

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Cytogenetická analýza satelitní DNA u předivky

Yponomeuta cagnagella

Bakalářská práce

Tomáš Štrobl

Školitel: RNDr. Petr Nguyen, Ph.D.

České Budějovice 2023

Štrobl T., 2023: Cytogenetická analýza satelitní DNA u předivky *Yponomeuta cagnagella*. [Cytogenetic Analysis of Satellite DNA in Spindle Ermine Moth *Yponomeuta cagnagella*. Bc. Thesis, in Czech] – 33 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

Satellite DNA has been somewhat neglected topic when it comes to studies on Lepidopteran genetics. This thesis therefore attempts to shed some light on the distribution of a few already known satDNAs in the karyotype of the spindle ermine moth (*Yponomeuta cagnagella*, Hübner, 1813). This examination was performed predominantly by visualisation of satellite clusters via fluorescence in situ hybridization on *Y. cagnagella* chromosome preparations.

Čestné prohlášení:

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

V Českých Budějovicích dne 12. 4. 2023

.....

Tomáš Štrobl

Poděkování

Rád bych tímto způsobem poděkoval v první řadě svému vedoucímu, Petru Nguyenovi, za jeho neocenitelnou pomoc, časté a užitečné rady a také nesmírnou trpělivost, kterou se mnou během práce v laboratoři i při sepisování měl. Mé mnohé díky patří také Anně Voleníkové, nejen za výběr a poskytnutí přístupu ke zkoumaným satelitním sekvencím, ale také za vysvětlení nezbytných inforatických nástrojů a Monice Hospodářské za to, že mi pomohla vypořádat se s nejednou z komplikovaných metod potřebných pro dokončení práce. Samozřejmě nelze opomenout ani pomoc ze strany kolegyně Xenie a Anet, jejichž ochota pomoci a poradit v jakýkoli den v týdnu, mne dodnes nepřestává udivovat. Samozřejmě děkuji tímto i všem ostatním kolegům a kolegyním jak z naší, tak i jiných laboratoří za všudypřítomnou přátelskou atmosféru i příležitostnou radu. V neposlední řadě patří má vděčnost také mé rodině a přítelkyni, bez jejichž neochvějně důvěry a podpory bych tuto bakalářskou práci jen stěží dokončil.

Finanční podpora

Práce byla financována z projektu GAČR 20-20650Y.

Obsah

1 Úvod	1
1.1 Studovaný organismus.....	1
1.1.1 Ekologie druhu.....	1
1.1.2 Taxonomická pozice.....	2
1.1.3 Karyotyp a genom předivek.....	3
1.2 Satelitní DNA.....	4
1.2.1 Klasifikace satelitů.....	5
1.2.2 Historie objevu satDNA.....	6
1.2.3 Uplatnění poznatků o satelitní DNA.....	7
2 Cíle práce	9
3 Materiál a metody	10
3.1 Studovaný organismus.....	10
3.2 Izolace DNA.....	10
3.2.1 Izolace metodou CTAB.....	10
3.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	11
3.4 Elektroforéza.....	12
3.5 Klonování a sekvenace.....	13
3.5.1 Srovnání výsledků s referenčními sekvencemi.....	14
3.6 Příprava sond pro in situ hybridizace pomocí značení „nick translací“.....	14
3.7 Chromosomální preparáty.....	15
3.8 Fluorescenční in situ hybridizace (FISH).....	15
3.8.1 Analýza výsledku FISH.....	16
4 Výsledky	17
4.1 Výsledky kontroly elektroforézou.....	17
4.2 Výsledky srovnání s referenční sekvencí.....	18
4.3 Výsledky fluorescenční hybridizace in situ.....	19
5 Diskuse	22
6 Závěr	26
7 Seznam použité literatury	27
8 Přílohy	32

1 Úvod

1.1 Studovaný organismus

Druhem, na nějž jsem se v této práci zaměřil, je předivka brslenová, *Yponomeuta cagnagella* (Hübner, 1813). Tento drobný motýl je zhruba 20-25 mm velký. Jeho charakteristickým rysem je bílé zbarvení hlavy a předního páru křídel, opatřeného několika řadami černých teček. Druhý pár křídel je výrazně tmavší, hnědý až tmavě šedivý. Larvy jsou bledě šedé či nažloutlé, opět s tmavými tečkami podél boků, zatímco jejich hlava je černá. (Meyrick 1895).

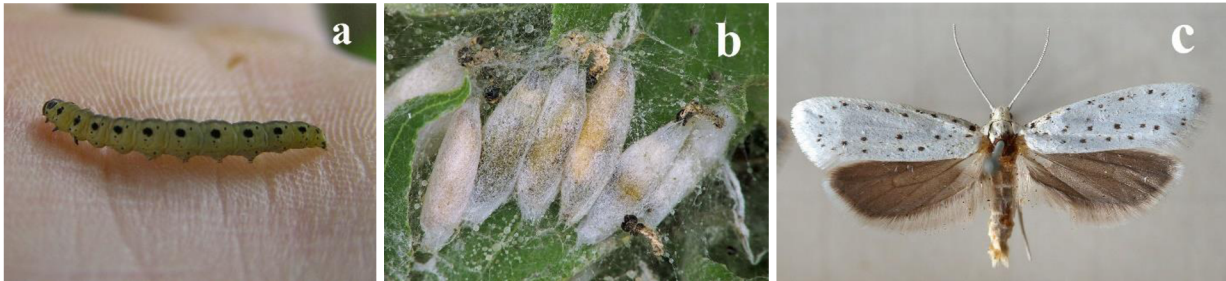
1.1.1 Ekologie druhu

Zatímco samotný druh *Y. cagnagella*, má těžiště svého výskytu v Evropě (Meyrick 1895), ostatní druhy tohoto pestrého rodu svým rozšířením zasahují po celé palearktické oblasti a na jihovýchodě přes jihovýchodní Asii do Austrálie a na Nový Zéland. V Novém světě se přirozeně vyskytuje pouze jediný druh, *Y. multipunctella* (Turner et. al. 2010).

Tak jako pro každý druh rodu *Yponomeuta*, je i pro tyto drobné motýly zcela zásadní jejich živná rostlina, tu pro ně představuje brslen (*Euonymus*) (Roessingh et. al. 2000). Díky své schopnosti přežít a dokončit vývoj na více druzích tohoto rodu, dokázaly předivky v 60. letech minulého století přežít neúmyslný transport na severovýchod Severoamerického kontinentu a rozšířit se tam na okrasných dřevinách. Druh, který se zdá být jejich primární živnou rostlinou a je tedy i nejvíce zasažen v jejich americké oblasti rozšíření, je brslen evropský (*Euonymus europaeus*) (Hoebeke 1987).

Předivky brslenové se rozmnožují jedenkrát ročně, přičemž kladení vajíček probíhá v létě, typicky ve druhé polovině července. Samičky kladou vajíčka v kompaktních shlucích na větvičky vhodné hostitelské rostliny. Jedna snůška zpravidla obsahuje 25 až 50 vajíček a larvy se líhnou již v srpnu. Vylíhlé larvy však přezimují ukryté pod zbytky prázdné snůšky pokryté tuhou vrstvou zaschlého ochranného sekretu, který samička produkuje při kladení. Zimování končí počátkem jara a larvy se na rostlině mnohdy krmí společně, přičemž snovají síť z hedvábí. Ta jim slouží jako částečná ochrana před vlivy prostředí a predací. V některých případech mohou rozsáhlé a komplexní hedvábné sítě předivek obsáhnout celé větve živné rostliny. K zakuklení dochází v červnu a přeměna v dospělce trvá přibližně 14 dnů. Kokony si larvy spřádají buďto ve zbytcích ochranné sítě nebo u země pod nižším

rostlinstvem v případě, že hostitel byl jejich aktivitou zbaven většiny listů a neposkytuje tedy již dostatečný úkryt (Hoebeke 1987).



Obrázek 1: Předivka brslenová (*Yponomeuta cagnagella*, Hübner, 1813). **a** – larva předivky (autor: Beentree). **b** – jedinci zakuklení na živné rostlině (autor: Rasbak). **c** – dospělec druhu (autor: Sarefo).

a a **c** staženo z webové stránky https://en.wikipedia.org/wiki/Yponomeuta_cagnagella; 10. 4. 2023, **b** staženo z webové stránky https://es.wikipedia.org/wiki/Yponomeuta_cagnagella; 10. 4. 2023

1.1.2 Taxonomická pozice

Skupina Yponomeutoidea, v české klasifikaci zpravidla označovaná jako nadčeleď, odvozuje své jméno právě od rodu *Yponomeuta*, jehož představitelem se zabývá tato práce. Z hlediska taxonomie se Yponomeutoidea nachází poblíž báze kladu Ditrysia, v rámci řádu motýlů (Lepidoptera). O něco kontroverznější je však její přesnější umístění. Ve starších studiích byla za její sesterskou skupinu považována nadčeleď Gracillarioidea (Heikkilä et al. 2015). Novější studie, zejména ty založené na genetických datech se však přiklání k názoru, že Gracillarioidea je spíše vnitřní skupinou Yponomeutoidea, jež by se tímto stala parafyletickou. Navzdory těmto a podobným drobným nesrovnalostem, je však vnitřní struktura Yponomeutoidea relativně dobře známa (Yang et al. 2019).

Samotný rod *Yponomeuta* se v posledních letech dočkal bližšího zkoumání, zejména jako jeden z modelových organismů pro evoluci fytofágního hmyzu. Zvláště zajímavá je na předivkách brslenových jejich hostitelská preference. Jejich momentální preferovaná živná rostlina, brslen evropský (*Euonymus europaeus*), totiž patří do čeledi Celastraceae, stejně jako hostitelské druhy většiny ostatních zástupců rodu. Tato preference však může

představovat až druhotné navrácení *Y. cagnagella* a její blízké příbuzné *Y. irrorellus* k původní skupině živných rostlin poté, co se společný předek evropských druhů adaptoval na rostliny z čeledi Rosaceae. Domníváme se tak na základě zjištění, že předivky obou zmíněných druhů vykazují vnímavost k benzaldehydu (C_6H_5CHO), což je látka produkovaná rostlinami z čeledi Rosaceae, nikoli však Celastraceae (Roessingh et. al. 2007). Další podobný hostitelský posun byl zaznamenán u jiné dvojice evropských druhů, *Y. rorrellus* a *Y. gigas*, které se z živných rostlin čeledi Rosaceae přesunuly na čeleď Salicaceae. Ačkoli fylogenetická pozice některých druhů v rámci rodu *Yponomeuta* je stále nejistá (zejména uvnitř kladu *Y. cagnagella* – *Y. irrorellus*), příbuzenské vztahy se již podařilo z větší části uspokojivě vyřešit (Turner et. al. 2010).

