

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Analýza repetitivní DNA u bělásků rodu *Pieris*

Diplomová práce

Bc. Kristina Pinkrová

Školitelka: RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D.

České Budějovice 2023

Diplomová práce

Pinkrová, K., 2023: Analýza repetitivní DNA u bělásků rodu *Pieris*. [Analysis of repetitive DNA in white butterflies of the genus *Pieris*. Mgr. Thesis, in Czech.] – 51 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

In this master thesis I studied repetitive DNA in two species of white butterflies, *Pieris brassicae* and *P. napi*. The aim was to (i) analyse the possible variability of the W chromosome within the two species, (ii) analyse and map satellites and transposable elements and (iii) measure and analyse the genome size of these butterflies. My results indicate that there is only one type of W chromosome in each species. The results showed that five out of six localized repetitive sequences were found on the W chromosome. The results also showed differences in genome size between males of the same species with 5.6 % and 14.2 % difference between the smallest and largest genomes of *P. brassicae* and *P. napi*, respectively.

Finanční podpora

Tato práce byla financována z grantu prof. RNDr. Františka Marece, CSc. 20-13784S Grantové agentury České republiky a realizována v Laboratoři molekulární cytogenetiky na Entomologickém ústavu Biologického centra AV ČR.

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

České Budějovice, 8. 12. 2023

.....
Kristina Pinkrová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce Magdě Zrzavé za vedení a pomoc při vypracování praktické části. Dále bych chtěla poděkovat členům laboratoře, jmenovitě Atsuo Yoshidovi za cenné rady ke klonování, Marii Korchové za pomoc s odchytom a péčí o motýly, Frantovi Marecovi za odborné rady a pomoc s fylogenezí a všem ostatním za podporu a vlídná slova. Také chci velice poděkovat celé své rodině a přátelům, kteří mi dodávali sílu a podporovali mě, když to bylo nejvíce potřeba.

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Evoluce pohlavních chromozomů	1
1.2. Pohlavní chromozomy motýlů	2
1.2.1. Chromozom Z.....	4
1.2.2. Chromozom W	4
1.3. Repetitivní DNA.....	6
1.3.1. Satelitní sekvence	7
1.3.2. Mobilní elementy	9
1.4. Chromozomy motýlů	11
1.4.1. Bělásek zelný (<i>Pieris brassicae</i>)	11
1.4.2. Bělásek řepkový (<i>Pieris napi</i>).....	12
2. Cíl práce.....	13
3. Materiály a metody.....	14
3.1. Použitý hmyz.....	14
3.2. Příprava chromozomálních preparátů	14
3.3. Izolace DNA	15
3.4. Příprava sond pro CGH.....	16
3.5. CGH	16
3.6. Navržení primerů k satelitním sekvencím a mobilním elementům	17
3.7. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	18
3.8. Klonování	20
3.9. Značení satelitních sond pro FISH pomocí PCR a nick translace.....	21
3.10. Nepřímá FISH s amplifikací signálu	22
3.11. Prohlížení preparátů	23
3.12. Průtoková cytometrie	23
3.13. Anotace repetitivní DNA pomocí bioinformatických nástrojů.....	23

4.	Výsledky	24
4.1.	CGH	24
4.2.	Amplifikace vybraných sekvencí pomocí PCR.....	25
4.3.	Anotace repetitivní DNA	28
4.4.	Nepřímá FISH	29
4.5.	Velikost genomů.....	32
5.	Diskuze	34
5.1.	Složení chromozomu W	34
5.2.	Lokalizace satelitních sekvencí a mobilních elementů	35
5.3.	Velikost genomu.....	36
6.	Závěr.....	38
7.	Použité zdroje.....	39

1. Úvod

1.1. Evoluce pohlavních chromozomů

U většiny druhů živočichů a některých druhů rostlin je pohlaví jedince určeno geneticky, pomocí pohlavních chromozomů. Typicky je jedno pohlaví homogametické, jehož genom obsahuje dva stejné pohlavní chromozomy (XX, ZZ), a druhé pohlaví heterogametické, jehož jádro obsahuje dva odlišné pohlavní chromozomy (XY, WZ). U těchto jedinců je sexuální vývoj řízen genem určujícím pohlaví, který spouští kaskádu procesů, jež vedou k vývoji samčího či samičího pohlaví (Abbott, Nordén, Hansson, 2017). Tento typ se vyvinul během evoluce nezávisle mnohokrát, a dochází při něm k postupné degeneraci genů na chromozomu, který je pro heterogametické pohlaví unikátní (Y, W) (Bachtrog, 2006).

Obecně uznávaná je teorie, že pohlavní chromozomy se vyvinuly z páru autozomů. Evoluce tohoto páru v pohlavní chromozomy začala v okamžiku, kdy jeden chromozom z tohoto páru získal gen určující pohlaví pro samčí či samičí pohlaví (Charlesworth, 1996; Rice, 1996). Tento gen mohl vzniknout pomocí mutací, nebo být přenesen z jiného páru chromozomů, kdy se tento přesun nazývá "turnover" (Abbott et al., 2017; Wright et al., 2016). U živočichů s určením pohlaví pomocí pohlavních chromozomů Y a W se u tohoto genu následně začaly shromažďovat další geny výhodné pro toto pohlaví a pro druhé pohlaví nepotřebné. Pro tyto geny je výhodné, aby se do další generace přenášely společně, proto začala selekce v této oblasti chromozomu upřednostňovat určité náhodně vznikající přestavby (inverze), čímž bylo zamezeno rekombinaci během crossing overu (Beukeboom a Perrin, 2014; Charlesworth, Charlesworth, Marais, 2005). S přibývajícimi prospěšnými geny se i oblast s přestavbami začala zvětšovat, až zaujímala většinu chromozomu. Ztráta rekombinace a s ní spojená akumulace mutací způsobila postupnou degeneraci a ztrátu většiny genů na tomto chromozomu (Felsenstein, 1974; Charlesworth a Charlesworth 1978; Charlesworth a Charlesworth, 2000). Pomocí těchto procesů může dojít až k úplné ztrátě chromozomu Y nebo W, když se hlavní gen určující pohlaví přesune na jiný chromozom či je nahrazen genem novým a celý proces začne znovu (Charlesworth, 2005; Kaiser, Bachtrog, 2010). Tímto cyklem procházejí všechny pohlavní chromozomy druhů s chromozomálním určením pohlaví, ale u každého druhu se nacházejí v různé fázi.

Chromozom, který neprodělal tyto změny (X a Z), prochází vlastní evolucí. Tento chromozom se v heterogametickém pohlaví vyskytuje pouze v jedné kopii, tudíž každá recesivní alela, která se objeví na tomto chromozomu a dává heterogametickému pohlaví

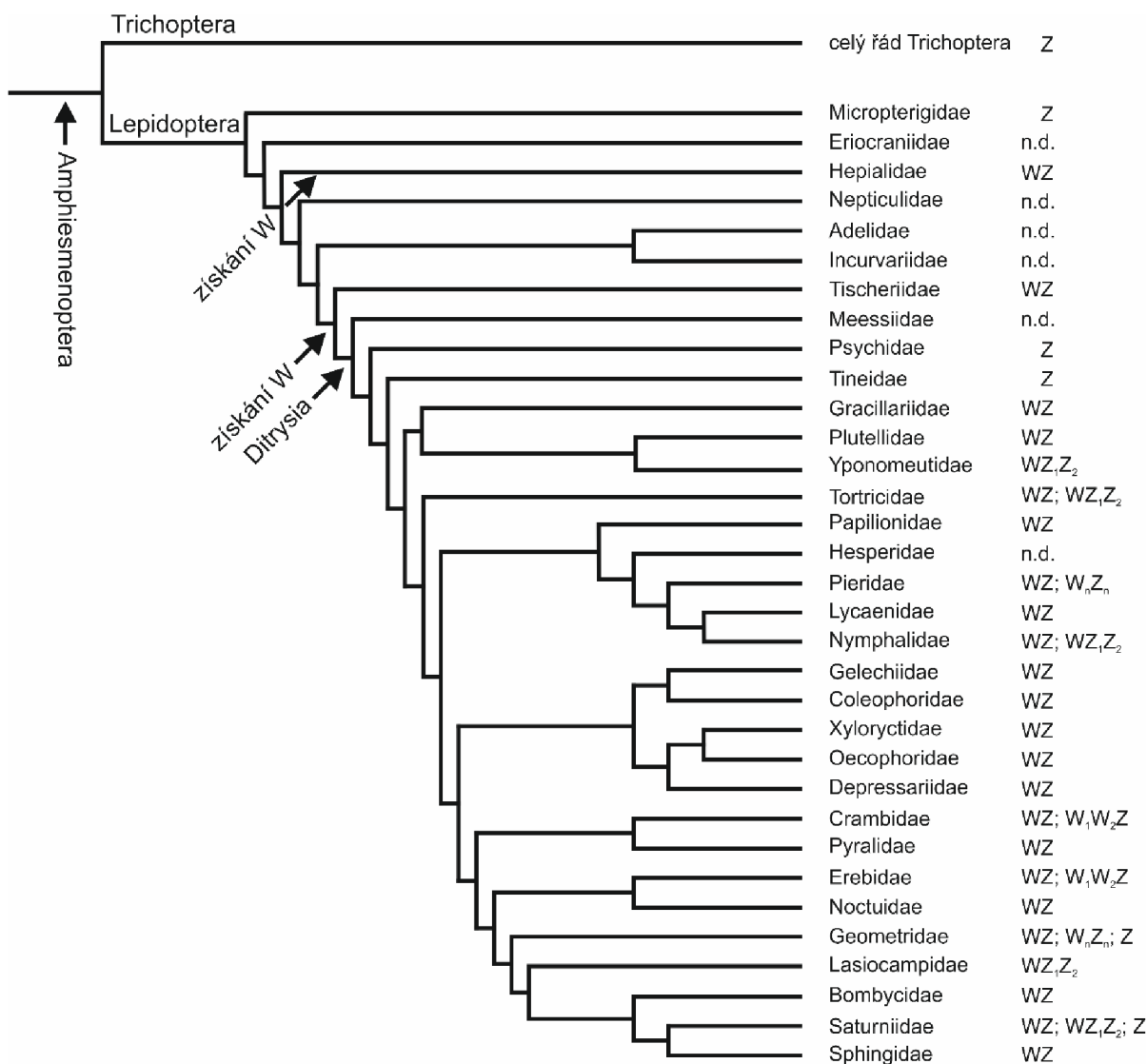
reprodukční výhodu, je ihned viditelná pro selekci. Současně se tyto chromozomy většinu své existence (2/3) vyskytují v homogametickém pohlaví, což dává selekci možnost na těchto chromozomech shromažďovat geny prospěšné pro pohlaví homogametické. Chromozomy X a Z tak neodráží pouze podobu autozomu, z něhož vznikly, ale mohou nést velké množství genů prospěšných jak pro samčí, tak i samičí pohlaví (Bachtrog, 2006; Rice, 1984).

Diferenciace mezi chromozomy X a Y (případně Z a W) a ztráta většiny funkčních genů na chromozomu Y (W) může být urychlována dalšími procesy, jako je Mullerova rohatka (Charlesworth, 1978; Muller, 1964), genetický hitchhiking (Rice, 1987) a selekce na pozadí (Charlesworth 1994).

1.2. Pohlavní chromozomy motýlů

U motýlů (řád Lepidoptera) a jejich blízkého příbuzného řádu chrostíků (Trichoptera) nalezneme chromozomové určení pohlaví s heterogametickými samicemi a homogametickými samci, stejně jako u ptáků či většiny hadů. Motýli jsou také největším taxonem s tímto určením pohlaví a společně s chrostíky a několika druhy dvoukřídlých (konkrétně z čeledi Tephritidae, Diptera) také jedinými zástupci hmyzu s tímto pohlavním určením (Bull, 1983; Bush 1966; Traut a Marec, 1996). Chromozomový systém s heterogametickými samicemi se označuje systém WZ/ZZ nebo Z0/ZZ v závislosti na přítomnosti chromozomu W (Traut, Sahara, Marec, 2007).

Za původnější konstituci se považuje Z0/ZZ, který nalezneme u chrostíků a bazálních motýlů. Systém WZ/ZZ se dnes vyskytuje u většiny druhů motýlu (viz Obrázek 1) a existuje několik teorií o jeho vzniku, konkrétně o vzniku chromozomu W. Jednou z nich je ta, že chromozom W vznikl fúzí původního chromozomu Z s autozomem (Traut a Marec, 1996; Traut a Marec, 1997; Yoshido, Marec, Sahara, 2005). Tuto hypotézu podporuje například to, že určení pohlaví s heterogametickými samicemi se u společného předka motýlů a chrostíků objevilo před více než 180 miliony let, zatímco chromozom W se u společného předka vyvinul přibližně až před 97 miliony let (Kristensen a Skalski, 1999; Grimaldi a Engel, 2005). Druhou teorií je, že chromozom W vznikl z chromozomu B (nadbytečný chromozom, vyskytující se pouze u některých jedinců v rámci druhu), který se začal párovat s chromozomem Z. Tuto teorii podporují některé studie chromozomů Z a W (Dalíková et al., 2017a; Fraisse, Picard, Vicoso, 2017).



Obrázek 1: Cytogeneticky potvrzené systémy pohlavních chromozomů mapované na fylogenezi řádu Lepidoptera (autor obrázku: prof. RNDr. František Marec, CSc.). Celková fylogeneze založená na práci Kawahara et al., 2019 a Mitter, Davis, Cummings, 2017. Fylogeneze nadčeledí s více než dvěma čeleděmi: Papilionoidea – Espeland et al., 2018; Gelechioidea – Sohn et al., 2016; Bombycoidea - Hamilton, St Laurent, Dexter et al., 2019. Zdroje pro určení chromozomových systémů: Trichoptera - Marec, Novák, 1998; Micropterigidae - Traut, Marec, 1997; Hepialidae - Kawazoe, 1987 a Voleníková, 2015; Tischeriidae, Tineidae, Gracillariidae, Plutellidae – Dalíková et al., 2017; Psychidae - Hejníčková et al., 2019; Tortricidae – Šíchová et al., 2013; Pieridae (W_nZ_n) – Šíchová et al., 2015; Lycaenidae – Kreklová, 2020; Nymphalidae (WZ; WZ₁Z₂) - Yoshido, Yamada, Sahara, 2006 a Smith et al., 2016; Gelechioidea - Carabajal Paladino et al., 2019; Noctuidae - Yoshido, Yamada, Sahara, 2006; Geometridae – Hejníčková et al., 2021; pro ostatní data a rodiny - Marec, Sahara, Traut, 2010.

