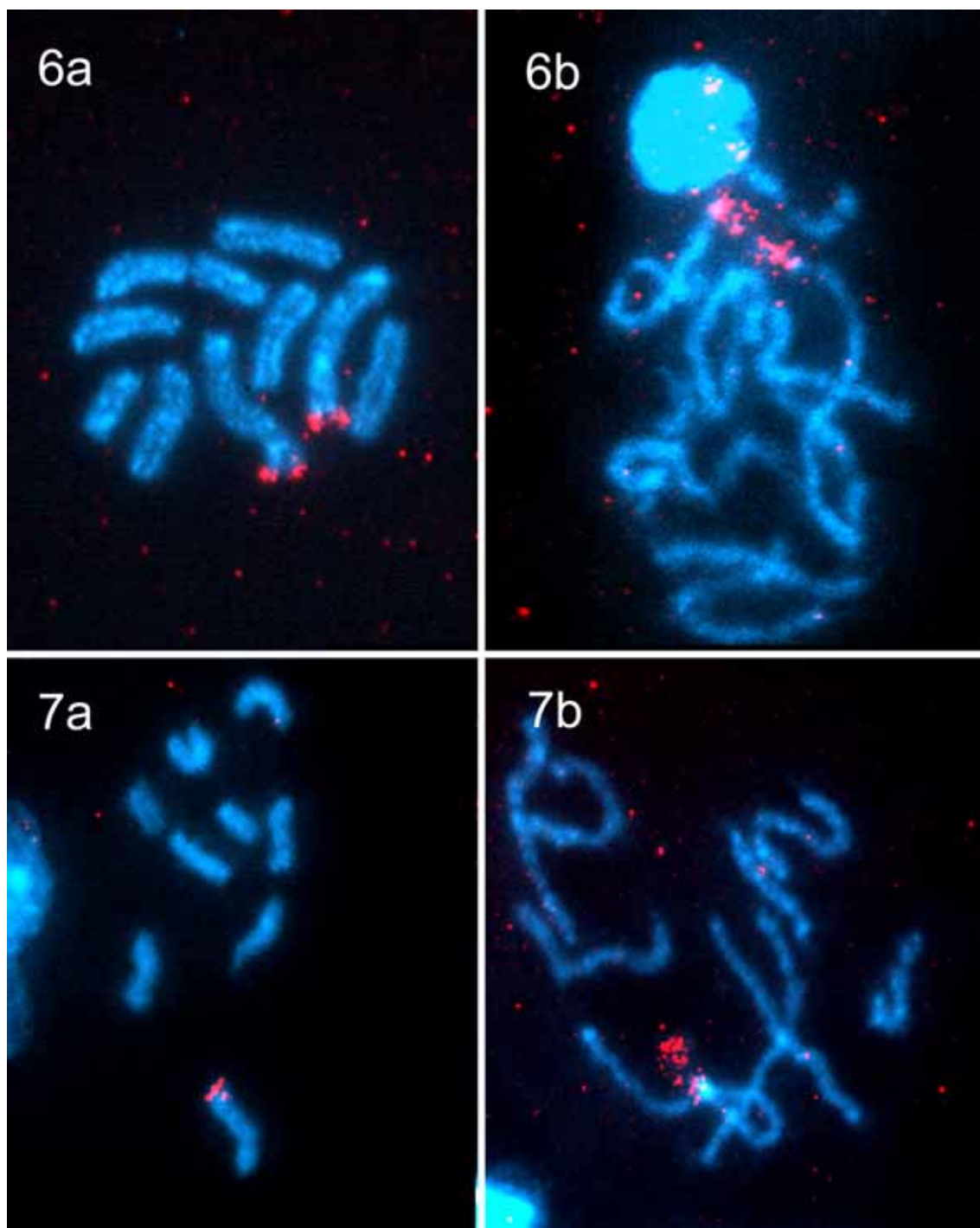
8 PŘÍLOHA



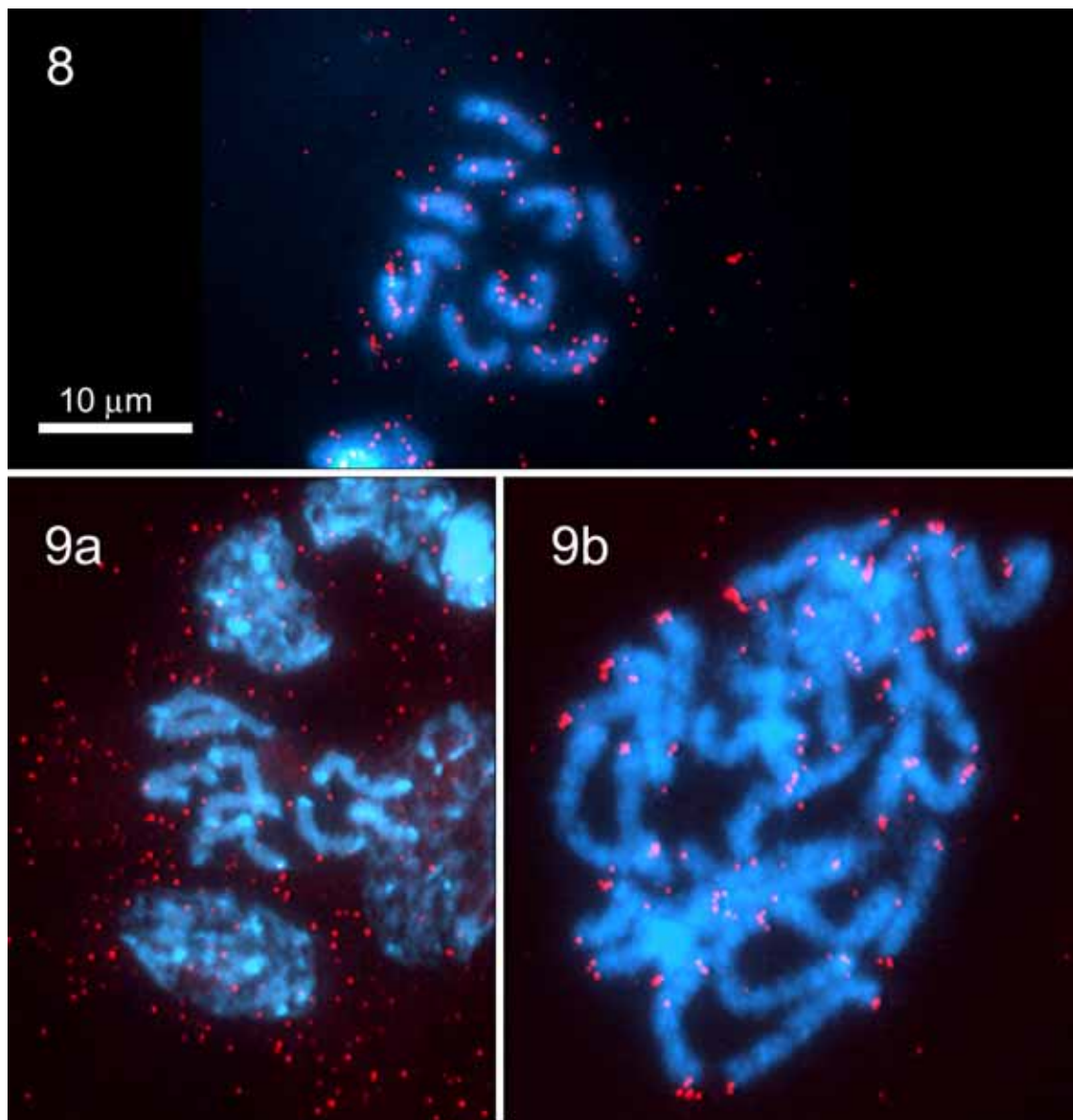
Obr. 1-3. Obrázky mitotických chromosomů korovnic barvených DAPI (modrá barva). **Obr. 1a** *Adelges laricis*. **1b** chromosomy *A. laricis* zpracované metodou FISH s telomerickou sondou (TTAGG)_n značenou biotinem (červená barva), šipky značí chromosomy vytvářející řetízky. **Obr. 2** *A. tardus* **Obr. 3** *Dreyfusia prelli*.