1.1.3 Karyotyp a genom předivek

Předivky, coby zástupci motýlů jsou rodem se samičí heterogamií (Sahara et. al. 2012). Karyotyp některých předivek, včetně *Y. cagnagella* však navíc vykazuje poměrně neobvyklé uspořádání, kdy se haploidní počet chromosomů (n) liší o jedna mezi zástupci různých pohlaví. Je to způsobeno tím, že tyto předivky disponují dvěma různými chromosomy Z, a tudíž je jejich výsledný diploidní karyotyp $2n=62$ ($\sigma Z_1Z_1Z_2Z_2$) u samce a $2n=61$ ($\text{♀}WZ_1Z_2$) u samice, kde pohlavní chromosomy v meióze tvoří trivalent (Nilsson et. al. 1988). Stejně jako u většiny ostatních motýlů je chromosom W u samic v interfázních jádrech rozpoznatelný jako pohlavně specifické heterochromatinové tělíčko, patrné v jádře po valnou část buněčného cyklu (Hora et. al. 2019).

Chromosomy předivek brslenových a motýlů obecně, jsou holokinetické, to znamená, že tzv. kinetochor, proteinová struktura, jež se během dělení připojuje na dělicí vřeténko, může být velmi rozsáhlý a pokrývat větší část chromosomu (Wolf et. al. 1997).

Na složení genomu předivky brslenové se prozatím zaměřovalo jen relativně málo studií. To je zřejmě alespoň z části zapříčiněno tím, že jeho sekvence byla sestavena teprve nedávno.

Velikost genomu předivek brslenových patří s délkou více než 700 Mbp mezi dalšími doposud studovanými motýly k těm větším. Například v porovnání s notoricky známým modelovým organismem, bourcem morušovým (*Bombyx mori*, Linnaeus, 1758), který disponuje genomem zhruba o 200 Mbp kratším, předivky skutečně vynikají. Taxonem, který je jim v tomto ohledu podstatně bližší, je kupříkladu můra z čeledi vakonošovitých (Psychidae) *Eumeta variegata* (Snellen, 1879) s genomem taktéž mírně překračujícím hranici 700 Mbp (Volenikova et. al. 2022).

Pro naše účely je také důležitý obsah repetitivních sekvencí v genomu *Y. cagnagella*. Celkový objem repetitivních sekvencí v genomu předivky dosahuje téměř jedné poloviny (přesněji 46,75 %), přičemž pouhých 0,57 % tvoří známá satelitní DNA. V případě podílu repetitivní DNA na celkovém objemu genomu je variabilita ostatních motýlů podstatně vyšší než v případě jeho absolutní velikosti. Z toho vyplývá, že zhruba poloviční obsah repetitivních sekvencí se v tomto ohledu příliš nevyvíká (u již zmíněného *B. mori* reprezentují repeticí 46,8 % genomu) (Volenikova et. al. 2022).

I přes to je však potřeba dodat, že dostupnost osekvenovaného genomu zcela zásadním způsobem usnadňuje další navazující výzkum. Mezi potenciální aplikace takto získaných poznatků patří mimo jiné studium exprese vybraných genů důležitých pro ekologii druhu, jako například těch, podílejících se na produkci hedvábí. Stejně tak i možnost lepšího porozumění taxonomii a v neposlední řadě i lokalizace a bližšího prozkoumání strukturních elementů, mezi něž náleží i satelitní DNA (Volenikova et. al. 2022). Například právě příprava specifických primerů, využitých v této práci, by nebyla bez předchozí sekvenace možná.

1.2 Satelitní DNA

Většina satelitů, které nalzáme mezi živočichy i rostlinami, vykazuje relativně uniformní délku monomeru buďto mezi 150 a 180 bp nebo mezi 300 a 360 bp. Již na těchto hodnotách je patrný zajímavý jev, a sice, že v průběhu času procházejí satelity evolučními změnami, jež mohou v mnoha případech způsobit sloučení repetitivních sekvencí v delší celky. To znamená, že repeticí, které pozorujeme v genomech organismů dnes, mohly vzniknout v minulosti sloučením starších a kratších monomerů téže sekvence (Garrido-Ramos 2017).

Společně s transpozibilními elementy je satelitní DNA zodpovědná za značnou část variability v eukaryotních genomech, přičemž tyto dvě složky v některých případech tvoří až jednu polovinu DNA příslušného organismu (Lopez-Flores & Garrido-Ramos 2012). I přes asociaci s klíčovými strukturami v buňce a důležitou roli, kterou zastávají v jejich fungování, vykazují tyto satelity značnou sekvenční rozmanitost, jež se z evolučního hlediska utváří velmi rychle. Takto dynamické změny v konstituci satelitních klastrů mohou být poháněny několika různými molekulárními mechanismy, jako je například ektopická rekombinace (Louzada et. al. 2020).

Další zásadní vlastností satelitní DNA, je její role při chromosomálních přestavbách. Například ve studii Adegua et. al. (2008) autoři uvádí pravděpodobnou korelaci mezi

chromosomálními přestavbami a lokalizací satelitní DNA. V daném případě klastry satelitní DNA kolokalizovaly s místy na chromosomech, kde docházelo v evoluční minulosti ke zlomům či fúzním událostem. Toto pozorování nasvědčuje, že větší akumulace satelitní DNA na určitém místě, může výrazně navýšit frekvenci přestaveb daného chromosomu a potenciálně přispět i k reprodukčnímu oddělení druhu (Louzada et. al. 2020 a Adegá et. al. 2008).

Přesto, že většina informací o satelitních sekvencích pochází z výzkumu taxonů s monocentrickými chromosomy, v poslední době se zejména díky rozvoji sekvenačních metod a navazujících bioinformatických nástrojů podařilo nashromáždit i jisté množství poznatků o obecných vlastnostech satelitů u skupin s holocentrickými chromosomy jako jsou právě motýli. Většina známých satelitních sekvencí preferuje výskyt v heterochromatických oblastech genomu, což je velmi důležité právě u motýlů, disponujících silně heterochromatinizovaným chromosomem W (Věchtová et. al. 2016).

1.2.1 Klasifikace satelitů

Mluvíme-li o satelitech, či satelitní DNA, máme typicky na mysli dobře rozpoznatelné, opakující se sekvence nukleotidů uspořádané v tandemech. Takové tandemově uspořádané repetice, lze rozdělit do tří, popřípadě pěti velkých kategorií. Mikrosatelity představují nejkratší typ repetice, s délkou typicky do 5 bp. Vyznačují se vysokým počtem opakování a také vysokou variabilitou v tomto počtu, a to i v rámci jednoho biologického druhu. Minisatelity jsou druhou velkou kategorií, s několikrát delšími repeticemi, pohybujícími se kolem hodnoty 15 bp na délku. Poslední, a pro účely této práce nejpodstatnější, jsou satelity. Disponují nejdelšími repeticemi v řádu nižších stovek bází. Zároveň, na rozdíl od předcházejících dvou kategorií mají tendenci se shlukovat do velkých seskupení, takzvaných klastrů, jež mohou dosahovat délky blížící se až 100 Mbp (Charlesworth et. al. 1994).

Kromě tří základních typů satDNA rozlišujeme ještě tandemově se opakující geny a krypticky jednoduché repetice. Mezi tandemově se opakující geny patří zejména ty, s vysokou mírou exprese, které jsou v genomu zpravidla potřeba ve velkém množství kopií. Typickými příklady tandemově se opakujících genů mohou být ty, kódující pro produkci rRNA (viz. níže) anebo histonových proteinů. Krypticky jednoduché repetice jsou na rozdíl od všech ostatních, dříve uvedených kategorií netandemické, přítomné ve větší části genomu, a navíc většinou postrádají TA-obohacení. Existuje zároveň názor, že krypticky jednoduché repetice mohou být důsledkem přirozené organizace genomu spíše než vlastní

kategorií entit oddělitelných od okolní náhodně uspořádané sekvence. Dále se jimi zde tedy nebudeme zabývat. (Tautz 1993).

Ribosomální DNA, je příkladem jedné z nejčastěji studovaných tandemově se opakujících genů. Její distribuce je v zásadě podobná, jako u satelitních sekvencí v tom smyslu, že má tendenci tvořit detekovatelné klastry na některých chromosomech, nazývané regiony organizátora jádérka (nucleolar organiser regions čili NORs). Významným rozdílem mezi rDNA a většinou běžných satelitů však je, že v haploidním genomu daného druhu se jen zřídka vyskytuje více než dva NORs, přičemž počty mezi 4 a 11 byly zjištěny opravdu pouze výjimečně. Různý počet, a hlavně velikost NORs u různých druhů motýlů je navíc vodítkem k tomu, že tyto oblasti DNA se mohou v rámci genomu rozšiřovat či přemísťovat. Předpokládá se, že hlavním mechanismem šíření rDNA je ektopická rekombinace, nicméně tato hypotéza zatím nebyla významněji podpořena (Nguyen et. al. 2010).

1.2.2 Historie objevu satDNA

Vysoce repetitivní sekvence DNA, uspořádané v tandemech, byly poprvé objeveny a popsány na myších počátkem 60. let. Protože ze satelitní DNA se skládá podstatná část genomu některých organismů, může do jisté míry přispět k řešení takzvaného „Paradoxu hodnoty C“. Tento paradox v zásadě představuje otázku, proč velikost genomu organismů nevykazuje korelaci s jejich zdánlivou komplexitou. Satelitní sekvence DNA, ačkoli v tomto ohledu jistě podstatné, však samozřejmě nemohou být pokládány za příčinu paradoxu. Je nicméně známo, že obsah satelitů v genomech různých skupin organismů vykazuje mimořádně vysokou variabilitu, jež nutně nevypovídá o jejich ekologických vlastnostech ani taxonomickém postavení. Mezi živočichy se například obsah satelitních sekvencí pohybuje v rozmezí 0,5 až 50 %. Dokonce i v genomech blízké příbuzných druhů se může jejich obsah výrazně měnit. Kupříkladu u různých druhů rodu *Drosophila* se může jejich zastoupení lišit až o dva řády: Zatímco *D. erecta* disponuje pouze půlprocentním obsahem satDNA v genomu, u *D. virilis* tato hodnota dosahuje až 50 %. Octomilky tak představují plný rozsah variability v zastoupení satelitní DNA mezi živočichy, a to v rámci pouze jediného rodu (Garrido-Ramos 2017).

Satelitní DNA byla objevena metodou gradientu hustoty v kapalině (buoyant density gradient) a to již v době, kdy se teprve začínala používat. Při této metodě genomická DNA obvykle formuje během centrifugace vrstvičku, jejíž poloha závisí na podílu jednotlivých typů bází v sekvenci. Z toho vyplývá, že AT obohacené sekvence se usazují na mírně odlišné

hladině než zbytek genomu. Prokaryotní DNA, získaná z bakterií, vykazovala pouze jednotný, dobře ohraničený signál, zatímco DNA eukaryot, jež obsahuje právě AT obohacené repetice, zpravidla tvořila signál buďto s jedním velmi širokým nebo častěji se dvěma peaky. Sekundární peaky signálu byly nazvány „satelitní“. V pozdějších letech, kdy již s rozvojem sekvenčních metod bylo možno přesně určit složení takto pozorovaných sekvencí, se název přenesl na samotnou DNA a k té se od té doby typicky referuje jako k satelitní DNA (Tautz 1993).