Kromě standardního, hojně se vyskytujícího systému WZ/ZZ najdeme u motýlů i odvozenější systémy jako jsou W_1W_2Z/ZZ nebo $WZ_1Z_2/Z_1Z_1Z_2Z_2$. I u odvozenějších druhů motýlů však můžeme nalézt systém Z0/ZZ, kde se tento systém objevil díky druhotné ztrátě chromozomu W (Sahara, Yoshido, Traut, 2011).

Identifikace jednotlivých motýlích chromozomů byla řadu let velice problematická, protože tyto chromozomy mají stejný tvar i velikost, nemají primární konstriktce a dosud známé metody nebyly vyhovující (Wolf, 1996). Detailnější studie umožnil až vznik moderních technik jako je fluorescenční in situ hybridizace (FISH) či komparativní genomová hybridizace (CGH) a genomová in situ hybridizace (GISH) (Traut et al., 1999; Sahara et al., 2003a; Sahara et al., 2003b)

1.2.1. Chromozom Z

Molekulární struktura chromozomu Z je velice podobná konstituci autozomů a je konzervativní u všech druhů motýlů (Sahara, Yoshido, Traut, 2011). Genové složení chromozomů Z navíc není konzervativní pouze v rámci motýlů, ale i v rámci všech druhů ptáků (Nanda et al., 2008).

Zkoumáním minovníčka dubového (*Tischeria ekebladella*), klíněnky jírovcové (*Cameraria ohridella*), zářezníčka polního (*Plutella xylostella*) a mola šatního (*Plutella xylostella*) (Dalíková et al., 2017a) byla prokázána konzervativnost chromozomu Z v rámci skupiny *Heteroneura*, zkoumáním hrotnokřídlece chmelového (*Hepialus humuli*) a amerického hrotnokřídlece *Phymatopus californicus* byla prokázána konzervativnost u čeledi hrotnokřídlecovitých (*Hepialidae*) (Voleníková, 2015) a zkoumáním hrotnokřídlece salátového (*Triodia sylvina*), adély pestré (*Nemophora degeerella*), k. jírovcové, b. morušového a chrostíka *Limnephilus lunatus* (Fraisse et al., 2017) byla prokázána konzervativnost chromozomu nejen napříč několika čeleděmi motýlů, ale i s řádem chrostíků.

1.2.2. Chromozom W

Motýlí chromozom W často představuje největší a někdy i jediný blok heterochromatinu, který se v buňce vyskytuje. Tato konstituce naznačuje, že chromozom W je z velké části tvořen repetitivní DNA, která se během evoluce kumuluje na pohlavních chromozomech, které neprocházejí rekombinací (Kaiser a Bachtrog, 2010). Nejčastějším komponentem na chromozomu W jsou mobilní elementy, což bylo potvrzeno studií b. morušového, obaleče jablečného (*Cydia pomonella*) a zavíječe moučného (*Ephestia kuehniella*) (Abe et al., 2005; Fuková et al., 2007; Traut et al., 2013). Díky tomu je množství

kódujících sekvencí eukaryotických genů velmi malé a tyto sekvence nejsou mezi druhy sdílené (Gotter, Levine, Reppert, 1999; Van't hof et al., 2013; Kiuchi et al., 2014; Nagaraju et al., 2014; Fuijii et al., 2015). Repetitivní sekvence prodělávají velmi rychlou evoluci a stávají se tak hlavním motorem degenerace chromozomu W (Marec, 1996; Sahara et al., 2003a). Kromě mobilních elementů však k rychlému vývoji chromozomu W přispívá také samičí achiasmatická meióza neboli meióza bez crossing overu. Díky tomu degenerace chromozomu W začíná prakticky ihned po jeho vzniku (Traut, 1977).

Přestože některé informace o motýlím chromozomu W získané během let posloužily k lepšímu porozumění o evoluci tohoto chromozomu (Nguyen a Carabajal Paladino, 2016; Traut, Sahara, Marec, 2007), o jeho specifickém sekvenčním složení víme velice málo, a to z několika důvodů. Jedním z nich je fakt, že chromozom W je, jak už bylo zmíněno výše, z velké části tvořen repetitivní DNA, která tvoří velké heterochromatinové bloky. Rané platformy pro sekvenování genomu produkovaly krátká čtení a v této době ještě nebyly známy nástroje schopné z těchto krátkých úseků sestavovat úseky repetitivní DNA, což znemožnilo získávání informací o místech genomu bohatých na repetice, a tak se sekvenování soustředilo spíše na samčí genomy (Gasparotto et al., 2022). Dalším je, že na rozdíl od chromozomu Z, který je do značné míry konzervovaný i mezi málo příbuznými druhy motýlů, prochází chromozom W velice rychlou evolucí, což vede k velké variabilitě chromozomů W i mezi blízkými příbuznými druhy. Skutečnost, že i blízké příbuzné druhy mají velice odlišné sekvence na chromozomu W, byla prokázána pomocí CGH a Zoo-FISH u zavíječů: zavíječ *Cadra cautella*, zavíječ paprikový (*Plodia interpunctella*) a zavíječ voskový (*Galleria mellonella*) (Vítková et al., 2007), u skvrnopásníků: skvrnopásník angreštový (*Abraxas grossulariata*) a skvrnopásník jilmový (*Abraxas sylvata*) (Zrzavá et al., 2018) a také u travaříků: z. kukuřičný, zavíječ zimostřázový (*Cydalima perspectalis*) a travaříka *Diatraea postlineella* (Cabral-de-Mello et al., 2021).

Složení chromozomu W je stále neznámé, přesto na něm byly identifikovány některé satelity, mikrosatelity, mobilní elementy a ve výjimečných případech i klastry rDNA (Abe et al. 2005; Traut et al. 2013; Věchtová et al. 2016; Dalíková et al. 2017b; Zrzavá et al. 2018; Cabral-de-Mello et al. 2021). Konkrétně jsou dnes známy například různé transpozony, mikrosatelity a sekvence mitochondriální DNA z. moučného (Traut et al., 2013), LTR (dlouhé terminální sekvence) a non-LTR retrotranspozony o. jablečného (Fuková et al., 2007), LTR, non-LTR a DNA retrotranspozony b. morušového (*B. mori*) (Abe et al., 2005), dva transpozony travaříka *Diatraea saccharalis* (Gasparotto et al., 2022) a několik non-LTR a

LTR retrotranspozonů různorožce trnkového (*Peribatodes rhomboidaria*) (Hejníčková et al., 2023).

1.3. Repetitivní DNA

Genom eukaryot je velmi bohatý na sekvence, které nekódují proteiny, a tyto sekvence tvoří největší a zároveň nejméně prozkoumanou část genomové DNA. Tradičně se tyto sekvence rozdělovaly na sekvence uspořádané jako tandemové repetice a sekvence rozptýlené po celém genomu (Biscotti, Olmo, Heslop-Harrison, 2015; López-Flores, Garrido-Ramos, 2012). Tandemové repetice dále dělíme na satelity, minisatelity a mikrosatelity, které se od sebe liší nejen délkou opakující se sekvence a počtem opakování, ale také mechanismem vzniku (Šatović, Tunjić Cvitanić, Plohl, 2020). Druhou skupinu pak tvoří repetice rozptýlené po genomu, které vznikají jako výsledek transpozičních procesů, pomocí kterých se mobilní elementy dostávají do nových lokalit v genomu a během tohoto procesu mohou měnit jeho strukturu (Bennetzen J.L., Wang, 2014; Marsano R.M., Dimitri, 2022; Piacentini et al., 2014; Wells, Feschotte, 2020). Díky jejich obtížnému sekvenování a následnému sestavování v rámci genomu, se začaly více zkoumat až po nástupu speciálních bioinformatických nástrojů a sekvenování na dlouhou vzdálenost (Ahmad et al., 2020; Peona, Weissensteiner, Suh, 2018; Sedlazeck et al., 2018; Šatović, Tunjić Cvitanić, Plohl, 2020).

Všechny repetitivní sekvence, včetně satelitů a mobilních elementů (viz kapitola 1.3.1. a 1.3.2.) procházejí procesem tzv. concerted evolution, což je koncept, který předpokládá, že se monomery vyvíjejí společně a je mezi nimi nízká sekvenční variabilita. Je tomu tak díky řadě procesů nerekipročního přenosu DNA mezi chromozomy, jako jsou nerovnoměrný crossing over, genová konverze, skluz DNA polymerázy při replikaci, transpozice, výměna zprostředkovaná RNA (RNA-mediated exchange) a replikace pomocí valivé kružnice (rolling circle replication) (Šatović-Vukšić, Plohl, 2023). Výsledkem těchto procesů je homogenizace v oblasti repetice a následná fixace v sexuální populaci, tzv. molecular drive (Charlesworth et al., 1994; Dover, 2002; Elder, Turner, 1995; Smith, 1976; Stephan, 1986).

Repetitivní sekvence ztěžují skládání a anotaci genomu, tudíž byly řadu let ze sekvenování vynechávány. To se změnilo se sekvenováním nové generace (NGS), které umožnilo sekvenování dlouhých oblastí a způsobilo tak revoluci v metodách pro vyhledávání repetit. Bylo vyvinuto více než 50 bioinformatických nástrojů pro detekci tandemových opakování a současně vznikaly i veřejně přístupné databáze těchto repetit. Mezi známé databáze patří např. Human Genome Browser od UCSC (Kent et al., 2002), Dfam (Hubley et

al., 2016), Tandem Repeats Database (Gelfand et al., 2007) nebo STRBase (Ruitbertg et al., 2001). Většina těchto databází shromažďuje data získaná nejpoužívanějšími bioinformatickými nástroji jako je Tandem Repeats Finder (Benson, 1999) a RepeatMasker (Smit, 2015). RepeatMasker je nejčastěji používaným nástrojem pro identifikaci repetice v nově složeném genomu. Použití těchto nástrojů však není schopné odhalit veškeré repetice, díky statistickým chybám a nízké schopnosti předpovídat divergované repetice. K vyřešení těchto nedostatků se používá například program Tandem Repeat Annotation Library (Schaper et al., 2015), který výrazně zlepšuje anotaci a identifikaci repetice, které mohly být vynechány (Ahmad et al., 2020).

1.3.1. Satelitní sekvence

Satelitní DNA (satDNA) jsou až megabáze dlouhé sekvence tisíců tandemově se opakujících jednotek (monomerů), nejčastěji uspořádaných do dlouhých pásů, které tvoří značnou část eukaryotního genomu a také jsou hlavní složkou konstitutivního heterochromatinu (Garrido-Ramos, 2017; Plohl, Meštrović, Mravinac, 2017; Šatović Vukšić, Plohl, 2021). Ten se nejčastěji vyskytuje v pericentromerických a telomerických oblastech chromozomu (Charlesworth et al., 1994). Rostoucí množství studovaných druhů a data nasbíraná díky rozvoji sekvenačních metod a specializovaných bioinformatických programů odhalily ohromnou variabilitu v architektuře satDNA. Rozdíly nalezneme nejen v počtu a abundanci, ale také v distribuci v genomu, délce, asociaci s mobilními elementy a lokalizaci v heterochromatinu a/nebo euchromatinu (Šatović Vukšić, Plohl, 2021).

Satelity však nejsou pouze nefunkční bloky DNA tvořící heterochromatin. SatDNA se podílí na evoluci, funkci a utváření struktury chromozomu (Adega, Guedes-Pinto, Chaves, 2009; Louzada et al., 2020; Shatskikh et al., 2020; Slamovits et al., 2002; Thakur, Packiaraj, Henikoff, 2021). Tvoří nejčastější složku centromer a podílí se na stavbě centromerického chromatinu (Hartley, O'Neill, 2019; Plohl, Meštrović, Mravinac, 2014; Talbert, Henikoff, 2022). Dále se podílí také na segregaci chromozomů a meiotickém drivu (Henikoff, Ahmad K, Malik, 2001; Larracuenta, 2014). Pericentromerická satDNA zajišťuje vyšší organizaci jádra a přispívá k zachování integrity genomu (Podgornaya, 2022). Evoluce satDNA může také způsobit reprodukční izolaci a speciaci (Ferree, Barbash, 2009). I transkripce této DNA má svou funkci, například při tvorbě a udržování struktury heterochromatinu, udržování centromery a zachování stability genomu (Ahmad et al., 2020; Biscotti et al., 2015; Shatskikh et al., 2020). Nesprávná regulace transkripce satDNA může vést k abnormalitám ve stavbě

genomu, špatnému rozchodu chromozomů a chybám při gametogenezi (Lopes et al., 2023; Louzada et al., 2020).

Co se týče distribuce, mohou být satelity druhově specifické, jako např. u 542 bází dlouhého satelitu cvrčka dvojskvrnného (*Gryllus bimaculatus*) (Yoshimura et al., 2006), nebo mohou být sdílené mezi různě příbuznými druhy, jako je tomu u 180 bází dlouhého satelitu vyskytujícího se u *Drosophila ambigua*, *Drosophila tristis* a *Drosophila obscura* (Bachmann a Sperlich, 1993). Satelity vyskytující se v rámci jednoho jedince můžeme rozlišovat na satelity vyskytující se na některých či všech chromozomech, satelity chromozomově specifické, například centromerické sekvence u *D. melanogaster* (Bonaccorsi a Lohe, 1991) a satelity specifické pro pohlavní chromozom, například specifický satelitní blok na chromozomu X u mšic rodu *Megoura* (Bizzaro, Manicardi, Bianchi, 1996).

Výskyt velkých bloků heterochromatinu, ve kterém se nejčastěji vyskytuje satelitní DNA, je u motýlů ojedinělý a často omezený pouze na chromozom W. Tato skutečnost může být důvodem, proč bylo dosud nalezeno v genomu motýlů omezené množství satelitů (viz Tabulka 1) (Cabral-de-mello et al., 2021).