Obr. 4-5. Obrázky jader samice mšice *D. noxia* ($2n = 10$) po barvení dusičnanem stříbrným. **Obr. 4** šipky ukazují na pohlavní chromosomy X s tmavě obarvenými oblastmi NOR. **Obr. 5** šipka ukazuje na tmavě obarvené oblasti NOR na chromosomech X, které spolupracují na tvorbě jadérka.



Obr. 6-7. Obrázky mitotických jader *D. noxia* zpracovaných metodou FISH s 18S rDNA sondou značenou biotinem (červená barva) a obarvených DAPI (modrá barva). **Obr. 6a** samičí mitotické chromosomy, 2 největší chromosomy X nesou signály 18S rDNA sondy. **Obr. 6b** samičí prometafázní mitotické chromosomy nesoucí signál na chromosomech X. **Obr. 7a** samčí mitotické chromosomy nesoucí signál na chromosomu X. **Obr. 7b** samčí prometafázní mitotické chromosomy se signálem na chromosomu X.

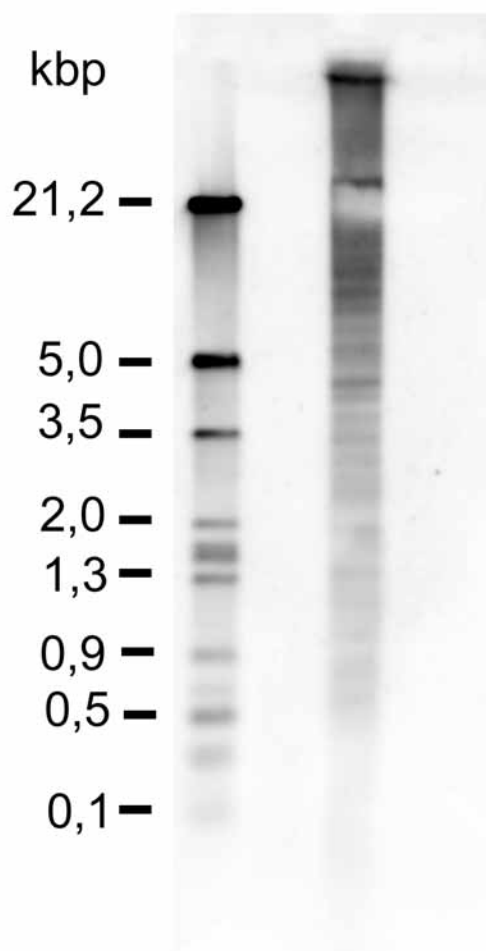


Obr. 8-9. Obrázky jader zpracovaných metodou FISH a barvených DAPI (modrá barva). **Obr. 8** obrázek mitotických chromosomů ze samice *D. noxia* s H4 histonovou sondou značenou biotinem (červená barva). **Obr. 9a** obrázek mitotických chromosomů samice *D. noxia* s telomerickou sondou (TTAGG)_n značenou biotinem (červená barva). **Obr. 9b** obrázek pachytenních bivalentů *E. kuehniella* (pozitivní kontrola) se stejnou telomerickou sondou (TTAGG)_n.

10a
 marker
D. noxia
E. kuehniella
H. sapiens



10b
 marker
D. noxia
E. kuehniella
H. sapiens



Obr. 10a, 10b. Obrázky pořízené během Southernovy hybridizace telomerické sondy (TTAGG)_n s genomovými DNA mšice *D. noxia*, motýla *Ephesia kuehniella* (pozitivní kontrola) a člověka *Homo sapiens* (negativní kontrola). **Obr. 10a** obrázek gelu z elektroforetické separace gDNA po restriční reakci s restriktázami *Hinf I* a *Rsa I*. **Obr. 10b** obrázek membrány s chemoluminiscenčním signálem. U *D. noxia* a *H. sapiens* (negativní kontrola) nedošlo k hybridizaci.