První sekvence satelitní DNA, úspěšně izolovaná ze zástupce řádu Lepidoptera, se nazývá MBSAT1 a byla popsána u můry zelené (*Mamestra brassicae*, Linnaeus, 1758). Jedná se o repetici o velikosti 234 párů bází s navýšeným obsahem adeninu a thyminu. Podobně jako mnohé další satelitní sekvence, se i MBSAT1 vyskytuje ve shlucích, a to na obou pohlavních chromosomech můry. Satelitní sekvence je v genomu *M. brassicae* hojně rozšířena a zabírá zhruba 1,9 % jeho celkové délky. Díky zvýšenému obsahu AT bází, jež činí přibližně 60,7 % satelitu, není překvapivé, že oblasti výskytu MBSAT1 se překrývají s oblastmi heterochromatinu na obou zmíněných chromosomech. V tělních buňkách můry se satelit za normálních okolností netranskribuje (Mandrioli et. al. 2003), což s nejvyšší pravděpodobností souvisí právě s tendencí AT-bohatých sekvencí způsobovat heterochromatinizaci, případně s aktivním selekčním tlakem na potlačení přepisu kvůli potenciálním škodlivým efektům satelitního transkriptu (Ting et. al. 2011).

1.2.3 Uplatnění poznatků o satelitní DNA

Popis a znalost repetitivních sekvencí DNA jako jsou satelity či mikrosatelity může kromě mapování struktury genomu, nalézt uplatnění i v taxonomii, či při studiu genetické diverzity organismů. Na základě odlišností v uspořádání či délce repetice, popřípadě i na základě jednonukleotidových polymorfismů (single nucleotide polymorphism, SNP) v sekvenci jednotlivých monomerů, lze nalézt specifické poznávací znaky čili „markery“. S využitím těchto markerů je následně možné spolehlivě identifikovat různé druhy organismů, jejich poddruhy nebo populace, které by se jinými způsoby jen těžko odlišovaly. Tyto a podobné identifikační metody je samozřejmě možné aplikovat jak na živočichy, tak rostliny i další eukaryota (Soriano et. al. 2011).

I přes to, že satDNA je takzvaně nekódující a neobsahuje tedy informace k syntéze proteinů, může studium toho, za jakých podmínek a v jakém rozsahu je transkribována, významně přispět k našemu pochopení mnoha pochodů uvnitř buněk živých organismů (Kuhn 2015).

Satelitní sekvence se za normálních okolností v genomu živočichů téměř neexprimují a k úplnému, či alespoň dostatečnému potlačení jejich exprese je mnohdy zapotřebí několika překrývajících se mechanismů. I k tomuto pravidlu samozřejmě existují výjimky, ačkoli jsou velmi vzácné. Jednou takovou výjimkou je plicní tkáň dospělců a mnohé embryonální tkáně u myši (*Mus musculus*, Linnaeus, 1758). Buňky těchto tkání některé své satelitní sekvence exprimují, ačkoli zdaleka ne v množství, v jakém se to děje za patologických podmínek. RNA jednotlivých satelitů jsou navíc zcela odlišně posttranskripčně upravovány (Ting et. al. 2011).

Jakákoli výraznější exprese je naopak zcela bez výjimky příznakem chorobných změn dané buňky a nadměrnou expresí u jistých satelitních sekvencí lze pokládat za velmi spolehlivý indikátor, poukazující na rozvoj rakovinného bujení. U mnoha typů myší rakoviny dokonce množství transkriptu normálně potlačených satelitů dosahuje až 3600násobku transkriptů některých housekeeping genů. Co se týče lidských satelitních sekvencí, zdá se, že mechanismy pro jejich represi, stejně jako jejich náhlé „probuzení“ ve specifických liniích rakovinných buněk, je analogické k těm, pozorovaným u *M. musculus*, a to i přesto, že některé rodiny satelitní DNA jsou druhově specifické (Ting et. al. 2011).

2 Cíle práce

Vzhledem k tomu, že vysoce repetitivní části genomu mnohdy představují nemalý problém při jeho sestavování, není snadné získat o satelitech příliš mnoho nových informací (Věchtová et. al. 2016). Právě proto jsou jakékoli nové údaje o pozici satelitů v karyotypu druhu a potenciální odvození jejich případné funkční povahy velmi důležité a podnětné pro další studie. Snaha o rozšíření poznatků o konkrétních satelitech u druhu *Y. cagnagella* byla tedy i hlavní motivací pro výběr tématu této bakalářské práce.

V karyotypu motýlů se zpravidla nachází jen velmi málo heterochromatinu, jehož valná část je přítomna buďto na chromosomu W, tedy pouze v samicích, anebo v dalších oblastech bohatých na repetic jako jsou například terminální oblasti na koncích chromosomů (Carabajal Paladino et. al. 2019). I přes velký význam skupiny se však studiu satelitní DNA u motýlů do nedávna nevěnovalo příliš mnoho pozornosti. (Věchtová et. al. 2016)

Nicméně dobře známá distribuce heterochromatinu společně s obecnou tendencí satelitní DNA vyskytovat se hojně v heterochromatinizovaných oblastech genomu (Carabajal Paladino et. al. 2019), otevírá pro tuto práci zajímavou příležitost. Získání informací o distribuci některých známých satelitů na chromosomech předivky brslenové (*Yponomeuta cagnagella*, Hübner 1813), může v budoucnu pomoci při zkoumání jejich role v karyotypové evoluci.

Cílem této bakalářské práce je proto analýza distribuce tří různých satelitních sekvencí předem identifikovaných in silico v genomu studovaného organismu. Tyto satelitní sekvence jsou označeny Ycag_sat_cl11, Ycag_sat_cl24 a Ycag_sat_cl27 a doposud nebyla jejich pozice ani potenciální rozložení v genomu přesně známy. Za účelem vizualizace sledovaných satelitů bude připravena fluorescenčně značená sonda odpovídající sekvence. Tato sonda bude následně aplikována na chromosomální preparáty předivky při takzvané fluorescenční in situ hybridizaci (viz **kapitola 3.8**).

Určení polohy klastrů satelitní DNA v rámci karyotypu, může být v budoucnu prospěšné zejména pro navazující studie, zabývající se některou z mnohých potenciálních funkcí těchto zajímavých a donedávna zanedbávaných repetit.

3 Materiál a metody

3.1 Studovaný organismus

Vzorky tkáně použité pro izolaci DNA, stejně jako pro vytvoření chromosomálních preparátů pocházely z jedinců druhu *Yponomeuta cagnagella* (Hübner, 1813) z nizozemské populace. Housenky byly sbírány v Amsterdamu na jaře roku 2018 prof. Peterem Roessinghem (University of Amsterdam, Nizozemí). Všechny vzorky byly až do použití uchovány v mrazáku při teplotě -80 °C.

3.2 Izolace DNA

DNA byla izolována z larválních tkání zbylých po zhotovení chromosomálních preparátů, tj. larva bez střeva a gonád. Tyto byly po prudkém ochlazení tekutým dusíkem uchovávány v mrazáku při teplotě -80 °C do samotné izolace.

3.2.1 Izolace metodou CTAB

Pro získání genomové DNA byl použit protokol využívající hexadecyltrimethylamoniumbromid, zkráceně CTAB. Metoda je výhodná zejména proto, že umožňuje extrakci DNA o vysoké koncentraci i čistotě a v neposlední řadě při ní také nedochází k přílišnému narušení struktury, a tudíž je možné extrahovat i velmi dlouhé fragmenty DNA vhodné k dalšímu užití (Murray & Thompson 1980).

Izolace DNA probíhala podle protokolu adaptovaného z práce Winnepeninckx et. al. (1993). V krátkosti: tkáně jednoho jedince byly zality 2mL extrakčního pufru (100mM Tris HCl, 1,4 M NaCl, 40mM EDTA, 2% CTAB, 0,2% 2-merkapt ethanol, 0,1 mg proteináza K (Sigma-Aldrich), pH 8) a homogenizovány pomocí sterilní sady skleněných homogenizátorů s tloučky. Takto homogenizované vzorky byly poté inkubovány přes noc v extrakčním pufru při teplotě 37 °C za stálého a pomalého míchání.

Druhého dne bylo ke vzorkům přidáno stejné množství chloroformu a následovala centrifugace při maximálních otáčkách (13 400 rpm) při teplotě 4 °C a po dobu 10 min. Vodní fáze byla odebrána a uložena do nové zkumavky, načež bylo přidáno 10 µg RNázy A (Sigma-Aldrich) a následovala opět inkubace při 37 °C, tentokrát na 30 min. V dalším kroku se ke stávajícímu obsahu zkumavky přidaly ještě 2/3 objemu isopropanolu a směs byla ponechána při pokojové teplotě po dobu 2 nebo 2,5 hod, dokud nedošlo k vysrážení.

K oddělení sraženiny od supernatantu posloužilo další kolo centrifugace při 4 °C a maximálních otáčkách po dobu 15 min. Pelet byl poté promyt dvakrát studeným 70% ethanolem, a po oschnutí resuspendován v 50 µl vody. Aby došlo ke snadnějšímu rozpuštění, vzorky byly důkladně protřepány a skladovány v lednici při teplotě 4 °C.

Koncentrace získané DNA byla následně zjištěna pomocí přístroje Qubit 3.0 a absence zásadních kontaminantů jako např. proteinů či RNA byla ověřena pomocí spektrofotometru Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, USA).

3.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce, zkráceně PCR je proces, při němž dochází k mnohanásobné replikaci sekvence DNA sloužící jako templát. K ohraničení požadované sekvence se většinou využívá specifických oligonukleotidů zvaných primery, jež umožňují její preferenční amplifikaci (Guyer & Koshland 1989).

Klasická PCR využívající Taq (*Thermus aquaticus*) polymerázy, byla poprvé popsána a použita roku 1987. Využití tohoto enzymu oproti starší metodě zahrnující polymerázu z *Escherichia coli* přináší řadu výhod pramenících zejména z její termostability. PCR v této novější podobě, je například metodou nesmírně citlivou, schopnou amplifikace templátu vyskytujícího se v jediné kopii uvnitř vzorků s vysokou koncentrací jinak nežádoucích sekvencí DNA. Stejně tak umožňuje namnožení cílové sekvence o minimálně šest či sedm řádů v časovém horizontu, jež se typicky pohybuje v jednotkách hodin (Saiki et. al. 1988).

Primery pro jednotlivé satelity byly navrženy v programu Geneious Prime (verze 2023.0.2, Biomatters, Auckland, Nový Zéland) a syntetizovány firmou Generi Biotech s.r.o. (Hradec Králové, Česko). Ideální nasedací teplota různých primerů se lišila a byla zjištěna na základě doporučení výrobce a optimalizována experimentálně gradientem teplot v cykléru.