Tabulka 1: Přehled známých motýlích satelitů. Data: *TaqI* (Mahendran et al., 2006), Cp-SAT1 (Věchtová et al., 2016), MBSAT1 (Mandrioli et al., 2003), FR (Lu et al., 1994), PiSAT1 (Dalíková et al. 2017b), satelit předivky brslenové (Pilíková, 2019), DsaSat01 – DsaSat14 (Gasparotto et al., 2022), Cper-Sat01, Dpos-Sat01 a Dpos-Sat02 a Onub-Sat01– Onub-Sat04 (Cabral-de-Mello et al., 2021), CL04, CL26, CL183 a CL187 (Pinkrová, 2020), Lmar-SAT01 – Lmar-SAT04 (Trehubenko, 2023), CL94, CL175 a CL219 (Vajnarová, 2022)

Název satelitu	Místo výskytu	Druh
<i>TaqI</i>	autozomy	<i>Antheraea mylitta</i>
Cp-SAT1	autozomy	obaleč jablečný (<i>C. pomonella</i>)
CL04	autozomy	bělásek zelný (<i>Pieris brassicae</i>)
CL183	autozom	bělásek zelný (<i>P. brassicae</i>)
CL175	autozomy	píďalka podzimní (<i>Operopthera brumata</i>)
MBSAT1	chromozom W	můra zelná (<i>Mamestra brassicae</i>)
FR	chromozom W	blýskavka kukuřičná (<i>Spodoptera frugiperda</i>)
PiSAT1	chromozom W	zavíječ paprikový (<i>P. interpunctella</i>)
satelit	chromozom W	předivka brslenová (<i>Yponomeuta cagnagella</i>)
DsaSat01 – DsaSat14	chromozom W	travařík <i>D. saccharalis</i>
Cper-Sat01	chromozom W	zavíječ zimostřázový (<i>Cydalima perspectalis</i>)
Dpos-Sat01 Dpos-Sat02	chromozom W	travařík <i>D. postlineella</i>
Onub-Sat01 – Onub-Sat04	chromozom W	zavíječ kukuřičný (<i>Ostrinia nubilalis</i>)
CL187	chromozom W	bělásek řepkový (<i>Pieris napi</i>)
CL26	autozomy a chromozom W	bělásek zelný (<i>P. brassicae</i>)
Lmar-SAT01 – Lmar-SAT04	autozomy a chromozom W	skvrnopásník lískový (<i>Lomaspilis marginata</i>)
CL94 a CL219	autozomy a pohlavní chromozom (neurčeno, zda W či Z)	píďalka podzimní (<i>Operopthera brumata</i>)

1.3.2 Mobilní elementy

Důležitou kategorií repetitivní DNA jsou mobilní elementy (ME). To jsou úseky repetitivní DNA, které jsou roztroušené po genomu a mají vysokou frekvenci opakování. Stejně jako ostatní repetitivní sekvenční (např. satDNA) se mohou častěji vyskytovat ve specifických chromozomových oblastech, především v heterochromatinu, a vytvářet tak

důležitou organizační a funkční jednotku genomu (Biscotti et al., 2015; Charlesworth et al., 1994; López-Flores a Garrido-Ramos, 2012).

Mobilní elementy jsou úseky, které jsou schopné se v genomu pohybovat a vkládat se na jiná místa v genomu. Přestože je tato schopnost pro ME typická, velká část z nich v genomu setrvává na jednom místě jako relikty, které již nejsou schopné se přesouvat (Mills et al., 2007). V závislosti na způsobu přenosu se ME dělí na DNA transpozony a retrotranspozony. Zatímco DNA transpozony se z DNA vyštěpí a vloží jinde, retrotranspozony se v genomu přesouvají pomocí RNA transkriptu. Retrotranspozony dále dělíme na LTR a non-LTR elementy. Mezi non-LTR elementy patří například LINE (long interspersed nuclear elements = dlouhé rozptýlené jaderné elementy) a SINE (short interspersed nuclear elements = krátké rozptýlené jaderné elementy), které se hojně vyskytují v centromerických a pericentromerických oblastech a zaujímají asi 30 % lidského genomu (Makałowski, Pande, Makałowska, 2019).

Důležitou roli mají ME také v evoluci a diferenciaci pohlavních chromozomů a mohou mít vliv na tvoření a ničení genomu. Na ničení genů se podílí především vkládáním do funkčních genů či jejich promotorů, čímž ovlivňují jejich funkci, což může vést až ke snížení fitness a řadě onemocnění (Ostertag a Kazazian, 2001). Na druhou stranu domestikací genů mobilních elementů vznikly důležité proteiny jako RAG, který se podílí na rekombinaci imunoglobulinových genů (Fugmann, 2010), nebo telomeráza, která udržuje chromozomové konce (Belford, Curcio, Lued, 2011). Navíc se mohou ME podílet na expanzi genomu a speciaci, například retrotranspozon LINE-1 může snižovat genovou expresi a poskytovat nové exony pro protein kódující geny (Kazazian, 2004). Mobilní elementy mohou pomáhat formovat genom a ovlivňovat tvorbu pohlavních chromozomů, což může vést až ke speciaci či pohlavnímu dimorfismu (Dechaud et al., 2019).

Akumulace ME v určité oblasti vede k formování heterochromatinu, což do této oblasti přitahuje ještě více ME, protože některé z nich preferují umlčené úseky pro své vložení (Zhu et al., 2003). Ke shromažďování ME a satDNA v oblastech heterochromatinu dochází nejen u motýlů, ale i u rostlin (Kejnovský et al., 2009), hub (Hood, 2005), lidí (Erlandsson, Wilson, Pääbo, 2000), jiných savců (Toder, Wakefield, Graves, 2000), ptáků (Peona et al., 2021), octomilek (Junakovic et al., 1998), brouků (Rosolen, Vicari, Almeida, 2019) a dalších druhů (Śliwińska, Martyka, Tryjanowski, 2016).

Jak už bylo zmíněno výše, ME se vyskytují i u motýlů. U *D. saccharalis* tvoří ME 39,18 % genomu samců a až 41,35 % genomu samic (Gasparotto et al., 2022). U b. morušového a *Bombyx mandarina* jsou retrotranspozony dokonce hlavní složkou chromozomu W (Abe et al., 2005; Abe et al., 2002)

1.4. Chromozomy motýlů

Motýlí jsou nesmírně rozmanitý řád hmyzu s více než 160 000 druhy (Van Nieuwerkerken et al., 2011). Motýlí chromozomy jsou malé a uniformní bez morfologických značek jako jsou centromery. Takové chromozomy se nazývají holokinetické a standardním počtem je u motýlů $2n = 60-62$ (Lukhtanov, 2000; Robinson, 1971b; Traut et al., 2007; Sahara et al., 2011). Chromozomální přestavby jako fúze, štěpení a inverze však u řady druhů způsobily dynamický vývoj karyotypu a tím i rozdílný počet chromozomů (Hill et al., 2019; Lukhtanov, 2015; Marec et al., 2001; Sahara et al., 2007; Sahara et al., 2012; Šíchová et al., 2015; Yasukochi et al., 2006). K těmto přestavbám došlo u podrodu modrásků *Agrodiaetus sp.* s $n = 10-134$ (Kandul, Lukhtanov, Pierce, 2007), rodu modrásků *Lysandra sp.* s $n = 24-93$ (Talavera et al., 2013), rodu *Godyris sp.* s $n = 13-120$ (Brown et al., 2004) a u čeledi běláskovitých *Pieridae* s $2n = 51-208$ (Gasparotto et al., 2022). Kromě různého počtu chromozomů byla u běláskovitých nalezena řada rozdílných systémů s více pohlavními chromozomy např.: $W_{1-3}Z_{1-4}/Z_{1-4}Z_{1-4}$, $W_{1-3}Z_{1-3}/Z_{1-3}Z_{1-3}$, $W_{1-4}Z_{1-4}/Z_{1-4}Z_{1-4}$ a $W_{1-3}Z_{1-6}/Z_{1-6}Z_{1-6}$ (Šíchová et al., 2015; Šíchová et al., 2016; Yoshido et al., 2020).

Data ze sekvenování pomocí dlouhých čtení odhalila rozsáhlé chromozomální přeuspořádání bloků chromatinu u bělásky řepkového (*Pieris napi*) (Hill et al., 2019) a dvě nezávislé práce na sekvenování genomu bělásky řepového (*Pieris rapae*) našla mnoho podobných přestaveb genomu i u tohoto druhu, což naznačuje, že by mohly být tyto reorganizace přítomné i u dalších bělásků rodu *Pieris* (Nallu et al., 2018; Shen et al., 2016). Tento fakt společně s výše zmíněným rozdílným počtem chromozomů u této čeledi a skutečností, že u b. zelného nalezneme velké heterochromatinové bloky i na autozomech (Nguyen et al., 2010), jsou důvody, proč byli ke studiu vybráni právě bělásci.

1.4.1. Bělásek zelný (*Pieris brassicae*)

Bělásek zelný je velký bělokřídý motýl, známý především jako škůdce brukvovitých rostlin. Tento druh můžeme nalézt v severní Africe, Evropě a Asii (Hill, 1987) odkud se roku 1995 rozšířil na ostrov Hokkaido (Japonsko) a do jižní Afriky (Tanaka et al., 2007). Počet chromozomů v jádře v haploidním stavu je $n = 15$ (Beliajeff, 1930; Bigger, 1960; Doncaster,

1912; Lorković, 1941; Robinson, 1971a). Tento druh je zajímavý tím, že oproti většině zástupců řádu motýlů u něj nalezneme velké heterochromatinové bloky na autozomech (Nguyen et al., 2010). Podle sekvenování má genom tohoto běláška velikost 292 Mbp (Lohse, 2021) a je k dispozici i chromosome level assembly.

1.4.2. Bělásek řepkový (*Pieris napi*)

Bělásek řepkový je malý bělokřídý motýl původně se vyskytující od západní Evropy až do východní Asie a Japonska (Eitschberger, 1984). V haploidním stavu má počet chromozomů $n = 25$ (Federley, 1938; Lorković, 1941; Bigger, 1960). Podle sekvenování je jeho genom velký 299 Mbp (Nallu et al., 2018) nebo 320 Mbp (Lohse, Hayward, Ebdon, 2021) a je k dispozici chromosome level assembly.

2. Cíl práce

Studium na běláscích rodu *Pieris* bylo prováděno již během mého bakalářského studia, kdy byla odhalena struktura a tvar chromozomu W u běláška zelného, běláška řepkového a běláška řepového a malé množství satelitních sekvencí vyskytujících se ve větší míře v heterochromatinu chromozomu W. V této práci jsem se pokusila poznatky o běláscích rodu *Pieris* prohloubit.

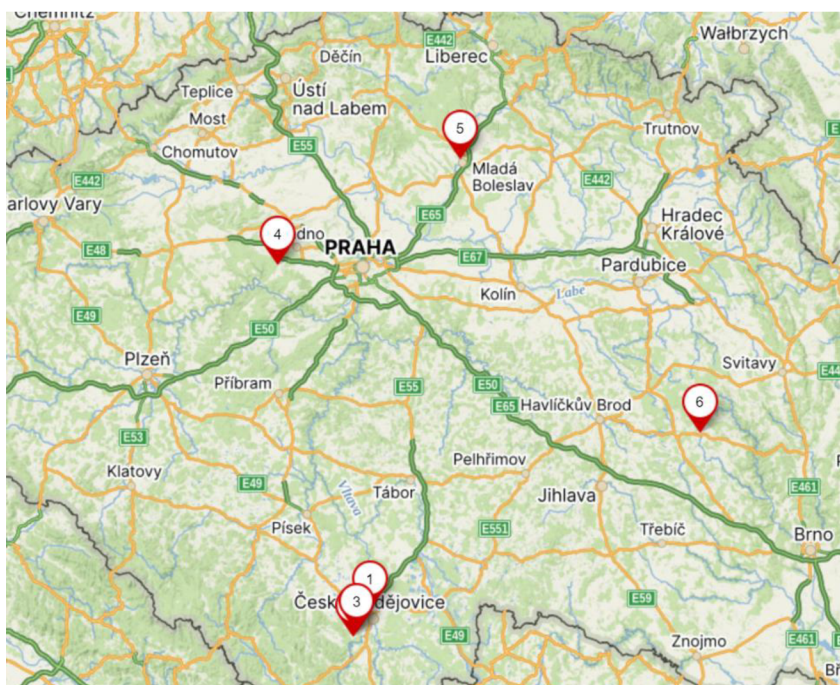
Cílem této práce bylo:

1. Zjistit, zda se u b. zelného a b. řepkového vyskytuje vnitrodruhová variabilita chromozomu W.
2. Analyzovat a lokalizovat na těchto druzích vybrané satelitní sekvence a mobilní elementy.
3. Změřit velikosti genomů vybraných druhů a zjistit, zda je velikost genomu u jedinců stejného druhu variabilní.

3. Materiály a metody

3.1. Použitý hmyz

Vajíčka a housenky b. zelného byly nasbírány z listů růžičkové kapusty a bílého zelí na zahradě rodinného domu v Novém Městě na Moravě. Dospělé samice obou druhů byly chytány v okolí Českých Budějovic a Nového Města na Moravě. Samice byly nechány v plastových krabičkách naklást při pokojové teplotě. Jako živná rostlina byla použita barborka obecná (*Barbarea vulgaris*) a bílé zelí. Dospělí samci obou druhů byli nachytáni na stezce u řeky Vltavy v Českých Budějovicích, na louce u Vrábče (okres České Budějovice), v okolí Lhoty (okres Kladno), v okolí Mladé Boleslavi a na louce Dvůru Koroseky (okres České Budějovice).