Příprava reakcí byla prováděna na ledu, reakční mix měl vždy objem 50 µl a skládal se z 1x One Taq reakčního pufru Quick-Load (New England Biolabs, USA), 25 U/ml One Taq DNA polymerázy Quick-Load (New England Biolabs), 0,2 µM obou primerů (viz **tabulka I**) a 0,2 mM směs obsahující každý ze čtyř nukleotidů. Jako templát bylo využito 20 ng genomové DNA nebo 5-10 ng v případě amplifikací již izolované sekvence) DNA.

Tabulka I: Přehled použitých primerů a jejich nasedacích teplot

Cílová sekvence	Veikost PCR produktu	Nasedací teplota	„Forward“ Primer (5'-3')	„Reverse“ Primer (5'-3')
Ycag_sat_cl24	661 bp	50 °C	CCTCCTTCAAGAAAA CAAAA	TTCAGGGTGAGAACT TATC
Ycag_sat_cl27	739 bp	49 °C	CAAAATTTTCACGTA GCTCT	ATGAAGCCGATTTTTG AATT
Ycag_sat_cl11	179 bp	-	Použity značené oligonukleotidy	

Program průběhu reakce v termocykléru byl zahájen denurací při teplotě 94 °C po dobu 5 minut (v případě prvotní izolace satelitu z genomické DNA) respektive 30 sekund (při amplifikaci již izolované sekvence). Nadále se již použitý program nelišil. Přístroj dále navázal 30 až 35 opakováními cyklu složeného z denaturace při 94 °C po 30 s, nasedání primerů při 49-50 °C (viz **tabulka I**) po 1 minutu a syntézy produktu při 68 °C taktéž po 1 minutu. Konečná fáze programu obnášela prodlouženou syntézu při 68 °C po dobu 5 minut.

3.4 Elektroforéza

K provedení elektroforézy bylo využito 1,5% agarózového gelu v 1xTAE pufru (40mM Tris, 20mM kyseliny octové a 1mM EDTA o pH 8). Byl použit velikostní standard PCR BIO Ladder I (PCR Biosystems, Velká Británie). K separaci fragmentů docházelo při napětí 70 V a po jejím dokončení byl gel obarven v roztoku ethidium bromidu o koncentraci 1 µg/ml. Gely byly dokumentovány pomocí UV fotodokumentačního zařízení.

Metoda elektroforetické separace byla využita k několika úkonům v zásadě kontrolního charakteru. Jednalo se konkrétně o kontrolu funkčnosti primerů, velikosti PCR produktů, efektivity Nick Translace a zjištění potenciální kontaminace RNA.

3.5 Klonování a sekvenace

Metodu klonování bylo zapotřebí provést za účelem pořízení vhodné sondy pro fluorescenční in situ hybridizaci (FISH), zatímco osekvenování produktu určeného ke značení posloužilo jako spolehlivá kontrola správného provedení tohoto kroku.

Prvním krokem klonování byla ligace PCR produktu specifických primerů do bakteriálního vektoru. PCR produkty byly nejprve přečištěny pomocí soupravy Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, USA) dle návodu výrobce. Následně byly ligovány do vektoru pGEM-T easy (Promega, USA). Složení ligační směsi o objemu 10 μ l bylo tedy 50 ng vektoru, 50 ng přečištěného PCR produktu a 3 U T4 ligázy v 1x ligačním pufru. Inkubace probíhala přes noc (zhruba 18 hodin) v lednici při teplotě 4 °C.

Vnesení plasmidů do kompetentních buněk bakterie *Escherichia coli* kmene DH5 α probíhalo přidáním 1,5 μ l produktu ligační reakce k 50 μ l suspenze buněk. Buňky byly předtím skladovány v mrazáku při teplotě -80 °C a před transformací byly rozpuštěny na ledu. Směs vzniklá přidáním ligačního mixu ke kompetentním buňkám byla nejprve inkubována 30 minut na ledu a poté podrobena tepelnému šoku při 42 °C po dobu 90 sekund. Následovalo dvouminutové ochlazení na ledě a přidání tekutého LB média o objemu 800 μ l. Buňky byly poté inkubovány zhruba 60 minut při 37 °C za mírného třepání.

Buňky byly vysety na Petriho misky s 1,5% bacto agarem (VWR Life Science, USA) v LB médiu (Duchefa Biochemie, Nizozemsko) s ampicilinem o finální koncentraci 100 μ g/ml, 0,35 mM IPTG (isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid) a 50 μ g/ml X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside) pro tzv. modrobílou selekci (Messing et. al. 1977) a kultivovány ve 37 °C do dalšího dne.

Pozitivní kolonie byly druhého dne přeneseny na nové sterilní Petriho misky s ampicilinem a LB agarem. Ve stejném kroku byly zároveň odebrány vzorky příslušných kolonií a použity jako templát pro PCR reakci. Agarové plotny s přeočkovanými bakteriemi byly inkubovány při 37 °C do dalšího dne. Misky s narostlými koloniemi byly zapečetěny parafilmem M a uchovány při teplotě 4 °C.

Po ověření pomocí PCR byly kolonie z předchozího kroku sterilně inokulovány do tekutého media. Bylo použito LB medium o objemu 3 ml s ampicilinem o finální koncentraci 100 μ g/ml. Inkubace probíhala po dobu zhruba 16 hodin při teplotě 37 °C a za stálého třepání o frekvenci 180 rpm. Po skončení inkubace byla z odstředěných bakterií izolována

plasmidová DNA pomocí kitu NucleoSpinPlasmid (Macherey-Nagel) dle protokolu výrobce. Byly vybrány dva klony od každého PCR produktu a použity k přípravě sekvenačních reakcí dle pokynů poskytovatele služby SEQme s.r.o. (Dobříš, Česko).

3.5.1 Srovnání výsledků s referenčními sekvencemi

Získané sekvence byly nejprve z obou stran oříznuty na základě kvality v programu BioEdit. Následně byla vytvořena konsensus sekvence, ve které byla pomocí online nástroje VecScreen (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) identifikována a poté v BioEditu oříznuta sekvence vektoru.

Posledním krokem bylo srovnání každého ze satelitů s referenční sekvencí, což bylo prováděno v programu Geneious Prime (verze 2003 0.2).

3.6 Příprava sond pro in situ hybridizace pomocí značení „nick translací“

Sondy pro fluorescenční in situ hybridizaci byly připravovány pomocí takzvané „nick translace“, při které dochází v molekule DNA k vytváření jedno-řetězcových zlomů díky aktivitě enzymu DNázy I. Jedno-řetězcové zlomy jsou poté rozpoznány DNA polymerázou I, která díky své exonukleázové aktivitě odstraní nukleotidy směrem ke 3' konci sekvence a syntetizuje nové vlákno, do kterého jsou inkorporovány značené nukleotidy (Rigby et. al. 1977).

Použitý reakční mix o objemu 40 µl se sestával z následujících složek: Mix dNTP obsahující každý ze čtyř nukleotidů (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) o finální koncentraci 0,5 mM s výjimkou dTTP, jež byl přítomen pouze v koncentraci 0,1 mM, 0,02 mM Cy3-dUTP (Jena Bioscience, Německo), 10 mM 2-merkptoethanol, 1x nick translation pufr (0,5M Tris-HCl, pH 7,5; 50 mM MgCl₂; 0,05% BSA (hovězí sérový albumin)), 20 U DNA polymerázy I (ThermoFisher Scientific, USA), 0,01 U DNázy I (ThermoFisher Scientific, USA) a 2 µg značené DNA amplifikované s pomocí polymerázové řetězové reakce (viz **kapitola 3.3**).

Značení probíhalo vždy po dobu 1 hodiny při teplotě 15 °C, což odpovídalo délce značeného úseku a délka výsledných fragmentů byla ověřena na gelu pomocí elektroforézy.

Reakce byla ukončována přidáním 4 µl 10x loading bufferu (250 mM EDTA, 5,9 mM bromphenol blue, 50% glycerol). Produkt reakce byl do dalšího použití uchováván v mrazáku při teplotě -20 °C.

Výše popsaným způsobem byly značeny sondy pro lokalizaci satelitů Ycag_sat_cl24 a Ycag_sat_cl27. V případě satelitu Ycag_sat_cl11 bylo jako sond použito dvou oligonukleotidů značených Cy3, jež dohromady tvořily celou délku zmíněného satelitu. Oligonukleotidy byly objednány od firmy Generi Biotech (Hradec Králové, Česko) a jejich sekvence byly následující:

5' GGTTTCATGTCATATTATAATTGATTTATTTAAAATACTTTAGAGTCTATGCAATCATAATTTTGCATTTCCAGCCTGTTAGAAATTCGT 3' a

5' TTTGCTGCAATACGTCGCCAGAAAGAACTCTGGAGAGATTTTCTCACAAATTTATTTGTCAGCTCCGCTTTTTCACAAAACTGAAT 3'

3.7 Chromosomální preparáty

Skříčka s chromosomálními preparáty mi byla pro účely této práce laskavě poskytnuta Petrem Nguyenem a až do použití uložena v mrazáku při teplotě -80 °C.

3.8 Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

Metoda fluorescenční in situ hybridizace byla v této práci využita k lokalizaci jednotlivých repetitivních sekvencí na chromosomech studovaného druhu. Skříčka s chromosomálními preparáty byla před zahájením samotné FISH podrobena dvěma typům předpůsobení.

První předpůsobení RNázou A má za cíl odstranit z preparátu RNA, jež by mohla ovlivnit výsledek hybridizace. Během něj dochází k inkubaci preparátu v roztoku RNázy A (200 µg/ml, Sigma-Aldrich, USA) 1 hodinu ve 37 °C a následnému omytí preparátů dvakrát po dobu 5 minut ve 2x SSC. Druhým užitým předpůsobením byla inkubace v 7x Denhartově roztoku o teplotě 37 °C, za stálého třepání po dobu 30 minut.

Denaturace probíhala 3 minuty a 30 sekund při teplotě 68 °C za použití 70% formamidu ve 2x SSC. Ihned po skončení denaturace bylo provedeno odvodnění etanolovou řadou (po 1 minutě ve studeném 70% a v 80% a 100% etanolu o pokojové teplotě). Následně byl aplikován hybridizační mix, který na každé sklo obsahoval 150 ng sondy značené fluorochromem Cy3 (viz kapitolu 3.5) společně s 25 µg komerčně dostupné sonikované DNA z lososa (Sigma-Aldrich, USA).

Před aplikací byl hybridizační mix přesrážen vysolením po přidání 1/10 objemu 3M octanu sodného a 2,5násobku absolutního etanolu. Vysrážená DNA byla centrifugována po dobu 20 minut při 14 000 rpm a 4 °C. Po odstranění supernatantu byl pelet promyt vychlazeným 70% etanolem a znovu 10 minut centrifugován za výše zmíněných podmínek. Získaný pelet

byl rozpouštěn v 10 µl 50% deionizovaného formamidu a 10% dextran sulfátu ve 2xSSC ve 37 °C po 30 minut. Vzniklá směs byla denaturována po dobu 5 minut při teplotě 90 °C, načež došlo k jejímu ochlazení na ledu.

Na každé sklíčko s denaturovaným preparátem bylo přidáno 10 µl hybridizačního mixu. Preparát byl zakryt krycím sklem o rozměrech 24x40 mm a jeho okraje utěsněny vrstvou lepidla na bázi kaučuku Fixogum (Marabuwerke GmbH, Německo). Sklíčka s preparáty byla takto inkubována po dobu 3 dnů při teplotě 37 °C.

Po uplynutí inkubační doby bylo lepidlo i s krycím sklem odstraněno a preparáty omyty v 1% Tritonu x-100 v 0,1xSSC po dobu 5 minut při 62 °C. Ihned nato byly přemístěny do 1% Ilfotolu (Ilford Photo, Velká Británie). Takto omyté preparáty byly obarveny DAPI (4'-diamidin-2-fenylindol) (Sigma-Aldrich, USA) v takzvaném „antifade“ založeném na DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]oktan) (1 µg/µl, taktéž Sigma-Aldrich, USA). Přebytečné DAPI v DABCO bylo po přikrytí krycím sklem vytlačeno a okraje zalakovány lakem na nehty. Dokončené a zalakované preparáty byly uloženy do mrazáku do teploty -20 °C.

3.8.1 Analýza výsledku FISH

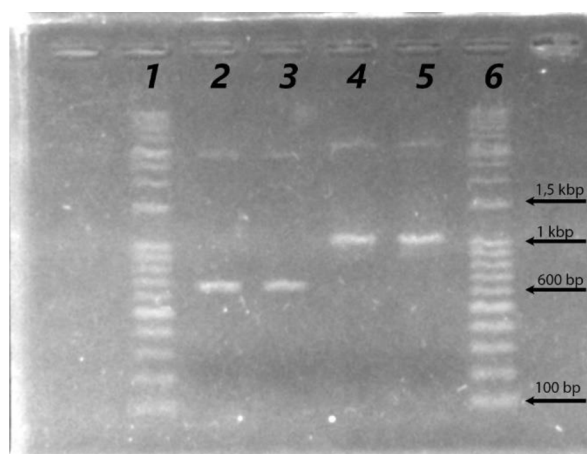
Vyhodnocení preparátů po in situ hybridizaci bylo prováděno na fluorescenčním mikroskopu Leica DM6 s přidruženou kamerou DFC 9000 a vybaveném softwarem LAS X. Pořízené černobílé snímky byly pseudo-obarveny a složeny v programu Adobe Photoshop CC 2019.

4 Výsledky

4.1 Výsledky kontroly elektroforézou

Elektroforéza byla v této práci využita k dokumentaci a kontrole výsledků PCR. Navržené primery byly použity k izolaci a amplifikaci cílových sekvencí zvolených satelitů a získané produkty byly poté podrobeny elektroforetické separaci, aby došlo ke změření jejich délky.

Elektroforéza probíhala na 1,5% agarózovém gelu a do každé z šesti jamek bylo nanášeno 5 μ l produktu či markeru (PCRBIO Ladder I). Snímek, zde prezentovaný jako **obrázek 2** zachycuje produkty PCR ověření sekvencí zaklonovaných do kompetentních bakteriálních buněk. K provedení PCR byly použity standardní primery M13. Jako templát sloužil přímo malý vzorek bakteriálních buněk odebraný při jejich přenášení na nové Petriho misky (viz **kapitola 3.5**).



Obrázek 2: Fotografie výsledku elektroforetického ověření délky cílové sekvence zaklonované do kompetentních buněk pomocí plasmidového vektoru. **1 a 6** - PCRBIOLadder I (PCR Biosystems, Velká Británie). Šipky na snímku označují velikost příslušných fragmentů použitého markeru. **2 a 3** – cílová sekvence zaklonovaná do kompetentních buněk, odpovídající Ycag_sat_cl24, amplifikovaná primery M13. **4 a 5** – cílová sekvence zaklonovaná do kompetentních buněk, odpovídající Ycag_sat_cl27, amplifikovaná primery M13.

Na **obrázku 2** si můžeme povšimnout, že fragment odpovídající satelitu Ycag_sat_cl24 se v podstatě shoduje s předpokládaným produktem PCR, který díky primerům M13 o něco

přesahuje délku cílové sekvence dlouhé 661 bp. Díky použití specifických primerů v pozdější amplifikaci byl tento rozdíl v připravovaných sondách eliminován. V případě satelitu Ycag_sat_cl27 je pozorovaný rozdíl větší a bude vysvětlen v následujícím oddílu.

4.2 Výsledky srovnání s referenční sekvencí

Sekvence získané od poskytovatele sekvenačních služeb (viz. **kapitola 3.5**) byly za pomoci programu Geneious Prime (verze 2023.0.2) porovnány s referenčními sekvencemi monomerů jednotlivých satelitů. Sekvence byly publikovány jako součást práce Volenikova et. al. (2022).

Jak již bylo naznačeno v **kapitole 4.1**, sekvence satelitu Ycag_sat_cl27 vyšla po prozkoumání elektroforézou poněkud odlišná od našeho očekávání. Totéž by se dalo říci i o její podobnosti referenční sekvencí, která činila 84,97 %. O něco lepší shody bylo dosaženo u satelitu Ycag_sat_cl24, kde podobnost referenční sekvence s výsledkem kontrolního sekvenování činila 97,81 % (viz **tabulka II**).

Tabulka II: Srovnání délek jednotlivých satelitů a jejich identity s referenční sekvencí

Satelit	Délka monomeru (bp)	Délka amplikonu (bp) ¹	Délka srovnávané sekvence (bp) ²	Identita s referenční sekvencí (%)
Ycag_sat_cl11 ³	179	-	-	-
Ycag_sat_cl24	706	661	657	97,81
Ycag_sat_cl27	780	739	925	84,97

1 – Délka očekávaného produktu amplifikace za použití specifických primerů. **2** – Délka sekvence obdržené po objednané sekvenaci a porovnávané s referenční sekvencí. **3** - Délka amplikonu, délka srovnávané sekvence ani identita s referenční sekvencí nejsou v případě satelitu Ycag_sat_cl11 k dispozici, protože jeho vizualizace probíhala s pomocí oligonukleotidů připravených na objednávku a nikoli autorem připravenou sondou.

Jak můžeme vidět v **tabulce II**, délka sekvence satelitu Ycag_sat_cl27, zjištěná sekvenací se poměrně značně lišila od délky námi předpokládaného amplifikačního produktu i od délky referenční sekvence. Tento rozdíl má pravděpodobně původ ve vlastnostech zkoumaného

satelitu. Délka monomeru referenční sekvence publikovaná v práci Volenikova et. al. (2022) byla predikována pro konsensus sekvence na základě analýzy programem RepeatExplorer a je tedy možné, že díky vnitřní variabilitě satelitu vyšel tento konsensus kratší než skutečná délka sekvence. Další potenciální vysvětlení by mohl představovat kratší satelit vmezeřený mezi monomery Ycag_sat_cl27.

Referenční sekvence monomerů jednotlivých satelitů studovaných v této práci, stejně jako sekvence získané po ověření, které byly vůči nim porovnávány jsou k vidění v **příloze I**.

4.3 Výsledky fluorescenční hybridizace in situ

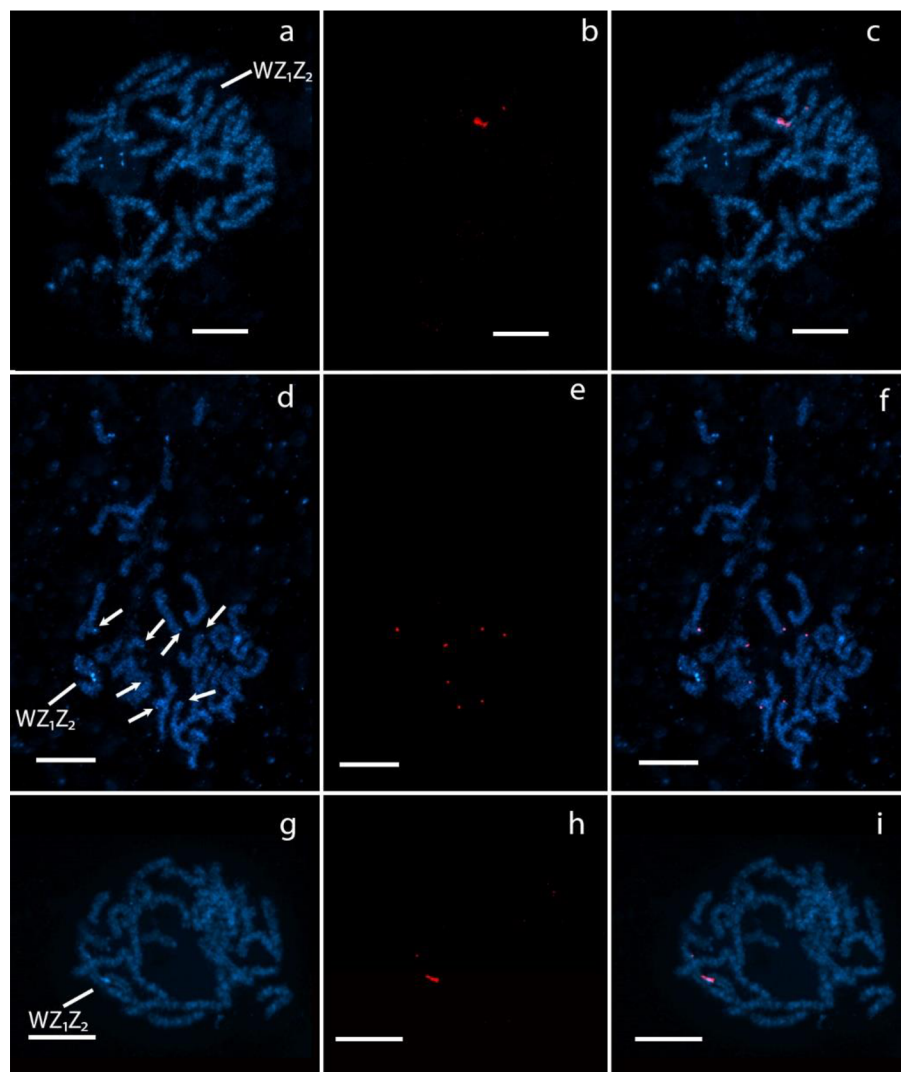
Fluorescenční in situ hybridizace (FISH) byla provedena za použití tří různých sond pro odhalení polohy tří zkoumaných satelitních sekvencí na chromosomech *Y. cagnagella*. První dvě sondy, použité pro satelity s označením Ycag_sat_cl24 a Ycag_sat_cl27, byly připraveny pomocí izolace příslušného satelitu z genomové DNA předivky prostřednictvím PCR (viz **kapitola 3.3**), zaklonovány do kompetentních bakterií (viz **kapitola 3.5**) a po opětovné extrakci značeny nick translací za použití Cy3. Naopak třetí satelit Ycag_sat_cl11 byl kvůli své malé délce detekován sondami syntetizovanými ve formě oligonukleotidů značených Cy3 od firmy Generi Biotech (Hradec Králové, Česko).