Obrázek 2: Lokality nálezů b. zelného a b. řepkového. 1 – České Budějovice, 2 – Vrábče, 3 – Dvůr Koroseky, 4 – Lhota, 5 – Mladá Boleslav, 6 – Nové město na Moravě

3.2. Příprava chromozomálních preparátů

K přípravě chromozomálních preparátů byla použita ovaria z larev housenek posledního instaru. Ovaria byla pitvána ve fyziologickém roztoku a po vyjmutí z larvy byla přemístěna do fixačního roztoku Carnoy (6:3:1 = ethanol – 99 %: chloroform: kyselina octová – 99,5 %) a fixována 15 minut. Během této doby bylo připraveno podložní sklo (Superfrost, Menzel – Gläser, Německo) tak, že bylo ponořeno do kyselého ethanolu (roztok 1% HCl v 96% ethanolu) a následně vyleštěno savým papírem. Na takto ošetřené podložní sklo do

kapky 60% kyseliny octové (20 µl) byla ovaria přenesena a macerována pomocí wolframových jehel. Po úplném rozpuštění tkáně bylo podložní sklo přesunuto na ploténku vyhřátou na 42 °C. Rovnoměrným posouváním kapky byl materiál rozprostřen po skle až do téměř úplného vysušení. Zbývající množství (1/3 až 1/4 z původní velikosti) bylo odstraněno sklepnutím. Všechny vytvořené preparáty byly následně odvodněny pomocí ethanolové řady (70 %, 80 % a 100 %) a uskladněny v mrazáku při -20 °C. Zbytky těl byly zmrazeny tekutým dusíkem a uschovány pro izolaci DNA při -20 °C (Traut, 1979; Sahara, Marec, Traut, 1999).

3.3. Izolace DNA

K izolaci byla využita metoda celogenomové extrakce DNA pomocí hexydecyltrimethylammonium bromidu (CTAB) (Winnepenninckx, Backeljau, Wachter 1993). Smícháním všech složek uvedených v Tabulce 2 byl vytvořen extrakční pufr. V 1,5ml zkumavce v 800 µl tohoto pufru byla pomocí tloučku rozmělněna polovina až celé tělo jedince (v závislosti na velikosti larvy). Následně byla zkumavka inkubována do druhého dne v termobloku při teplotě 60 °C a otáčkách 300 rpm.

Tabulka 2: Složení extrakčního pufru.

Chemikálie	Množství na 10 ml	Koncentrace
CTAB	0,2 g	2 %
1 M Tris	1 ml	100 mM
5 M NaCl	2,8 ml	1,4 M
0,5 M EDTA, pH = 8	0,8 ml	40 mM
β – mercapthoethanol	20 µl	0,2 %
Proteináza K (Macherey – Nagel, Německo)	50 µl	0,1 mg/ml
H ₂ O	5,33 ml	

Následující den byla suspenze přemístěna do 2ml zkumavky, kde k ní bylo přidáno stejné množství (800 µl) chloroformu. Po 2 minutách míchání byly vzorky 10 minut centrifugovány (4 °C, 14 000 rpm, r = 8 cm). Do nové 2ml zkumavky byla přepipetována horní fáze (obsahuje DNA) a celý postup byl zopakován. Opět byla odebrána horní fáze a umístěna do 1,5ml zkumavky. Následně bylo přidáno 5 µl RNAzy A (10 mg/ml) (Sigma – Aldrich, St. Louis, MO, USA) a vzorky byly 30 minut inkubovány při teplotě 37 °C. Po inkubaci bylo přidáno 2/3 množství isopropanolu a vzorky byly ponechány do druhého dne

při pokojové teplotě. Následně byly vzorky 15 minut centrifugovány (4 °C, 14 000 rpm, r = 8 cm). Po odstranění supernatantu bylo do zkumavky přidáno 700 µl studeného 70% ethanolu a proběhla další centrifugace. Promývání bylo ještě jednou zopakováno a po odstranění supernatantu byl pelet rozpuštěn v 30-50 µl sterilní vody (podle velikosti peletu). Případná fragmentace DNA byla kontrolována pomocí elektroforetické separace a koncentrace DNA byla změřena pomocí fluorometru Qubit a spektrofotometru Nanodrop 2000 (oba ThermoScientific, Waltham, USA).

3.4. Příprava sond pro CGH

Sondy pro metodu CGH byly značeny pomocí kitu Atto488 NT labeling kit a Cy3 NT labeling kit (Jena Bioscience, Jena, Německo). Při značení dochází k narušení řetězce pomocí DNAzy I a jeho opravení DNA polymerázou I v přítomnosti fluorochromy značených nukleotidů: červená-Cy3 dUTP, zelená-ATTO green (Jena Bioscience, Jena, Německo).

Reakční směs byla připravena podle návodu kitu a směs byla inkubována po dobu 1,5 hodiny při teplotě 15 °C v thermocycleru. Po uplynutí této doby bylo přidáno 5 µl Stop pufru a velikost sondy byla zkontrolována elektroforetickou separací v 1% agarózovém gelu. Sondy byly následně uchovávány v mrazáku při teplotě -20 °C.

3.5. CGH

Metoda komparativní genomové hybridizace se využívá k porovnání dvou genomových DNA, které jsou fluorescenčně značené a hybridizují na společný chromozomální preparát. V tomto případě byla metoda CGH použita k detekci chromozomu W u všech zkoumaných druhů pomocí hybridizace samčí a samičí celogenomové sondy na samičí chromozomální preparát.

Do 1,5ml zkumavky byla připravena hybridizační směs smícháním 300 ng červeně značené celogenomové samčí sondy, 300 ng zeleně značené samičí sondy, 25 ng DNA lososích spermií, 1/10 objemu octanu sodného (3M, pH 8) a 2,5x objemu studeného 100% ethanolu. Tato směs byla ponechána precipitovat v -20 °C po dobu 15 minut. Následně byla směs 15 minut centrifugována (4 °C, 14 000 rpm, r = 8 cm) a po odstranění supernatantu bylo k peletu přidáno 100 µl studeného 70% ethanolu. Vzorek byl promíchán a centrifugován 10 minut za stejných podmínek. Po pečlivém odebrání supernatantu bylo do zkumavky přidáno 5 µl deionizovaného formamidu a vzorek byl ponechán 30 minut inkubovat při teplotě 37 °C. Následně bylo přidáno 5 µl 20% dextran sulfátu (v 4x SSC) a vzorek byl 5 minut denaturován

ve vodní lázni o teplotě 90 °C. Aby došlo k rychlému zchlazení, byl vzorek ihned přenesen na led a následně 1,5 hodiny prehybridizován při 37 °C.

Současně byly připravené preparáty nejprve odvodněny pomocí ethanolové řady (70 %, 80 %, 100 %) a následně osušeny a 30 minut zapékány při 67 °C. Následně bylo na každý preparát nanášeno 100 µl roztoku RNAzy A (20 ng RNAzy v 20x SSC) a po přikrytí krycím sklem (24x50 mm) byl preparát při 37 °C hodinu inkubován ve vlhké komoře (krabička s utěrkou s 2x SSC). Sklo bylo poté 2x promyto v kyvetě s 2x SSC. Chromozomy na preparátu byly denaturovány přidáním 100 µl 70% roztoku formamidu ve 2x SSC, ten byl přikryt krycím sklem (24x50 mm) a denaturován 3,5 minuty při 68 °C v thermobloku. Následně bylo sklo sklepnuto a preparát umístěn na 2 minuty do chladného 70% ethanolu. Odvodnění pokračovalo v 80% a 100% ethanolu po dobu 30 vteřin.

Na suché sklo byla následně nanášena prehybridizovaná sonda, která byla překryta sklem (24x32 mm). Následně byly hrany krycího skla zalepeny lepidlem Rubbercement (Marabu, Německo) a preparát byl umístěn do vlhké komory, ve které byl při 37 °C inkubován 3 dny.

Po uplynutí inkubační doby bylo lepidlo a krycí sklo odstraněny a preparát byl promýván 5 minut v kyvetě při 42 °C v 1% roztoku Triton X (Sigma – Aldrich, USA) v 0,1x SSC. Preparát byl přenesen na 1 minutu do 1% roztoku Kodak PhotoFlo v miliQ vodě. Poté bylo na suché sklo nanášeno 25 µl směsi DAPI (500 ng/µl) + DABCO (Sigma – Aldrich, USA) a preparát přikryt krycím sklem (24x40 mm). Zbytky směsi byly odstraněny filtračním papírem a hrany skla zalakovány lakem na nehty. Preparáty byly až do prohlížení uloženy v ledničce při 4 °C.

3.6. Navržení primerů k satelitním sekvencím a mobilním elementům

K získání sekvencí byla použita DNA z tří samců a tří samic z každého druhu. Jedinci byli sekvenováni samostatně firmou Novogene (Peking, Čína) na platformě Illumina za následujících podmínek: párové čtení, byly použity inzerty o velikosti 450 bp, délka sekvencí 150 bp, kontrola kvality byla provedena programem FastQC (verze 0.11.5), sekvence byly sjednoceny na délku 130 bp programem Trimmomatic (verze 0.32). Analýza výsledků proběhla pomocí programu Repeat Explorer (verze 2.3.7) (Novák et al. 2013) s nástrojem TAREAN pro detekci tandemových repetit. Tento nástroj je umístěn na platformě Galaxy. Byly použity přednastavené parametry, kromě použití databáze pro anotaci sekvencí (METAZOA 3.0) a komparativní analýzy. Ty byly provedeny jak odděleně pro každý druh

(samec vs. samice) tak i pro oba druhy a obě pohlaví najednou. Pro analýzu byl použit náhodný vzorek 500 000 sekvencí a pro odhad zastoupení repetit v genomu samce a samice byly provedeny analýzy pro jednotlivá pohlaví.

Satelity a mobilní elementy byly nejprve protříděny tak, že byly z výběru odstraněny repetice, jejichž procentuální zastoupení bylo nižší než 0,01 % genomu. Repetice pro mapování byly pak vybírány na základě zastoupení v genomu, poměru F/M ratio a zda byly RepeatExplorerem anotovány.

Pro navržení primerů a vyhledávání homologů v dalších databázích (viz kapitola 3.13.) byly, u repetit anotovaných RepeatExplorerem jako satelity, použity konsensus sekvence z tohoto nástroje. U repetit anotovaných tímto nástrojem jako mobilní elementy či neanotovaných vůbec, byly z jednotlivých klastrů použity kontigy. Tyto kontigy byly analyzovány pomocí programu Nucleotide BLAST (analýza proti standardní databázi, optimalizace pro vysoce podobné sekvence - High similar sequences) a ty s největším počtem zásahů na W pro každou sekvenci byly použity k navržení primerů a pro anotaci dalšími programy.

Pro navržení primerů byl použit program Geneious 2023.1.1. a funkce Design New Primers for Sequences (modul Primer3 ver. 2.3.7). Primery pro satelity byly navrženy na monomeru a primery pro mobilní elementy byly navrženy do konzervativních oblastí za pomoci funkce „mapování na referenci“, kde jako reference byl použit monomer mobilního elementu. Primery syntetizovala firma GENERI BIOTECH s.r.o. (Hradec Králové).

3.7. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Principem polymerázové řetězové reakce je opakovaná denaturace a následná renaturace dvoušroubovice DNA za přítomnosti primerů, které jsou komplementární ke koncům amplifikované DNA. Syntéza probíhá pomocí termostabilní DNA polymerázy. Složení reakční směsi je uvedeno v Tabulce 3 a sekvence použitých forward a reverse primerů v Tabulce 4.

Tabulka 3: Složení reakční směsi pro PCR.

Chemikálie	Množství v 25 μl reakce	Finální koncentrace
5x <i>OneTaq</i> pufr	5 μ l	1x
dNTP (2,5 mM dATP, dTTP, dCTP a dGTP)	2 μ l	0,2 mM
forward primer (10 μ M)	2,5 μ l	1 μ M
reverse primer (10 μ M)	2,5 μ l	1 μ M
<i>OneTaq</i> DNA polymeráza I (5U/ μ l) (New England BioLabs, USA)	0,2 μ l	0,04 U
H ₂ O	12,8 μ l – objem DNA	
DNA	1 ng	

Tabulka 4: Primery.

Název primeru	Sekvence	Druh běláška
CL21 F	ACTTATACGGCCTCTCCTGA	b. řepkový
CL21 R	TTCTTTGGGAAACTTATGTTTACAT	
CL41 F	TTTCATGAAAGAAGTCCCGCG	b. řepkový
CL41 R	TCGCATGACGTAATGTTGCC	
CL72 F	GCGCGTATCCAACACAACAC	b. zelný
CL72 R	TGATCTGCTTCGTGATGGCA	
CL94 F	ATCTCGCATCCATCGCTTGT	b. zelný
CL94 R	ATCGAGCATTCCGGGCATGAT	
CL118 F	GGAGGTTCGAGGGATAACA	b. zelný
CL118 R	ATGGGTTGTTGTCTGCCG	
CL145 F	GCCCTATGTAAGACAGGCCA	b. řepkový
CL145 R	AGCCTGCGTAAAACCTCCAAA	
CL240 F	CGACGCATTCAGTGAGGAGA	b. řepkový
CL240 R	GTTTGACTGCAGGTGACTCG	

Reakce s těmito primery probíhala za následujících podmínek: iniciální denaturace po dobu 10 minut při 92 °C, následovalo 30 cyklů složených z denaturace při 92 °C po dobu 30 sekund, annealingu (nasedání primerů) při ideální teplotě pro daný primer (viz Tabulka 4) po dobu 30 sekund a extenze při 72 °C po dobu 45 sekund. Reakce byla zakončena finální extenzí při 72 °C po dobu 10 minut a zchlazením na 4 °C.

Produkty byly překontrolovány pomocí elektroforézy. Produkty této PCR byly přečištěny pomocí sady ExoSAP-IT (Applied Biosystems, USA). Přečištěné produkty byly zaklonovány a osekvenovány (viz kapitola 3.8. Klonování).

3.8. Klonování

Přečištěné produkty PCR byly zaligovány do vektoru pomocí kitu Promega pGem T-Easy Vector (Promega, USA). Ligační směs o objemu 10 µl byla namíchána následovně: 5 µl 2x ligační pufr, 1 µl Easy Vector, 1 µl ligáza, 50 ng DNA a voda byla doplněna do 10 µl. Tato směs byla přes noc ponechána v ledničce při 4 °C.