Výsledek fluorescenční hybridizace in situ je zde ukázán jako tabulka snímků pořízených dokumentačním zařízením použitého fluorescenčního mikroskopu (viz. **kapitola 3.8.1**)

Z **obrázku 3** je patrné, že námi použité sondy ukázaly lokalizaci satelitů Ycag_sat_cl27 a Ycag_sat_cl11 na chromosomu W (**obrázek 3a-c** a **3g-i** v tomto pořadí). Satelit Ycag_sat_cl11 navíc v případě některých jader vykazoval drobné signály v podobě jen obtížně viditelných teček v telomerických oblastech několika autosomů. Tyto signály však bývaly viditelné pouze sporadicky a k jejich prvnímu zaznamenání došlo na jádrech, která nevykazovala výrazný primární signál na chromosomu W.

Naproti tomu, satelit Ycag_sat_cl24 vykazoval distribuci na koncích některých chromosomů (viz **obrázek 3d-f**), která zároveň odpovídala výrazněji heterochromatickým lokalitám označeným na **obrázku 3d**. Které chromosomy v rámci karyotypu *Y. cagnagella* nesou tento satelit však nebylo možné z výsledků přesně určit. Je tomu tak proto, že autosomy předivky brslenové nevykazují v pachytenních a mitotických jádrech výraznou variabilitu co se týče velikosti a tvaru. S jistotou můžeme tedy říci pouze to, že se signály nenacházely na trivalentu pohlavních chromosomů.

Ze snímků zachycujících signál DAPI je dále patrné, že i satelity situované na chromosomu W vykazovaly kolokalizaci s regiony heterochromatinu. Tyto heterochromatinizované regiony zdá se nepokrývají celý chromosom W ale jen jeho část, což poukazuje na fakt, že se jedná o neo-pohlavní chromosom, který ještě neprodělal úplnou heterochromatinizaci a námi pozorované satelity jsou lokalizovány na jeho evolučně starší části.



Obrázek 3: Chromosomální preparáty z ovárií samic předivky při fluorescenční in situ hybridizaci. Signál vydávaný DAPI je zde reprezentován světle modrou, zatímco Cy3 červenou barvou. **a, d, g** – chromosomy barvené DAPI, chromosom W je vždy označen. **d** – drobné regiony heterochromatinu kolokalizující se signály satelitu Ycag_sat_cl24 označeny šípkami. **b** – hybridizační signál sondy, značené Cy3, navázané na satelitu Ycag_sat_cl27, **e** – signál sondy navázané na satelitu 24, **h** – signál sondy navázané na satelitu Ycag_sat_cl11. **c, f, i** – složené signály Cy3 a DAPI ukazující umístění satelitů na chromosomech. Měřítka na každém snímku odpovídá vzdálenosti 10 μm .

5 Diskuse

Tato bakalářská práce měla za cíl lokalizaci tří vybraných satelitních sekvencí předivky brslenové (*Yponomeuta cagnagella*, Hübner, 1813). Zvolené satelity nesou označení Ycag_sat_cl11, Ycag_sat_cl24 a Ycag_sat_cl27 a i když jejich sekvence byla již publikována dříve (Volenikova et. al. 2022), jejich distribuce na chromosomech předivky nebyla známa.

Za účelem analýzy distribuce zmíněných satelitních sekvencí byla zvolena metoda FISH (fluorescenční in situ hybridizace). Pro provedení této metody bylo nutné pořídit sondy s odpovídající sekvencí, z nichž dvě byly připravovány přímo a jedna dodána na objednávku od společnosti Generi Biotech (Hradec Králové, Česko).

Pro vyhodnocení polohy námi pozorovaných satelitů bylo nejprve nutné spolehlivě určit v karyotypu předivky pohlavní chromosomy, respektive chromosom W. Lokalizace chromosomu W by se za běžných okolností prováděla pomocí genomové in situ hybridizace (GISH). Tato metoda je založena na označení těch částí genomu, specifických pouze pro jedno pohlaví aplikací celogenomové sondy (v tomto případě samičí), společně s nadbytkem kompetitorové DNA z opačného pohlaví (Yoshido et. al. 2005). V našem případě bylo však možné identitu chromosomu W poměrně spolehlivě odhalit i v pachytenních jádrech podle chromomerového vzoru po obarvení DAPI (**obrázek 3 a, d, g**). Genom motýlů totiž typicky neobsahuje mnoho heterochromatinových oblastí, právě s výjimkou chromosomu W. Ten se tudíž na snímcích jeví jako dobře rozpoznatelný shluk výraznějšího barevného signálu (Cabral-de-Mello et. al. 2021).

U předivek navíc do hry vstupuje jejich zvláštní konfigurace pohlavních chromosomů. Jelikož W těchto drobných motýlů je neopohlavním chromosomem, nejen, že tvoří v pachytenním jádře trivalent, ale zároveň je jedna jeho část více heterochromatinizovaná a tudíž při barvení výraznější než druhá, vývojově mladší (Nilsson 1988).

Ycag_sat_cl27 byl již dříve analyzován v kvalifikační práci Pilíkové (2019), jejíž výsledky qPCR a Southernovy hybridizace ukázaly výrazné obohacení tohoto satelitu v genomu samic u dvou geografických populací *Y. cagnagella*. Tyto údaje byly potvrzeny lokalizací satelitu Ycag_sat_cl27 na chromosomu W (**obrázek 3a-c**). Na chromosomu W byl pak lokalizován i další satelit, Ycag_sat_cl11 (**obrázek 3g-i**). Distribuce satelitů Ycag_sat_cl27 a Ycag_sat_cl11 na chromosomu W tak přináší nové informace o lokalizaci satelitní DNA v genomech motýlů.

V minulosti byly satelity mnohokrát dokumentovány na chromosomu Y u druhů se samčí heterogamií, pro něž máme dnes v tomto ohledu také nepoměrně více informací než pro druhy s heterogamií samičí, jako jsou právě motýli (Ferretti et. al. 2020).

U zástupců řádu Lepidoptera byla u mnohých ze známých satelitů pozorována vysoká úroveň plasticity nejen z hlediska jejich zastoupení ale také pozice jejich jednotlivých klastrů v rámci genomu. Na druhé straně, na motýlím chromosomu W se až donedávna příliš mnoho satelitů zaznamenat nepodařilo (Cabral-de-Mello et. al. 2021). Vysvětlení tohoto nedostatku dat může spočívat i v tom, že kvůli vysokému obsahu repetice není chromosom W snadné při sekvenacích sestavit (Louzada et. al. 2020) a identifikace jednotlivých satelitů, nevykazujících významnou podobnost s těmi již známými, byla v nesestavených částech genomu obtížná až do příchodu pokročilejších bioinformatických nástrojů jako je například RepeatExplorer (Novák et. al. 2013).

Zejména důležitý je pro srovnání závěr, k němuž dospěli autoři práce Cabral-de-Mello et. al. (2021). I přesto, že jejich studie odhalila četné repetitivní sekvence lokalizované na chromosomu W, autoři zároveň uvádí, že totožnost těchto repetice nebyla uspokojivě vysvětlena a zřejmě se z větší části nejedná o satelity, ale o odlišný typ sekvencí, včetně mobilních elementů. Jejich závěry tedy přispívají k předpokladu, že i přes svou bohatost na repetice, chromosomy W zástupců řádu Lepidoptera neobsahují příliš velký podíl satelitní DNA. Na první pohled se tedy může zdát, že závěr studie je v rozporu se zde zjištěnou lokalizací satelitů Ycag_sat_cl27 a Ycag_sat_cl11.

I přesto, že dvě ze tří zde zkoumaných satelitních sekvencí byly lokalizovány na chromosomu W, na němž by se podle výše zmíněné studie nemělo nacházet těžiště výskytu satelitů v motýlím genomu, výsledky této bakalářské práce závěru autorů Cabral-de-Mello et. al. (2021) ani přímo neodporují. Vzhledem ke dříve zmíněné vysoké úrovni plasticity je samozřejmě možné, aby satelity u druhu *Y. cagnagella* vykazovaly poněkud jinou distribuci než u druhů zkoumaných ve výše popsané studii, navíc se pochopitelně jedná jen o dvě specifické sekvence, které byly na chromosomu W detekovány a tyto nemusejí nutně vypovídat o obecné tendenci všech satelitů u tohoto, ani příbuzných druhů.

U satelitu Ycag_sat_cl11 bylo navíc k výše zmíněné distribuci u některých jader možné zaznamenat slabé signály i v oblasti telomer. Na základě těchto pozorování sice nelze vynášet žádné definitivní závěry, můžeme nicméně spekulovat nad tím, že v telomerických

oblastech chromosomů *Y. cagnagella* se skutečně nachází malé, sekundární klastry satelitní sekvence Ycag_sat_cl11. Tyto byly detekovány pouze příležitostně, a to zejména pokud jádro nevykazovalo primární signál na chromosomu W. Tento slabý signál by v takovém případě bylo možno přičíst zejména jejich malé velikosti, protože se na snímcích jeví jako ostré, byť velmi drobné tečky. Vysvětlení současné absence primárního signálu na jádrech, kde byly tyto hypotetické sekundární klastry objeveny by pak mohlo spočívat v neúplnosti těchto jader. Pokud by totiž bylo příslušné jádro nějakým způsobem poškozeno a nebyl by tedy vidět silný signál, po použití delší expozice by zřejmě mohlo dojít k zachycení signálů původně nerozpoznaných.

Satelit Ycag_sat_cl24 vykazoval na rozdíl od svých výše uvedených protějšků distribuci v telomerických oblastech některých autosomů (viz **obrázek 3d-f**), na něž se sonda vážala velmi konzistentně. Také intenzita signálu se nijak dramaticky nelišila napříč jednotlivými pozorováními. I přesto je nutno zmínit, že se na některých jádrech počet chromosomů se signálem přece jen lišil, byť zmíněné odchylky nebyly časté a nezdály se tudíž být pro vyhodnocení zásadní. Bohužel vzhledem k absenci jiných markerů a relativně uniformnímu tvaru autosomů u *Y. cagnagella*, nebylo v této práci možné spolehlivě určit, které chromosomy v karyotypu disponují klastry satelitu Ycag_sat_cl24 a které nikoli, s výjimkou již naznačeného poznatku, že na pohlavních chromosomech signál pozorován nebyl.

Obecně vzato se u studované předivky v případě všech tří námi lokalizovaných satelitních sekvencí ukázal jejich výskyt v oblastech heterochromatinu. Tento vztah je patrný jak v případě satelitů Ycag_sat_cl27 a Ycag_sat_cl11, jejichž pozice na chromosomu W se řídila stupněm heterochromatinizace jeho příslušné části, tak i u klastrů Ycag_sat_cl24, jehož všechny pozorované signály kolokalizovaly s drobnými heterochromatinizovanými oblastmi příslušných autosomů (viz **obrázek 3d**).