Druhý den byl provedena teplotní transformace kompetentních buněk bakterie *Escherichia coli* DH5α. Buňky byly vyjmuty z -80 °C a rozeřáty v ruce. Následně byly 10 minut ponechány na ledu a po uplynutí této doby k nim byla přidána ligační směs (2,5 µl ligační směsi na 50 µl kompetentních buněk. Následovala inkubace 30 minut na ledu. Následně byly buňky přeneseny na 90 sekund do 42 °C a poté okamžitě zchlazeny na ledu, kde k nim po uplynutí 2 minut bylo přidáno 810 µl LB media a 90 µl 20% glukózy. Následně byla směs ponechána po dobu 1 hodiny ve 37 °C. Po uplynutí této doby byly buňky centrifugovány po dobu 30 s (7500 g) a byla odstraněna většina supernatantu. Ve zbytku byly buňky opět rozmíchány a rovnoměrně rozprostřeny (asi 100 µl buněk na plotnu) na Petriho misku s LB médiem, agarem, 0,5 mM izopropyl β-D-1-tiogalaktopyranosidem (IPTG), 143 mM solí ampicilínu a 122 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galacto-pyranosidem. Misky byly inkubovány ve 37 °C po dobu asi 18 hodin.

Následně byly kolonie buněk podrobeny modro-bílé selekci, přičemž bílé kolonie byly přeočkovány a ponechány při 37 °C do dalšího dne, kdy byl proveden klontest. Klontest je PCR provedená s univerzálními primery M13 sloužící k ověření přítomnosti inzertu. PCR probíhala za následujících podmínek: iniciální denaturace po dobu 3 minut při 94 °C, následovalo 30 cyklů složených z denaturace při 94 °C po dobu 30 sekund, annealingu při teplotě 57 °C po dobu 30 sekund a extenze při 72 °C po dobu 3 minut. Reakce byla zakončena finální extenzí při 72 °C po dobu 5 minut a zchlazením na 4 °C. Produkty PCR se správným

inzertem byly přečištěny pomocí ExoSAP-IT a poslány na sekvenování Sangerovým sekvenováním u firmy SEQme (Dobříš, Česká republika). Tímto bylo ověřeno, že se při PCR namnožili požadované sekvence. Ověřené produkty byly použity jako templát k PCR, která proběhla za podmínek zmíněných v předchozí kapitole.

3.9. Značení satelitních sond pro FISH pomocí PCR a nick translace

Sondy pro metodu nepřímé FISH byly biotinem značeny následovně: repetice s délkou do 1 000 bp pomocí PCR za přítomnosti značených dNTP (viz Tabulka 5) a repetice s délkou nad 1 000 bp pomocí nick translace (s použitím Biotine 16 NT Labeling Kit) (Jena Bioscience, Jena, Německo). Podle Tabulky 6 byla namíchána reakční směs pro PCR a PCR byla provedena za stejných podmínek pouze s prodlouženou dobou extenze na 1,5 minuty. Jako templát byly použity přečištěné produkty PCR reakce plazmidů po klonování.

Tabulka 5: Složení směsi dNTP se značeným nukleotidem.

Chemikálie	Množství	Koncentrace
2,5 mM dATP	4 µl	0,25 mM
2,5 mM dCTP	4 µl	0,25 mM
2,5 mM dGTP	4 µl	0,25 mM
2,5 mM dTTP	1,5 µl	0,09 mM
biotine-16-dUTP	6,4 µl	0,16 mM
H ₂ O	20,16 µl	
Celkem	40 µl	

Tabulka 6: Složení reakční směsi pro PCR značení.

Chemikálie	Množství ve 25 µl reakce	Koncentrace
10x ExTaq pufr	2,5 µl	1x
dNTP's pro značení PCR	4 µl	0,04 mM dATP, dCTP, dGTP a 0,014 mM dTTP
Forward primer (10 µM)	2,5 µl	1 µM
Reverse primer (10 µM)	2,5 µl	1 µM
ExTaq polymeráza (5U/µl)	0,125 µl	0,625 U
DNA	10 ng	
H ₂ O	13,4 µl – objem DNA	

3.10. Nepřímá FISH s amplifikací signálu

Metoda nepřímé fluorescenční in situ hybridizace (FISH) se využívá k lokalizaci určité sekvence na chromozomu pomocí značené DNA či RNA sondy. Pomocí této metody byly vybrané repetitivní sekvence lokalizovány na chromozomech.

Do 1,5ml zkumavky byla namíchána reakční směs následujícího složení: 50 ng biotinem značených produktů PCR, 25 µg DNA lososích spermíí, 1/10 objemu octanu sodného (3M, pH 8) a 2,5x objemu studeného 100% ethanolu. Další kroky prvního dne probíhaly stejně jako u metody CGH, s výjimkou prehybridizace sond, která byla vynechána.

Následující den byly nejprve připraveny následující roztoky: 400 ml 2x SSC, 160 ml 0,1x SSC, 800 ml WBB (160 ml 20x SSC, 630 ml miliQ vody, 800 µl Tweenu, 8 g odtučněného mléka), Streptavidine-Cy3 ve WBB (0,1 µl streptavidinu ve 100 µl; 200 µl na preparát) a antistreptavidin (2 µ antistreptavidinu v 50 µl WBB na preparát).

Z preparátu bylo sejmuto krycí sklo a byl promýván následovně: dvakrát v kyvetách s 2x SSC po dobu 5 minut při teplotě 42 °C s třepáním, dvakrát v kyvetách s 0,1x SSC po dobu 5 minut při teplotě 42 °C s třepáním, jednou v kyvetě s 2x SSC po dobu 5 minut při teplotě 42 °C s třepáním, jednou v kyvetě s 2x SSC po dobu 10 minut při pokojové teplotě s třepáním a poté byl preparát inkubován 15 minut v kyvetě s WBB při pokojové teplotě.

Následně bylo na preparát napipetováno 100 µl streptavidine-Cy3, preparát byl přikryt krycím sklem (24x50 mm) a 1 hodinu inkubován při 37 °C. Po uplynutí této doby bylo odstraněno krycí sklo a preparát třikrát promyt v kyvetě s WBB po dobu 5 minut při teplotě 45 °C se třepáním. Na preparát bylo nanášeno 50 µl antistreptavidinu a preparát překryt krycím sklem (24x40 mm) a inkubován 30 minut při 37 °C. Následně bylo krycí sklo odstraněno, na preparát nanášeno 100 µl streptavidine-Cy3 a po přikrytí krycím sklem (24x50 mm) byl preparát opět 30 minut inkubován při teplotě 37 °C. Následně bylo krycí sklo sejmuto a preparát byl třikrát promyt v kyvetě s WBB po dobu 5 minut při teplotě 45 °C se třepáním.

Na preparát bylo napipetováno 25 µl směsi DAPI + DABCO a preparát byl překryt krycím sklem (24x40 mm). Zbytky směsi byly odstraněny filtračním papírem a hrany skla byly zalakovány lakem na nehty. Následně byly preparáty až do prohlížení skladovány v ledničce při teplotě 4 °C.

3.11. Prohlížení preparátů

K prohlížení a fotografování preparátů byly použity objektivy 63x a 100x mikroskopu Zeiss Axioplan 2. Preparáty byly foceny za použití 3 filtrů: zeleného pro samičí sondu, červeného pro samčí sondu a sondy značených repetitivních sekvencí a modrého pro podbarvení DAPI. K fotografování byl použit fotoaparát Olympus CCD XM10 a program cellSens 1.9. Obrázky byly upravovány a skládány v programu Adobe Photoshop CS4 (verze 11.0).

3.12. Průtoková cytometrie

K měření velikosti genomu byla použita metoda průtokové cytometrie. Měřena byla velikost genomu pět jedinců b. zelného a osm jedinců b. řepkového. Pro měření byly použity hlavičky mražených dospělců samčího pohlaví (pro jeden měřený vzorek půlka hlavičky). Jako standard známé velikosti genomu byly použiti dospělí samci ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*), ze kterých byla použita mozková tkáň. Z měřeného jedince byla odebrána polovina hlavy a k ní byla přidána mozková tkáň standardu. Společně byly tkáně nasekány pomocí žiletky ve 250 μ l pufru (0,1% Triton X-100; 0,1M Tris HCl pH 7,5; 2 mM MgCl₂). Ke kapce bylo přidáno 250 μ l pufru a celkový objem byl pipetován přes nylonový filtr do zkumavky. Do zkumavky bylo přidáno dalších 500 μ l pufru a 40 μ l propidium iodidu. Vzorky byly inkubovány 30-35 minut při pokojové teplotě a následně měřeny průtokovým cytometrem Partec CyFlow SL (Partec, Münster, Německo) a softwarem FlowJo™ v10.8 Software (BD Life Sciences). Měření na cytometru a odečtení výsledků bylo provedeno Mgr. Petrem Kouteckým, Ph.D.

3.13. Anotace repetitivní DNA pomocí bioinformatických nástrojů

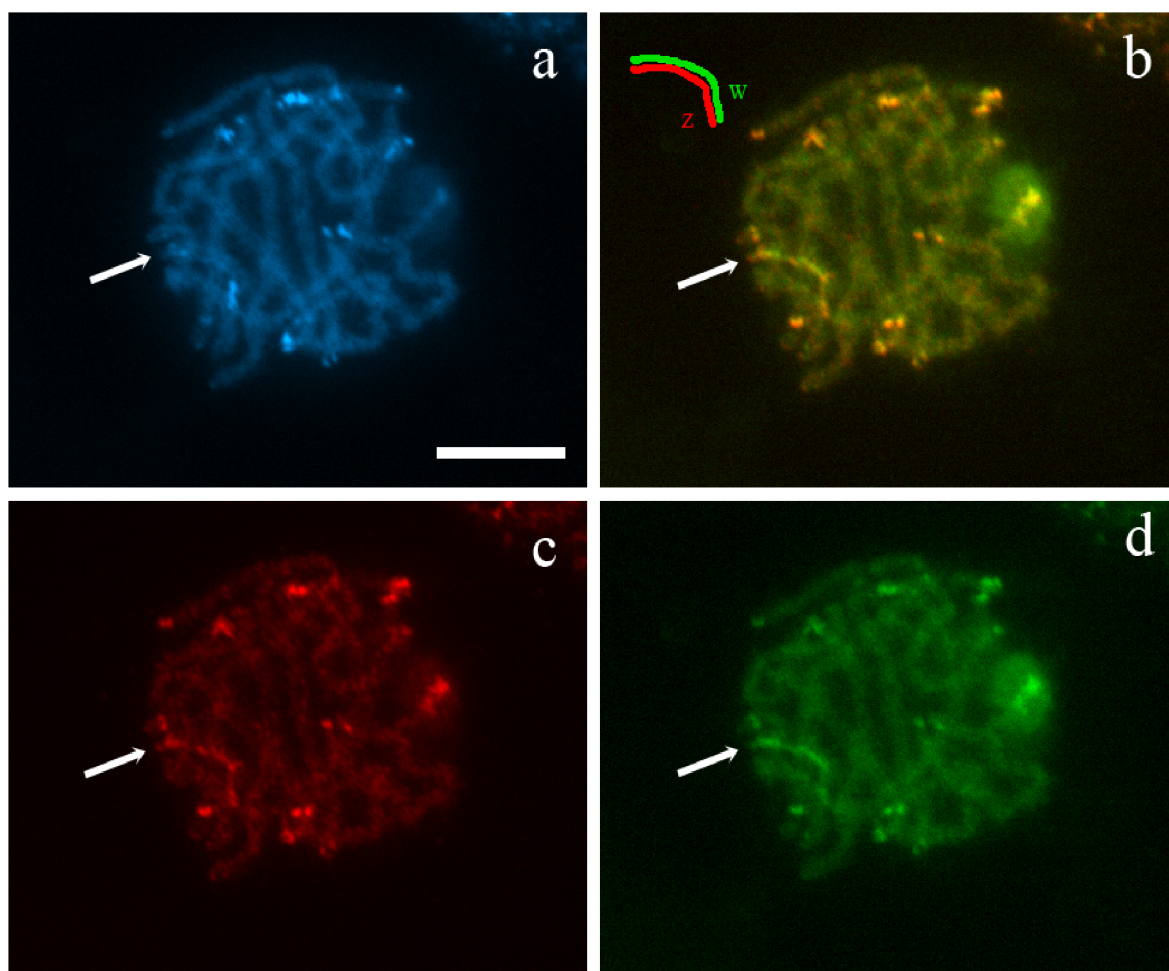
K získání informací o vybraných sekvencích byly použity kromě RepeatExploreru bioinformatické nástroje BLAST (NCBI) a RepeatMasker.

V databázi NCBI byly sekvence hledány pomocí funkce Nucleotide BLAST s přednastavenými parametry proti standardní databázi a optimalizací pro vysoce podobné sekvence (Highly similar sequences (megablast)). V programu RepeatMasker byl použit vyhledávací nástroj RMBlast, což je verze kompatibilní se sadou nástrojů NCBI BLAST. Citlivost vyhledávání byla ponechána na přednastavené standardní hodnotě.

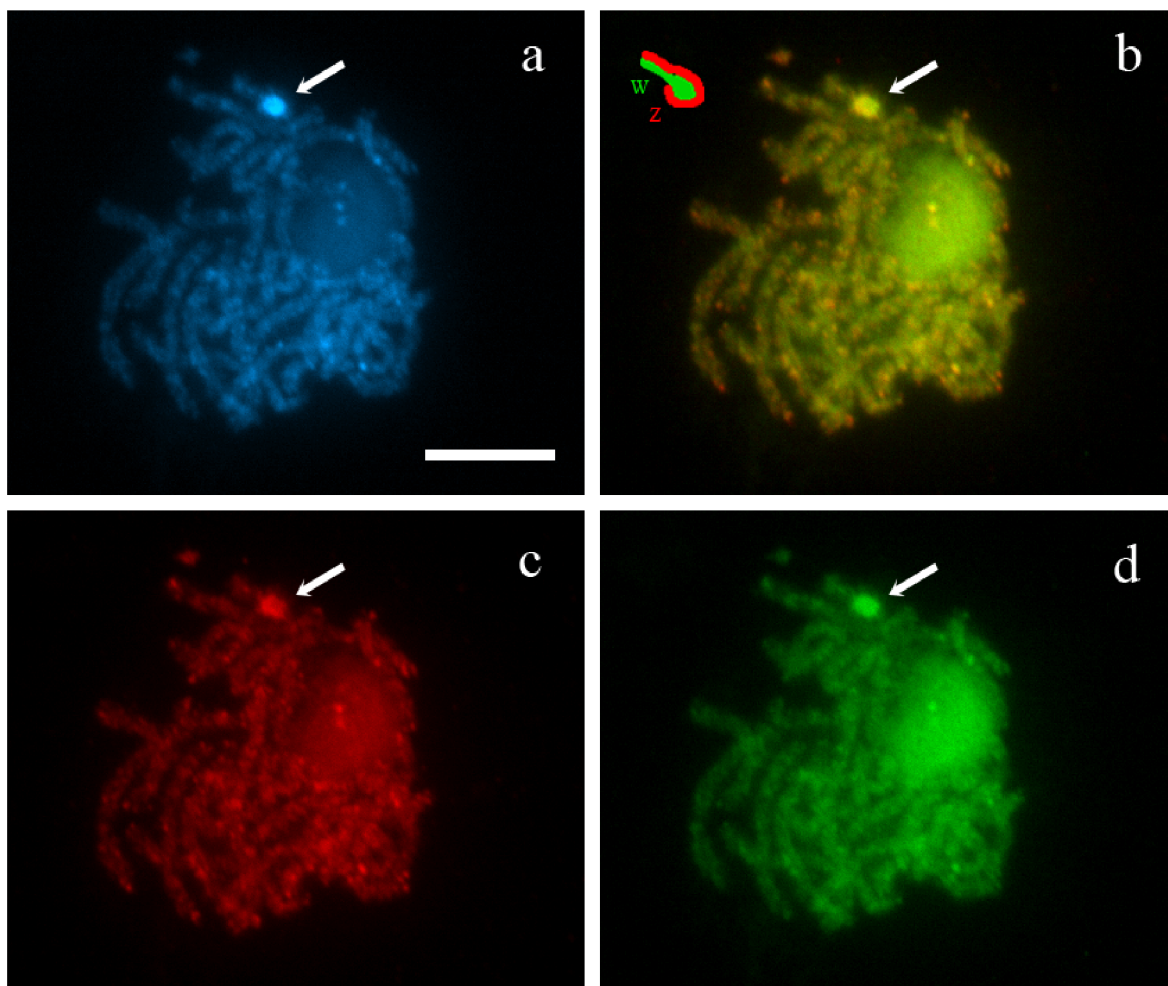
4. Výsledky

4.1. CGH

Ke zjištění případné variability chromozomů W byla použita metoda CGH. Obě barevné sondy na preparáty hybridizovaly, a tak označily červeně úseky DNA v genomu obohacené pro samce, zeleně úseky DNA přítomné pouze v genomu samice a kombinací obou barev (žlutě) úseky společné pro genom obou pohlaví. Tato metoda byla prováděna na pěti nepříbuzných jedincích b. zelného a pěti nepříbuzných jedincích b. řepkového. V jádrech zkoumaných nepříbuzných jedinců b. zelného ani b. řepkového nebyly nalezené žádné rozdíly ve tvaru či složení chromozomů W. Chromozom W b. zelného byl u všech jedinců podobného vzhledu s určitým množstvím heterochromatinu téměř po celé své délce, přičemž se po celé jeho délce střídaly úseky více značené zeleně a úseky značené žlutě. U jader b. řepkového byl chromozom W tvořen z větší části masivním blokem heterochromatinu, který byl více značen zeleně a zbytek jeho délky značen žlutě. Na obrázcích 3 a 4 jsou vyobrazeny typické hybridizace na pachytenních jádrech zkoumaných bělásků.



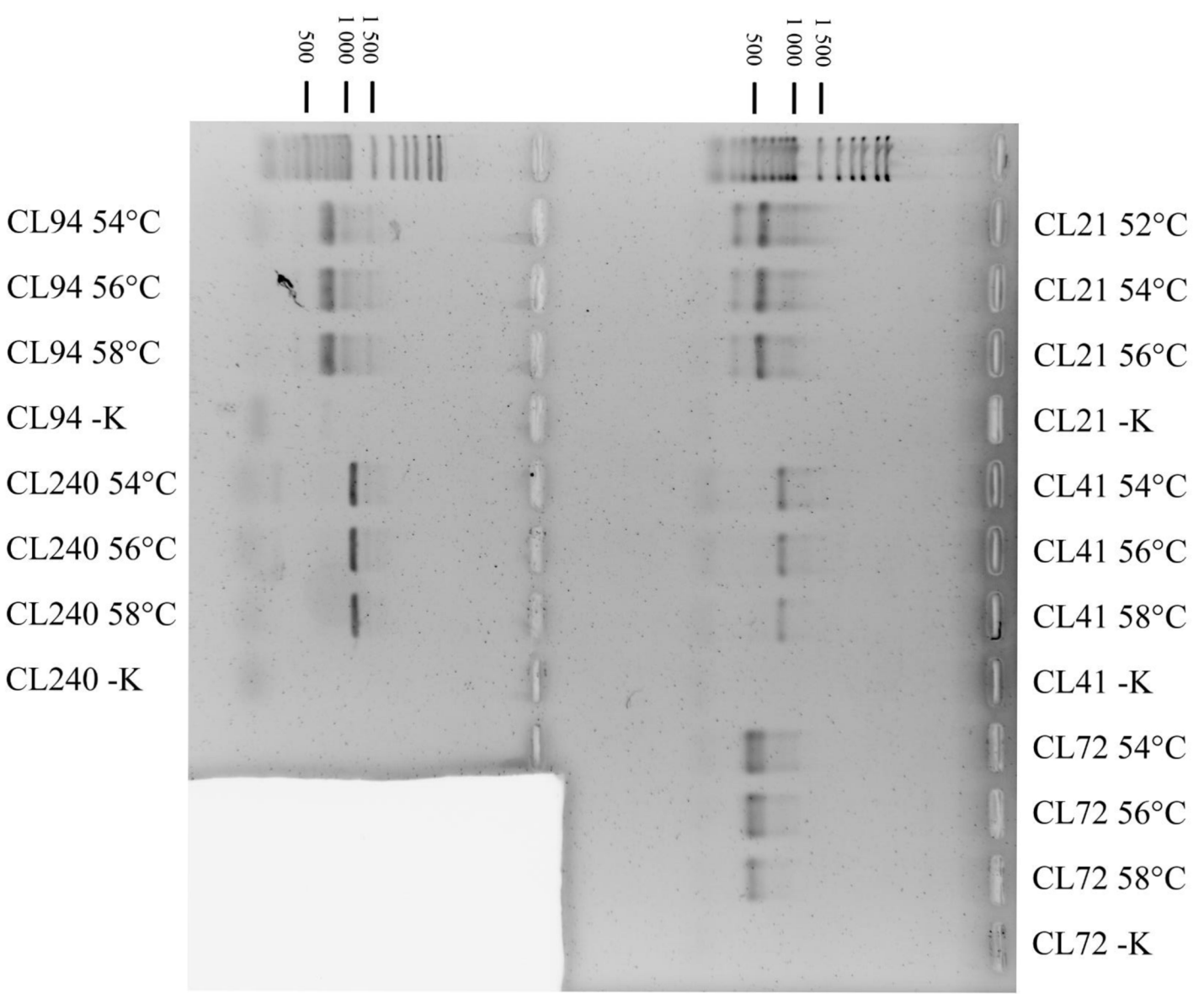
Obrázek 3: Komparativní genomová hybridizace na jádře samice b. zelného. Podbarvení DAPI (a), překryv samičí a samčí sondy (b), samčí sonda (c), samičí sonda (d). Šipky ukazují bivalent WZ. Měřítko = 10 μ m.



Obrázek 4: Komparativní genomová hybridizace na jádře samice b. řepkového. Podbarvení DAPI (a), překryv samičí a samčí sondy (b), samčí sonda (c), samičí sonda (d). Šipky ukazují bivalent WZ. Měřítko = 10 μ m.

4.2. Amplifikace vybraných sekvencí pomocí PCR

PCR byla prováděna s využitím gDNA běláška, u kterého byl satelit či mobilní element nalezen. Nejprve byla prováděna u všech repetit za různých teplot annealingu (Obrázek 5), aby bylo možné zjistit ideální teplotu pro daný pár primerů (viz Tabulka 7).



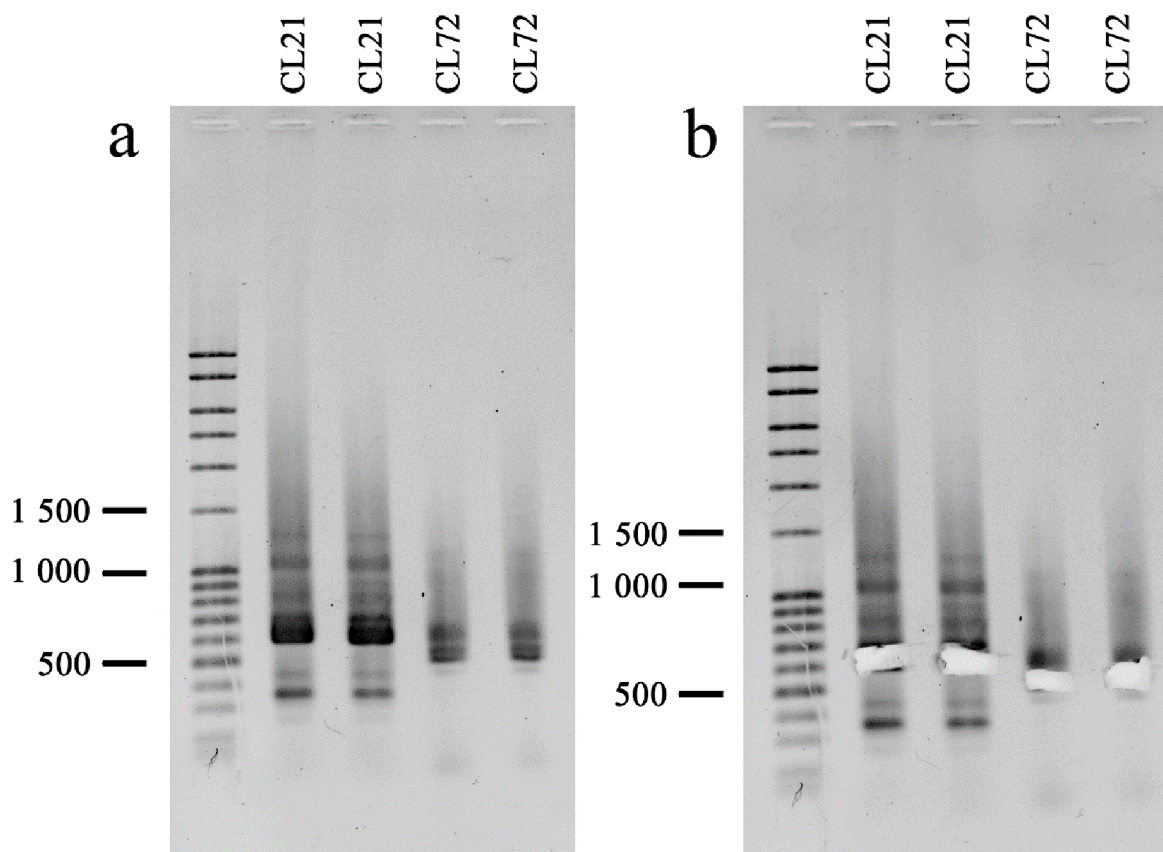
Obrázek 5: Produkty PCR prováděné za různých teplot anealingu.

Tabulka 7: Zjištěná ideální teplota annealingu pro amplifikaci vybraných repetit pomocí PCR.

Satelit	Druh běláška	Teplota annealingu	Očekávaná délka produktu
CL21	b. řepkový (<i>P. napi</i>)	54 °C	654 bp
CL41	b. řepkový (<i>P. napi</i>)	54 °C	840 bp
CL72	b. zelný (<i>P. brassicae</i>)	54 °C	452 bp
CL94	b. zelný (<i>P. brassicae</i>)	58 °C	1 102 bp
CL118	b. zelný (<i>P. brassicae</i>)	56 °C	103 bp
CL240	b. řepkový (<i>P. napi</i>)	56 °C	1 066 bp

Produkty PCR u repetit clusterů 41, 94 a 240 byly po přečištění zaklonovány, nicméně repetice CL21, CL72 a CL118 se opakovaně zaklonovat nepodařilo. Aby bylo ověřeno, že se zaklonovala správná repetice, byla provedena PCR a produkty o správné délce pro jednotlivé repetice byly odeslány na sekvenování. Po potvrzení zaklonování správné repetice (CL41-12, CL94-6, CL145-2-29 a CL240-27) byly produkty PCR použity jako templát pro další PCR za stejných podmínek. Produkty této PCR byly po přečištění značeny biotinem pomocí PCR (CL41, CL94) a pomocí Nick Translace (CL145 a CL240).

Produkty PCR repetit CL21 a CL72 byly vyřezány z gelu (Obrázek 6), přečištěny a odeslány na sekvenování. Poté, co bylo potvrzeno, že vyřezané produkty jsou ty správné repetice, byly produkty PCR značeny biotinem pomocí PCR. Očekávaná délka repetice CL118 byla 103 bp, a proto byl navržen oligonukleotid dlouhý 99 bází stejného složení jako repetice CL118 a na koncích se sekvencemi (na 5'konci – CCTCCAAGCTCCCTATGT a na 3'konci – TACCCAACAACAGACGGC) vázajícími univerzální primery z ptakopyska podivného (*Ornithorhynchus anatinus*). Tento oligonukleotid byl také naznačen biotinem pomocí PCR. Značené sondy byly následně použity pro nepřímou fluorescenční in situ hybridizaci.



Obrázek 6: CL 21 a CL72 před vyřezáním (a) a po vyřezání z gelu (b).

4.3. Anotace repetitivní DNA

Vybrané repetitivní sekvence byly anotovány pomocí tří bioinformatických programů (BLAST, RepeatMasker, RepeatExplorer), aby byly získány informace o pravděpodobném místě výskytu těchto sekvencí ještě před lokalizací. Informace získané z bioinformatických nástrojů jsou uvedeny v Tabulce 8.