Značná část satelitů v genomech jiných živočichů má tendenci kolokalizovat s oblastmi heterochromatinu. Klastry satDNA také snáze vznikají v oblastech chromosomů s nízkou úrovní rekombinace (Mondi et. al. 1988 a Stephan 1986).

V případě chromosomu W je tomu tak proto, že se u samic předivek, stejně jako u samic všech ostatních druhů z řádu Lepidoptera, vyskytuje tzv. achiasmatická meióza. To znamená, že během ní nedochází k rekombinaci a chromosom W, který existuje pouze v samicích, tedy nikdy nerekombinuje. To vede k hromadění repetitivních sekvencí, postupné erozi funkčních genů, delecím a k rozsáhlé heterochromatinizaci, potlačující i

expresi těch sekvencí, které ještě na chromosomu W přetrvávají (Mongue et. al. 2017). Lokalizace studovaných satelitů v heterochromatických regionech chromosomu W či v telomerických oblastech autosomů tak není překvapivé.

Polohu námi pozorovaných klastrů satDNA by mělo být v budoucnu možné dále ověřit analogickým experimentem u samců předivky. Tento experiment by zahrnoval opět fluorescenční in situ hybridizaci s použitím stejných sond na preparátech ze samčích testes. Výsledek tohoto experimentu by potvrdil námi zjištěné informace v případě, že by se satelity Ycag_sat_cl27 a Ycag_sat_cl11 nepodařilo detekovat vůbec nebo téměř vůbec. To by totiž znamenalo jejich lokalizaci výhradně na chromosomu W, který se v samčím karyotypu nevyskytuje. V případě umístění satelitu Ycag_sat_cl24 by naopak měl být výsledek v zásadě analogický k tomu, který pozorujeme v této práci, protože lokalizace satelitů vyskytujících se na autosomech by neměla být závislá na pohlaví. V případě, že by se výsledky podpořit tímto způsobem nepodařilo, tento navazující výzkum by tedy dal alespoň vzniknout podnětné diskusi o potenciální plasticitě v rozmístění tří zde zkoumaných satelitů.

Výsledky této práce by se tedy daly na závěr shrnout jako uspokojivé, byť poněkud limitované objemem získaných dat. Získané informace o postavení klastrů satelitní DNA se mohou nicméně v budoucnu ukázat jako přínosné například při studiích podobných té od Dalíková et. al. (2022), jež mají za cíl zhodnotit potenciální roli satelitů v reorganizaci genomu ve vztahu k rDNA, mobilním elementům nebo jiným funkčním a strukturním prvkům. Výzkumy tohoto typu zpravidla obnáší detekci studovaných sekvencí na chromosomech cílového organismu a výsledky této, či podobných prací mohou v takovém případě posloužit jako zdroj informací, anebo alespoň reference ke zjištěné poloze zkoumané sekvence.

6 Závěr

Analýza tří vybraných satelitních repetitivních sekvencí druhu *Yponomeuta cagnagella* (Hübner, 1813) pomocí metody fluorescentní in situ hybridizace si dala za cíl přispět k současným poznatkům týkajícím se distribuce a významu satelitní DNA u motýlů. I přes to, že řád motýli (Lepidoptera), je největší skupinou organismů vykazujících samičí heterogamii, studium chromosomu W, jenž se vyskytuje právě pouze u samic, přineslo do dnešních dnů v tomto ohledu jen poněkud neúplné informace. Tato bakalářská práce nicméně uspěla v alespoň malém rozšíření těchto poznatků. Bylo ukázáno, že dvě ze zkoumaných sekvencí, satelit Ycag_sat_cl27 a Ycag_sat_cl11 jsou lokalizovány na chromosomu W, zatímco třetí, Ycag_sat_cl24 v telomerických oblastech chromosomů. Tyto výsledky jsou konzistentní s dřívějšími poznatky o distribuci satelitních sekvencí jak u této, tak i jiných skupin živočichů.

7 Seznam použité literatury

- Adega F, Chaves R, Guedes-Pinto H (2008) Suiformes Orthologous Satellite DNAs as a Hallmark of *Pecari tajacu* and *Tayassu pecari* (Tayassuidae) Evolutionary Rearrangements. *Micron* 39(8):1281-1287. doi: 10.1016/j.micron.2008.03.004
- Cabral-de-Mello CD, 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*. 12:661417. doi: 10.3389/fgene.2021.661417
- Carabajal Paladino LZ, Provazníková I, Berger M, Bass C, Aratchige NS, López SN, Marec F, Nguyen P (2019) Sex Chromosome Turnover in Moths of the Diverse Superfamily Gelechioidea. *Genome Biology and Evolution* 11(4):1307-1319. doi: 10.1093/gbe/evz075
- Dalíková M, Provazníková I, Provazník J, Grof-Tisza P, Pepi A, Nguyen P (2022) The role of repetitive DNA in re-patterning of major rDNA clusters in Lepidoptera. *BioRxiv preprint*. doi: 10.1101/2022.03.26.485928
- Ferretti ABSM, Milani D, Palacios-Gimenez OM, Ruiz-Ruano FJ, Cabral-de-Mello DC (2020) High Dynamism for Neo-Sex Chromosomes: Satellite DNAs Reveal Complex Evolution in a Grasshopper. *Heredity* 125(3): 124-137. doi: 10.1038/s41437-020-0327-7
- Garrido-Ramos MA (2017) Satellite DNA: An Evolving Topic. *Genes*. 8(9): 230. doi: 10.3390/genes8090230
- Guyer RL, Koshland Jr DE (1989) The Molecule of the Year. *Science* 246(4937): 1543-1546. doi: 10.1126/science.2688087
- Heikkilä M, Mutanen M, Wahlberg N, Sihvonen P, Kaila L (2015) Elusive Ditrysian Phylogeny: An Account of Combining Systematized Morphology with Molecular Data (Lepidoptera). *BMC Evolutionary Biology*. 15:260. doi: 10.1186/s12862-015-0520-0
- Hoebeke ER (1987) *Yponomeuta cagnagella* (Lepidoptera: Yponomeutidae): A Palearctic Ermine Moth in the United States, With Notes on Its Recognition, Seasonal History, and Habits. *Annals of the Entomological Society of America* 80: 462-467. <https://doi.org/10.1093/aesa/80.4.462>
- Hora KH, Marec F, Roessingh P, Menken SBJ (2019) Limited Intrinsic Postzygotic Reproductive Isolation Despite Chromosomal Rearrangements Between Closely Related Sympatric Species of Small Ermine Moths (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Biological*

Journal of the Linnean Society. 128(1): 44-58. doi:
<https://doi.org/10.1093/biolinnean/blz090>

Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W (1994) The Evolutionary Dynamics of Repetitive DNA in Eukaryotes. *Nature*. 371(6494): 215-220. doi: 10.1038/371215a0

Kuhn GCS (2015) ‘Satellite DNA Transcripts Have Diverse Biological Roles in *Drosophila*’. *Heredity*. 115: 1-2. doi: 10.1038/hdy.2015.12

Lopez-Flores I, Garrido-Ramos MA (2012) The Repetitive DNA Content of Eukaryotic Genomes. *Genome Dynamics* 7:1-28. doi: 10.1159/000337118

Louzada S, Lopes M, Ferreira D, Adegas F, Escudeiro A, Gama-Carvalho M, Chaves R (2020) Decoding the Role of Satellite DNA in Genome Architecture and Plasticity—An Evolutionary and Clinical Affair. *Genes* 11(1):72. doi: 10.3390/genes11010072

Mandrioli M, Manicardi GC, Marec F (2003) Cytogenetic and Molecular Characterization of the MBSAT1 Satellite DNA in Holokinetic Chromosomes of the Cabbage Moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera). *Chromosome Research*. 11(1): 51-56. doi: 10.1023/a:1022058032217

Messing J, Gronenborn B, Müller-Hill B, Hofschneider PH (1977) Filamentous Coliphage M13 as a Cloning Vehicle: Insertion of a HindII Fragment of the Lac Regulatory Region in M13 Replicative Form In Vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74(9): 3642-3646. doi: 10.1073/pnas.74.9.3642

Meyrick E (1895) *A Handbook of British Lepidoptera*. Edward Meyrick. s 695–696. doi: handbookofbritis00meyr

Mondi WS, Fanning TG, Wayne RK, O’Brien (1988) Chromosomal Localization of Satellite DNA Sequences among 22 species of Felids and Canids (Carnivora). *Cytogenetics and Cell Genetics*. 48(4):208-213. doi: 10.1159/000132630

Mongue AJ, Nguyen P, Voleníková A, Walters JR (2017) Neo-sex Chromosomes in the Monarch Butterfly, *Danaus plexippus*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 7(10):3281-3294. doi: 10.1534/g3.117.300187

Murray MGG, Thompson WFF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8:4321–4326. <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>

- Nguyen P, Sahara K, Yoshido A, Marec F (2010) Evolutionary Dynamics of rDNA Clusters on Chromosomes of Moths and Butterflies (Lepidoptera). *Genetica*. 138:343–354. doi: 10.1007/s10709-009-9424-5
- Nilsson NO, Löfstedt C, Dävring L (1988) Unusual Sex Chromosome Inheritance in Six Species of Small Ermine Moths (Yponomeuta, Yponomeutidae, Lepidoptera). *Hereditas* 108(2): 259-265. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1988.tb00311.x>
- Novák P, Neumann P, Pech J, Steinhaisl J, Macas J (2013) RepeatExplorer: a Galaxy-based Web Server for Genome-Wide Characterization of Eukaryotic Repetitive Elements from Next-Generation Sequence Reads. *Bioinformatics* 29(6):792-793. doi: 10.1093/bioinformatics/btt054
- Pilíková, A., 2019: Analýza vybraných W obohacených repetitivních sekvencí u předičky brslenové *Yponomeuta cagnagella* (Lepidoptera). [Analysis of selected W-enriched repetitive sequences in the spindle ermine moth *Yponomeuta cagnagella* (Lepidoptera). Bc. Thesis, in Czech.] – 54 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Rigby PWJ, Dieckmann M, Rhodes C, Berg P (1977) Labeling Deoxyribonucleic Acid to High Specific Activity in Vitro by Nick Translation with DNA Polymerase I. *Journal of Molecular Biology*. 113(1): 237-51. doi: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(77\)90052-3](https://doi.org/10.1016/0022-2836(77)90052-3)
- Roessingh P, Hora KH, Fung SY, Peltenburg A, Menken SBJ (2000) Host Acceptance Behaviour of the Small Ermine Moth *Yponomeuta cagnagellus*: Larvae and Adults Use Different Stimuli. *Chemoecology* 10(1):41-47. doi: 10.1007/s000490050006
- Roessingh P, Xu S, Menken SBJ (2007) Olfactory Receptors on the Maxillary Palps of Small Ermine Moth Larvae: Evolutionary History of Benzaldehyde Sensitivity. *Journal of Comparative Physiology A* 193:635-647. doi: 10.1007/s00359-007-0218-x
- Sahara K, Yoshido A, Traut W (2012) Sex Chromosome Evolution in Moths and Butterflies. *Chromosome Research* 20(1):83-94. doi: 10.1007/s10577-011-9262-z
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988) Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* 239 (4839): 487-491. doi: <https://www.jstor.org/stable/1700278>