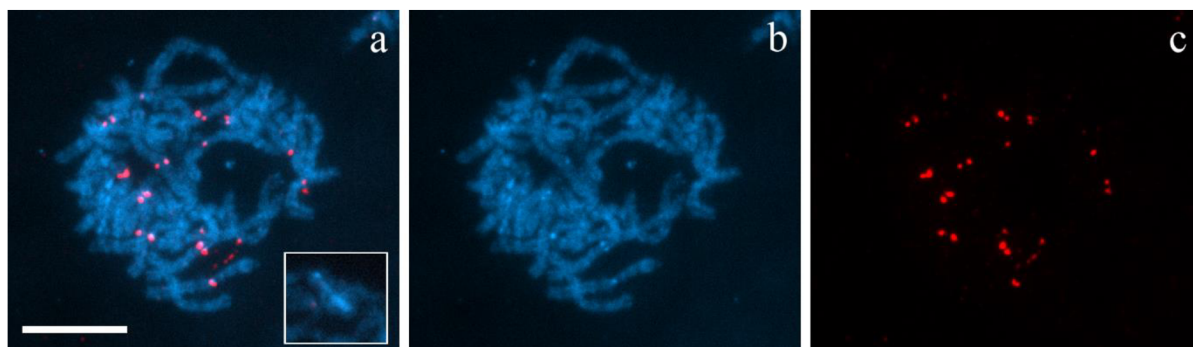
Tabulka 8: Přehled repetitivní DNA s anotacemi. F/M – poměr čtení (readů) obsahujících danou repetici mezi samicí a samcem, SD F – směrodatná odchylka v počtu čtení obsahujících danou repetici u tří samičích biologických vzorků, SD M – směrodatná odchylka v počtu čtení obsahujících danou repetici u tří samčích biologických vzorků, RM – anotace pomocí nástroje RepeatMasker, RE – anotace pomocí nástroje RepeatExplorer, BLAST – počet a lokalizace podobných sekvencí nalezených v nukleotidové databázi NCBI, Pbra – *Pieris brassicae*, Pnap – *Pieris napi*, sat HC – s vysokou pravděpodobností satelit (High confidence), sat LC – s nízkou pravděpodobností satelit (Low confidence)

Název	F/M	SD F	SD M	RM	RE	BLAST
CL21	0,98	11,32	18,80	Jednoduché repetice (AAAATTA)	sat HC	Na několika autozomech
CL41	1,30	8,38	11,26		sat LC	Na několika autozomech
CL72	27,17	3,40	0,82	nic	nic	129 nálezů na W u Pbra a hity na několika autozomech
CL94	2,5	2,87	4,92	nic	class I LTR	17 nálezů na W u Pbra a hity na několika autozomech
CL118	1,15	7,87	0,47	nic	Sat LC	57 nálezů na W u Pbra a hity na několika autozomech
CL240	2,45	4,55	2,05	Jednoduché repetice (GTATTA)	class I LINE- RT	mRNA, 2 hity na W u Pnap a hity na několika autozomech

4.4. Nepřímá FISH

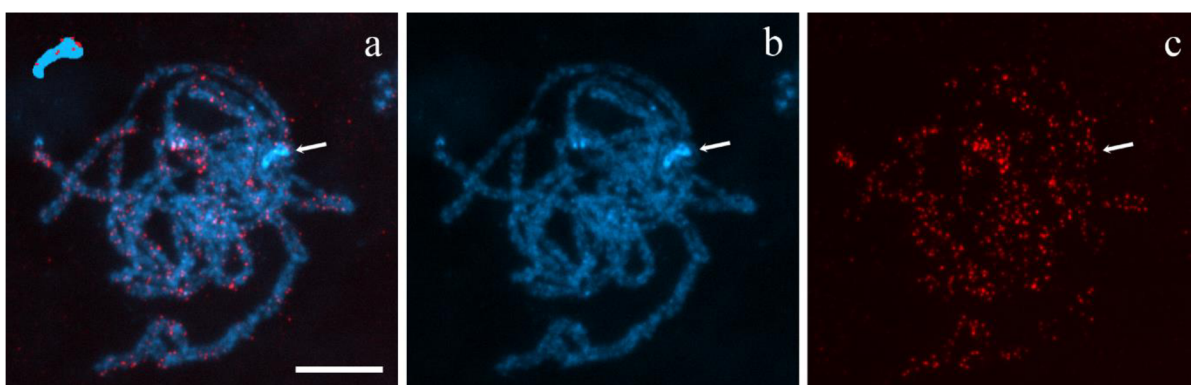
Místo výskytu satelitů a mobilních elementů bylo zjišťováno pomocí metody FISH. Metoda byla prováděna pomocí sondy značené biotinem vždy na ovariálním preparátu druhu běláška, u něhož byla daná repetice identifikována.

RepeatExplorer určil, že CL21 je s vysokou pravděpodobností satelit s poměrem zastoupení u samic ku u samců (F/M) 0,98, což značí, že satelit s největší pravděpodobností nebude W obohacený a nebude se vyskytovat na chromozomu W. To se při lokalizaci potvrdilo, když sonda hybridizovala do jádra, ale výhradně na autozomy (Obrázek 7).



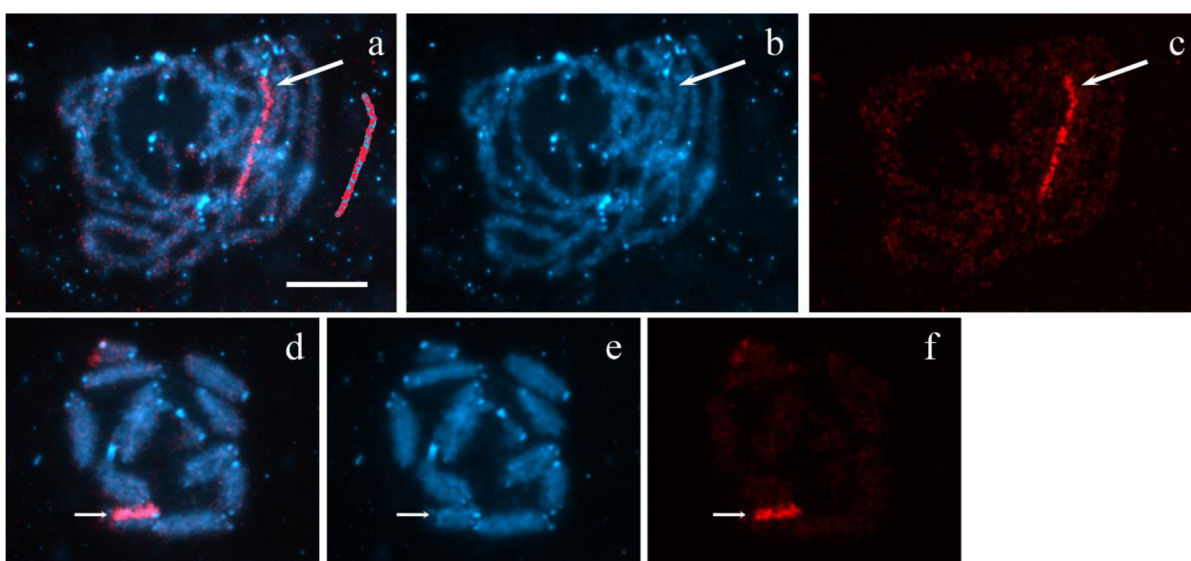
Obrázek 7: Fluorescenční in situ hybridizace CL21 na jádře b. řepkového. Sonda na pozadí DAPI (a), podbarvení DAPI (b), sonda (c). Výřez ukazuje bivalent WZ z jiného jádra. Měřítka = 10 μ m.

Jako repetice, která je s nízkou pravděpodobností satelit, byla RepeatExplorerem označena repetice CL41. Poměr F/M je 1,30, takže bylo předpokládáno že se tento satelit bude ve větší míře vyskytovat na chromozomu W v porovnání s autozomy, což se ale nepotvrdilo. Sonda hybridizovala hojně na všechny chromozomy, nicméně na chromozomu W se vyskytuje pouze v pár kopiích (Obrázek 8).



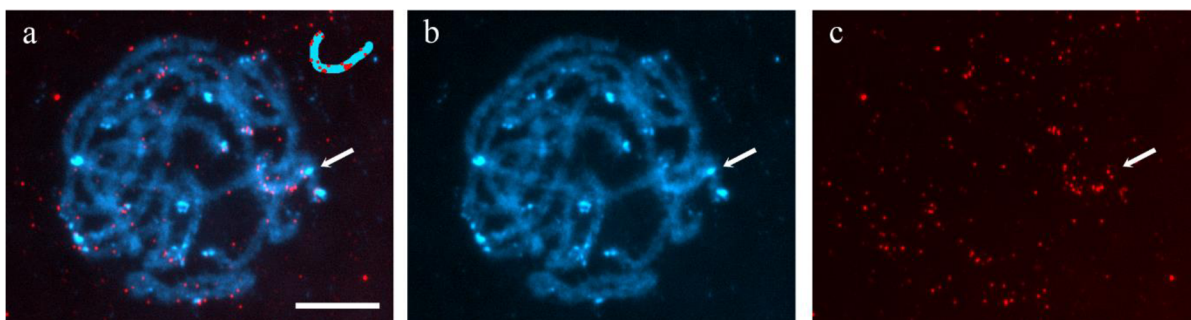
Obrázek 8: Fluorescenční in situ hybridizace CL41 na jádře b. řepkového. Sonda na pozadí DAPI (a), podbarvení DAPI (b), sonda (c). Šipky ukazují bivalent WZ. Měřítka = 10 μ m.

CL72 nebyl žádným použitým nástrojem anotován, nicméně měl nejvyšší poměr F/M a to 27,2, tudíž by se měl vyskytovat na chromozomu W opravdu hojně. Hybridizace sondy na jádro b. zelného toto potvrdila a na Obrázku 9 můžeme pozorovat, že je chromozom W po celé své délce značen červeně.



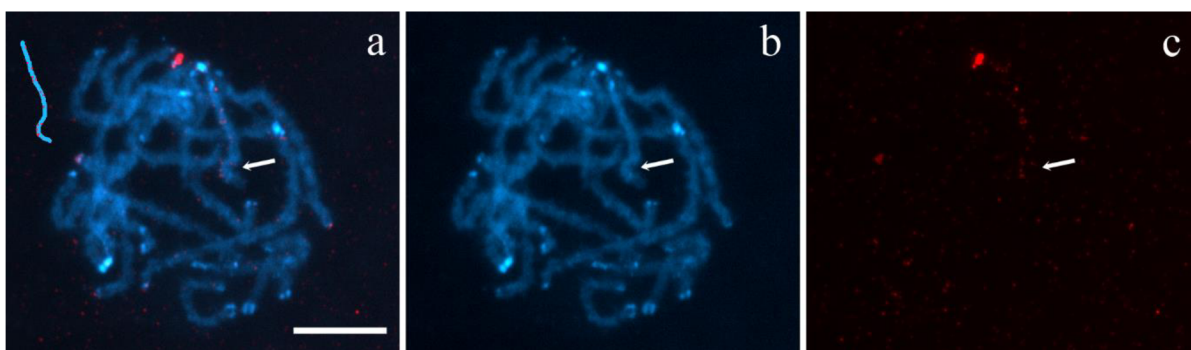
Obrázek 9: Fluorescenční in situ hybridizace CL72 na jádře b. zelného. Sonda na pozadí DAPI (a), podbarvení DAPI (b), sonda (c), detail chromozomu W (d, e, f). Šipky ukazují bivalent WZ. Měřítko = 10 μ m.

Mobilní element CL94 byl anotován pomocí RepeatExploreru jako LTR retrotranspozon s poměrem F/M = 2,5. Tato skutečnost napovídá, že by se tento retrotranspozon měl vyskytovat více na chromozomu W v porovnání s autozomy. Značená sonda hybridizovala nejen do několika míst na autozomech, ale také do heterochromatinu na chromozomu W (Obrázek 10), čímž byla tato domněnka potvrzena.



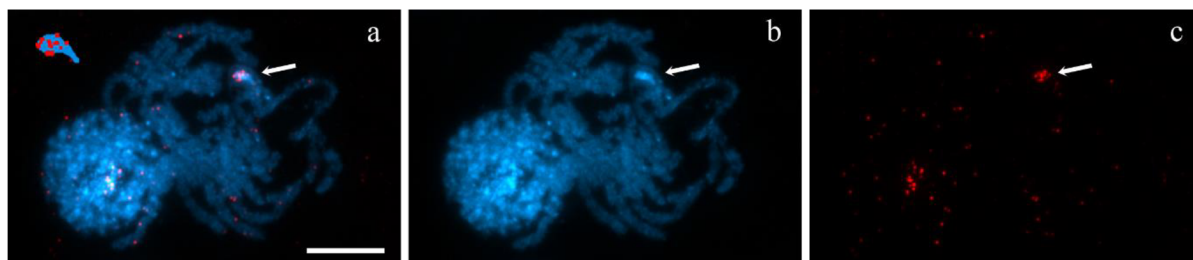
Obrázek 10: Fluorescenční in situ hybridizace CL94 na jádře b. zelného. Sonda na pozadí DAPI (a), podbarvení DAPI (b), sonda (c). Šipky ukazují bivalent WZ. Měřítko = 10 μ m.

Další repetici anotovanou RepeatExplorerem s nízkou pravděpodobností jako satelit byl CL118, který má poměr F/M 1,15, tudíž by se měl v menší míře vyskytovat i na chromozomu W. Sonda hybridizovala jako velký blok na jeden autozomální bivalent, v malém množství na další autozomy a v několika málo kopiích i na chromozom W (Obrázek 11).



Obrázek 11: Fluorescenční in situ hybridizace CL118 na jádře b. zelného. Sonda na pozadí DAPI (a), podbarvení DAPI (b), sonda (c). Šipky ukazují bivalent WZ. Měřítko = 10 μ m.

Repetice CL 240 byla RepeatExplorerem anotována jako retrotranspozon a měla poměr F/M 2,45, což naznačovalo, že se bude hojně vyskytovat na chromozomu W. Tato domněnka byla potvrzena, když tento retrotranspozon hybridizoval téměř výhradně do heterochromatinového bloku na chromozomu W (Obrázek 12).



Obrázek 12: Fluorescenční in situ hybridizace CL240 na jádře b. řepkového. Sonda na pozadí DAPI (a), podbarvení DAPI (b), sonda (c). Šipky ukazují bivalent WZ. Měřítko = 10 μ m.