- Soriano JM, Zuriaga E, Rubio P, Llácer G, Infante R, Badenes ML (2011) Development and Characterization of Microsatellite Markers in Pomegranate (*Punica granatum* L.). *Molecular Breeding*. 27: 119-128. doi: <https://doi.org/10.1007/s11032-010-9511-4>
- Stephan W (1986) Recombination and the Evolution of Satellite DNA. *Genetics Research* 47(3):167-74. doi: 10.1017/s0016672300023089
- Tautz D (1993) Notes on the Definition and Nomenclature of Tandemly Repetitive DNA Sequences. *Experientia Supplementum*. 67:21-28. doi: 10.1007/978-3-0348-8583-6_2
- Ting DT, Lipson D, Paul S, Brannigan BW, Akhavanfard S, Coffman EJ, Contino G, Deshpande V, Iafrate AJ, Letovsky S, Rivera MN, Bardeesy N, Maheswaran S, Haber DA (2011) Aberrant Overexpression of Satellite Repeats in Pancreatic and Other Epithelial Cancers. *Science* 331(6017):593-6. doi: 10.1126/science.1200801
- Turner H, Lieshout N, Van Ginkel WE, Menken SBJ (2010) Molecular Phylogeny of the Small Ermine Moth Genus *Yponomeuta* (Lepidoptera, Yponomeutidae) in the Palearctic. *PLoS One*. 5(3):e9933 . doi: 10.1371/journal.pone.0009933
- 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*. 144:385-395. doi: 10.1007/s10709-016-9907-0
- Volenikova A, Nguyen P, Davey P, Sehadova H, Kludkiewicz B, Koutecky P, Walters JR, Roessingh P, Provaznikova I, Sery M, Zurovcova M, Hradilova M, Rouhova L, Zurovec M (2022) Genome Sequence and Silkomics of the Spindle Ermine Moth, *Yponomeuta cagnagella*, Representing the Early Diverging Lineage of the Ditrysian Lepidoptera. *Communications Biology*. 5(1): 1281. doi: 10.1038/s42003-022-04240-9
- Winnepenninckx B, Backeljau T, De Wachter R (1993) Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends in Genetics* 9(12):407. doi: 10.1016/0168-9525(93)90102-n
- Wolf KW, Novák K, Marec F (1997) Kinetic Organization of Metaphase I Bivalents in Spermatogenesis of Lepidoptera and Trichoptera Species with Small Chromosome Numbers. *Heredity*. 79(2): 135-143. doi: 10.1038/hdy.1997.136
- Yang M, Hu B, Zhou L, Liu X, Shi Y, Song L, Wei Y, Cao J (2019) First Mitochondrial Genome from Yponomeutidae (Lepidoptera, Yponomeutoidea) and the Phylogenetic Analysis for Lepidoptera. *ZooKeys*. 879: 137-156. doi: 10.3897/zookeys.879.35101

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: 193–202. doi: 10.1007/s00412-005-0013-9

8 Přílohy

Příloha I: Fasta formát studovaných sekvencí

Monomery zkoumaných satelitů

>Ycag_sat_cl11

```
GGTTTCATGTCATATTATAATTGATTTATTTAAAATACTTTAGAGTCTATGCAATCATAATTTTGCA  
TTTCCAGCCTGTTAGAAATTCGTTTTGCTGCAATACGTCGCCAGAAAGAACTCTGGAGAGATTT  
TTCTCACAAATTATTTGTCAGCTCCGCTTTTTCACAAAACTGAAT
```

>Ycag_sat_cl24

```
CGATAAGTTTCTCACCCCTGAACTGGATTGATTAAAAATAAAAAATAGAAACAAAAATACAAAA  
AACCTCCTTCAAGAAAACAAAACAAAAACACTCAATTCAAGCGAAAAAATTTGCGCCGGCGATT  
GAAAAGTGTATTCCGGATGGAAATCTATTGCCAAAAAAGGTAAAGGTTGATGTAATTTAGTCAGA  
TTTTAAGTGCTATAGGCGGCAAAAATTCGGTAATTTAGAGAAATTTAGAAAAAAATCCTCACCTG  
AGGACACACACAGCCAATCTTGTTGAAATTAATGTATTGTTATCGGCAAAAAACTCGAGAATTAG  
GGAAGATTTTCACCTCGGGACACACACTGTTTACTCTCGGTGCAACACGAATAGAGTGGCGGAGC  
GGCGTGCGGAGGTAGGTCCGCTTTGTTTCGAGTTGTGGGTAGGTGCGGTCGTCTGAGGAAGGGT  
AAAAAAGAAAGATTTTGAAGGTATTTTGAATAATTTGGCACGGAACCCTGAAAAATGTCTGGAA  
GCGCGGCTACCAAAGGCGCAGGAGCACTCCGCGGCGAGAACGGCGCGATCCCGGAGGCAGGCGG  
TCTGCGGTTGATTCCCGGCAATGAAAATTTGGAAAAGTGAAAATGTGAAAATTTTTACGTAGCT  
GGGTCCGGTCCCGTTTCCGACGTGCGATCCCTAACGAGGTACGACTTCACGAAAAAA
```

>Ycag_sat_cl27

```
CAGTGAGTATACCGATTGTAGCTTTATATATATACTAGGGGGTGAACCCCTGCGCGCTTAC  
GCGCGCAACCCCAAGCCGCTCCGAGCTTCGCTCTCCGCGGCGCTCGGCCTAGGGCCTCGCTAGA  
CACTTGACGTTGGGATTGTTTGAGTGGGAACATGTATGGTCTCGGCCTTCGGCCTCGGCCTGAACG  
GAGCTCGGCCTTCGGCCTCGCCGCGGCGAGGTTCCCTCATCCCGGCTTCGGCCTCGAAAAATTGTT  
ATTTGAAAAATTGTTCAATTTTGTAAAATTTTGTACTAAAAGTCGATTTTCAGTACAAATTCTCC  
ATACAAAATTTTCTCATTTTCAATCGTCGATATCTCGGCCGCCATCTTGAAATGTCAAATGTCCG  
ATTTTTCTCATATACCTGGGTCCTTTGACAACCCGATGCCGTTTAGGGCACGTCTCCAGCATGTGC  
CCAGTTGGCTGCCGACTTTTTTGCAGAGGTCGATTTTTCGGGCGGCCATATTCTCGCCCCTATTT  
TGAATTTGAAACGTTCAAATTTTTTTTTCACAATTAGATCACGAAACAAACAATTTCCAAATTT  
CATCCAAATCGGCCGGTAAACAAAAAAGTTGGCCATTTGTATAGGAGAACGCGTTTCGAAATTC  
AAAATCGGCTTCATAGGATGGCTGTAATTCATACATTTCTCACTTTCTCATACAAAATTTTCA  
CGTAGCTCTTACCGTTTCCGAGGAAACCTATAGATGATCAGTCAGTCAGTCAGT
```

Sekvence jednotlivých satelitů získané po ověření sekvenací

>Ycag_sat_cl24

CCTCCTTCAAGAAAACAAAACAAAACACTCGATTCAAGCGAAAAAATTTGCGCCGGCGATTTGA
AAAGTGTATTCCGGATGGAAATCTATTGCCAAAAAAGGTAAAGGTTGATGTAATTTGTTTCAGATT
TTAAGTGCTATAGGCGGCAAAAATTCGGTAATTTAGAGAAATTTAGAAAAAAATCCTCACCTGAG
GACACACACAGCCAATGTTGTTGAAATTAATGTACTGTTATCGGCAAAAAACTCGAGAATTAGGG
AAGATTTTCACCTCGGGACACACACTGTTTACTCTCGGTGCAACACGAATAGAGTGGCGGAGCGT
GCGCGAGGTAGGTCCGCTTTGTTTCGAGTTGTGGGTAGGTGCGGTCGTCTGAGGAAGGGTAAAAA
AGAAAGATTTTGAAGGTATTTTGAATAATTTGGCACGGAACCCTGAAAAATGTCTGGAAGCGCG
GCTACCAAAGGCGCAGGAGCACTCCGCGGCGAGAACGGCGCGATCCCGGAGGCGGGCGGTCTGC
GGTTCGATTCCCGGCAATGAAAGTTTGGAAAAGTGAAAATGTGAAAATTTTACGTAGCTGAGAC
GGCTCCCGTTTCCGAAGTGCGATCCCTAACGAGGTACGACTTCACGAAAAACGATAAGTTTCTC
ACCCTGAA

>Ycag_sat_cl27

TCAAATTTTTCAGTAGCTCTTACCGTTTCCGAGGAAACCTATAGATGATCAGTCAGTCAGTCAGT
CAGTCAGTGAGTATAACCGATTGCAGCTATATATATTAGTAACTAGGGGGTGAACCTCGGCCTGA
ACGCAGCTTCGCGCGCTTCAACCTCGCCAGCCGCGGTGTTCTGAGGCCTCGCTCTCCGCGGAGCT
CGGCCTACGGCCTCGCCAGATTCACCCATCTGACGTTGGCGATTGTTGCCTGAGTCGCCGAAAAT
GTACAGTCTCGGCCTTCGGCCTCGGCCTGAACGGAGATCGGCCTTCGGCCTCGCCGCGGGGGT
TCCTGGGGCCCGCTTCGCGGAGCTCGGCCTTCGGCCTCGCAAGTTTCTCCCACCTGGCTTTTGCCT
TGTTGCTTGTTCGCCGAAAATGTGTGGTCTCGGCCTTCGGCCTCGGCCTGAACGGAGCTCGGCCT
TCGGCCTCGCCGCGGCGAGGTTCTCATCCGACTTTGGACTCGAAAAATTGCTTTTTTGAAAAA
ATTCATCTTCGTTTAAAATTTTGTACTAAAAGTCGATTTTCAGTACAAATTCTCCATACAAAATTT
TCTCATTTTCAATCGTCGATATCTCGGCCGCCATCTTGAAATGTCAAATGTCCGATTTTTCTCATA
TACCTGGGTCCTTTGACTACCCGATGCCGTTTAGGGCACGTCTCCAGCATGTGCCAGTTGGCTGC
CGACTTTTTTTCGCGAGAGGTCGATTTTTCGGGCGGCCATATTCTCGCCCTATTTTGAATTCGAAC
GTTCAACATTTTTTTTACAATTAGATCACGAAACAAACAATTTCCAAATTTTCATCCAAATCGG
CCGGTAAACAAAAGAGTTGGCCATTTGTATAGGAGAAGGCGTTTCGAAATTCAAAAATCGGCTTC
AT