4.5. Velikost genomů

Pomocí průtokové cytometrie bylo možné zjistit velikost genomů daných druhů bělásků a zjistit, zda existuje rozdíl ve velikosti mezi jednotlivci. Byla změřena velikost genomu osmi jedinců b. řepkového a pěti jedinců b. zelného. Měření bylo prováděno na samcích, protože měření samic by bylo zkomplikováno přítomností chromozomu W, který může mít variabilní počet heterochromatinových bloků. Všichni jedinci byli měřeni dvakrát a rozptyl mezi měřeními nepřesahoval hodnotu 4 %, což je u těchto analýz běžná chyba měření a je částečně eliminována vytvořením průměru těchto hodnot.

U b. zelného byla největší naměřená hodnota 0,375 pg u jedince M23-02 z Českých Budějovic a nejmenší hodnota 0,354 pg u jedince M23-01 ze Lhoty. Rozdíl mezi těmito naměřenými hodnotami je 5,6 %. U b. řepkového byla největší zjištěná hodnota 0,456 pg u jedince M23-03 z Českých Budějovic a nejmenší hodnota 0,390 pg u jedince M23-06 z Českých Budějovic. Rozdíl mezi největší a nejmenší naměřenou hodnotou u tohoto druhu je 14,5 %.

Tabulka 9: Výsledky měření genomu. 1C-pg PA-EK a 1C-Mbp PA-EK ukazují velikosti genomu na základě hodnoty pro ruměnici pospolnou (*P. apterus*) 1C = 1,336 pg kalibrovanou proti z. moučnému (*E. kuehniella*) 1C = 0,45 pg. Nejnížší naměřené hodnoty jsou značeny oranžově, nejvyšší naměřené hodnoty značeny zeleně.

Druh	Jedinec	Lokalita	Poměr	1C-pg PA-EK	1C-Mbp PA-EK
<i>Pieris napi</i>	M23-01	Koroseky	0,318	0,425	416
<i>Pieris napi</i>	M23-03	Lhota	0,300	0,401	392
<i>Pieris napi</i>	M23-02	Lhota	0,303	0,405	396
<i>Pieris napi</i>	M23-02	Vrábče	0,298	0,398	389
<i>Pieris napi</i>	M23-06	České Budějovice	0,292	0,390	382
<i>Pieris napi</i>	M23-11	České Budějovice	0,304	0,406	397
<i>Pieris napi</i>	M23-02	České Budějovice	0,312	0,417	408
<i>Pieris napi</i>	M23-03	České Budějovice	0,341	0,456	446
<i>Pieris brassicae</i>	M23-01	Lhota	0,265	0,354	346
<i>Pieris brassicae</i>	M23-02	Lhota	0,274	0,366	358
<i>Pieris brassicae</i>	M23-03	Lhota	0,270	0,361	353
<i>Pieris brassicae</i>	M23-02	České Budějovice	0,281	0,375	367
<i>Pieris brassicae</i>	M23-05	Mladá Boleslav	0,270	0,361	353

5. Diskuze

5.1. Složení chromozomu W

Chromozom W prochází velice rychlou evolucí, jejímž důsledkem je, že i u blízce příbuzných druhů jsou mezi chromosomy W velké rozdíly (Hejníčková et al., 2021; Vítková et al., 2007; Zrzavá et al., 2018). Tento stav nalezneme i u zkoumaných bělásků, kdy na první pohled vidíme, že se chromozomy zásadně liší nejen velikostí, ale i množstvím heterochromatinu. Pro lepší porozumění složení těchto chromozomů byla použita metoda CGH, která odhalila u obou druhů kromě sekvencí společných pro obě pohlaví také sekvence obohacené pro chromozom W.

Hybridizace sond pomocí metody CGH na pachytenních jádrech b. zelného a b. řepkového byla prováděna již v mé bakalářské práci, nicméně protože od té doby byla u některých druhů motýlů nalezena vnitrodruhová variabilita ve tvaru a složení chromozomu W, byl tento postup opakován ve snaze zjistit, zda se podobná variabilita nevyskytuje i u zkoumaných bělásků. Při studii zejkovce hluchavkového (*Pseudopanthera macularia*) bylo zjištěno, že u některých samic se nachází bivalent WZ s nediferencovaným chromozomem W, zatímco u jiných samic se byl pomocí CGH odhalen bivalent WZ s chromozomem W, který byl velmi výrazně značen samičí sondou, čímž byla u tohoto druhu odhalena variabilita chromozomu W (Hejníčková et al., 2021). K odhalení variability chromozomu W v rámci jednoho druhu došlo i u skvrnopásníka lískového (*Lomaspilis marginata*). V práci Demková, 2022 byly pomocí CGH u tohoto druhu identifikovány tři různé typy chromozomu W vyskytující se u samic z různých rodin a tento rok byly objeveny další dva typy chromozomu W vyskytující se u samic tohoto druhu (Trehubenko, 2023).

Hybridizace sond při metodě CGH u b. zelného a b. řepkového však žádnou takovou variabilitu chromozomu W u samic neodhalila. U b. zelného bylo možné pozorovat chromozom W, u kterého byly úseky silnější hybridizace samičí sondy téměř po celé délce chromozomu W střídány s úseky, kde obě sondy hybridizovaly s podobně silnou intenzitou. Místa se stejnou intenzitou hybridizace se vyskytují také na obou koncích chromozomu W. Chromozom W b. řepkového je z větší části tvořen heterochromatinovým blokem, a právě v této oblasti je možné pozorovat silnější signál hybridizace samičí sondy, zatímco zbytek tohoto chromozomu je značen oběma sondami signálem s podobně silnou intenzitou. Tento stav odpovídá také skutečnostem zjištěným v mé bakalářské práci (Pinkrová, 2020).

5.2. Lokalizace satelitních sekvencí a mobilních elementů

Jak už bylo zmíněno výše, repetitivní DNA tvoří významnou část genomu všech eukaryot. Repetice jsou hlavní složkou konstitutivního heterochromatinu, která se vyskytuje v telomerických a pericentromerických oblastech (Charlesworth et al., 1994). U motýlů je však výskyt heterochromatinových bloků velice ojedinělý a heterochromatin u většiny druhů nalezneme pouze na chromozomu W. Repetitivní sekvence byly řadu let vynechávány ze sekvenování, protože ztěžovaly skládání genomu a bez sekvenování bylo velice složité je jinými molekulárními metodami odhalit. Donedávna bylo proto známo velmi málo repetic vyskytujících se u motýlů, nicméně s rozvojem sekvenování nové generace a bioinformatických nástrojů se tato situace velice rychle mění (Šatović-Vukšić, Plohl, 2023).

Velkou dynamiku nalézáme nejen v počtu satelitů a mobilních elementů v genomu ale také v distribuci a lokalizaci (Šatović Vukšić, Plohl, 2021). Například u sluněčka pestrého (*Hippodamia variegata*) bylo nalezeno 30 satelitů, které zabírají 15 % genomu (Mora et al, 2020), naopak u plošnice (*Rhodnius prolixus*), kde bylo v genomu satelitů nalezeno dokonce 39 ale zabírají pouze 8 % genomu (Montiel et al., 2021). Velké rozdíly však můžeme nalézt i mezi jedinci jednoho druhu z různých populací, jako u plošnice *Triatoma infestans*, kde u andské populace zabírají satelity 33 % genomu, zatímco u neandské pouze 25 % (Pita et al., 2017), nebo mezi samci a samicemi stejného druhu, jako například u motýla *D. saccharalis*, kde mobilní elementy u samců tvoří 38,19 % genomu, zatímco u samic až 41,35 % (Gasparotto et al., 2022). Není proto žádným překvapením, že se počet satelitů a mobilních elementů nalezených u dvou zkoumaných druhů bělásků liší.

V této práci byly lokalizovány celkem tři satelity, dva mobilní elementy a jedna repetice, která nebyla anotována. Pro lokalizaci byly vybrány repetice s podezřením výskytu na chromozomu W, aby bylo možné zjistit, co se na tomto chromozomu nachází. Z šesti zkoumaných repetic bylo pět lokalizováno alespoň v malé míře na chromozomu W. U většiny lokalizovaných repetic předpokládaná lokalizace na základě poměru zastoupení repetice u samic a u samců odpovídala skutečnosti. Pokud sondy hybridizovaly ve větším množství na chromozom W, hybridizovaly do oblastí heterochromatinových bloků, což dále potvrzuje fakt, že heterochromatin je hlavním místem výskytu repetic. Tato skutečnost byla očekávána, přestože analýza satelitních sekvencí u s. lískového (*L. marginata*) ukázala, že zkoumané satelitní sekvence mohou být lokalizovány mimo místa heterochromatinových bloků (Trehubenko, 2023).

Důvody, proč byly některé satelity RepeatExplorerem předpokládány na chromozomu W ve velkém množství, ale nebyly tam ve stejné míře lokalizovány, mohou být dva. Prvním vysvětlením by mohla být vnitrodruhová variabilita, kdy u sekvenování samice je tento satelit obohacený na W, zatímco u samice, ze které byl vyhotoven preparát obohacený nebyl. Druhým důvodem může být analýza RepeatExplorerem. Analyzuje se jen určité množství čtení, takže mohla být v této analýze vlivem náhody repetice zastoupena víc, než odpovídá realitě v genomu.

5.3. Velikost genomu

Velikost genomu je jednou ze základních charakteristik eukaryotního organismu a obsahuje celkové množství DNA obsažené v jedné kopii jediného genomu (hodnota C) a vyjadřuje se buď v množství (pg) nebo v počtu párů bazí (bp) (Gregory, 2005). U b. zelného se naměřené hodnoty pohybovaly v rozmezí 0,354 – 0,375 pg a u b. řepkového v rozmezí 0,390 – 0,456 pg, což podle teorie z práce Liu et al., 2020 přibližně odpovídá ancestrálnímu motýlímu genomu, který měl velikost 0,5 pg, přičemž v jednotlivých podrodinách docházelo během vývoje k poklesům či nárůstům této velikosti.

Zajímavé jsou rozdíly ve velikosti genomu zjištěné u jedinců stejného pohlaví b. zelného a především b. řepkového. U tohoto druhu byl zjištěn rozdíl mezi největším a nejmenším naměřeným genomem 14,5 %, což není zanedbatelné. Tento druh však není jediným, u kterého byla zjištěna vnitrodruhová variabilita. U s. lískového byl při měření genomu jedinců stejného pohlaví zjištěn rozdíl mezi největším a nejmenším naměřeným genomem až 23 % (Trehubenko, 2023). Možným vysvětlením těchto rozdílů by mohlo být množství nakumulované repetitivní DNA, jako jsou satelity a mobilní elementy, které byly u obou druhů lokalizovány jak v této práci, tak v roce 2020 (Pinkrová, 2020). Tato skutečnost byla zjištěna u běláška hrachorového (*Leptidea sinapis*) a běláška lučního (*Leptidea juvernica*), u nichž velikost genomu koreluje s množstvím akumulovaných mobilních elementů (Talla et al., 2017).

Pomocí sekvenování a následného složení genomu byla u běláška zelného predikována velikost genomu 292 Mbp (Lohse, 2021), což neodpovídá hodnotám získaným pomocí průtokové cytometrie naměřených v této práci, které se pohybovaly v rozmezí 346 – 367 Mbp. Podobná je situace i u b. řepkového, u něhož byl podle sekvenování určen genom velikostí 299 Mbp (Nallu et al., 2018) nebo 320 Mbp (Lohse, Hayward, Ebdon, 2021), což je opět výrazně méně než hodnoty zjištěné pomocí průtokové cytometrie, jež jsou v rozmezí 382

– 446 Mbp. Tyto rozdíly mohou být způsobeny tím, že při skládání genomu mohou být některé kopie stejné repetice ignorovány (zkolabovány), čímž dochází ke snížení počtu jednotlivých opakování. Tato skutečnost jen dále potvrzuje, že genomy obou zkoumaných druhů bělásků jsou velice bohaté na repetitivní DNA.

6. Závěr

Cílem této práce byla analýza vnitrodruhové variability chromozomu W, velikosti genomu a repetitivní DNA u dvou druhů bělásků, konkrétně b. zelného a b. řepkového. Komparativní genomovou hybridizací nebyla ani u jednoho ze zkoumaných druhů nalezena vnitrodruhová variabilita. Chromozomy W nepříbuzných jedinců stejného druhu nevykazovaly rozdíly ve tvaru chromozomu W, počtu heterochromatinových bloků ani v obsahu sekvencí obohacených pro W.

Genomy obou zkoumaných druhů jsou bohaté na repetice, což potvrdila i lokalizace vybraných satelitů a mobilních elementů. Úspěšně se podařilo izolovat a zamapovat šest repetic, z toho tři jsou satelity, dvě repetice jsou mobilní elementy a jedna repetice nebyla anotována. Lokalizace těchto repetic prokázala, že pět těchto sekvencí se vyskytuje na chromozomu W a některé jsou na chromozomu W silně obohacené.

U obou druhů byly průtokovou cytometrií změřeny velikosti genomu, které byly vyšší než publikované hodnoty určené sekvenováním genomu. Měřením byly také zjištěny rozdíly ve velikostech genomu mezi jedinci stejného druhu, u b. zelného 5,6 % a u b. řepkového 14,5 %, které mohou být způsobeny různou mírou akumulace repetitivní DNA.

Tato práce odhalila další informace o genomu a pohlavním chromozomu W dvou vybraných druhů bělásků rodu *Pieris*. Dalším směrem výzkumu by mohla být analýza mikrosatelitů nebo lokalizace již objevených satelitů u dalších zástupců rodu *Pieris*.

7. Použité zdroje

Abbott J.K., Nordén A.K., Hansson B. 2017 Sex chromosome evolution: historical insights and future perspectives. *Proceedings: Biological Sciences*. May 17; 284(1854): 20162806. doi: 10.1098/rspb.2016.2806.

Abe H., Mita K., Yasukochi Y., Oshiki T., Shimada T. 2005 Retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Cytogenetic and Genome Research* 110: 144–151 doi: 10.1159/000084946

Abe H., Sugasaki T., Terada T. et al. 2002 Nested retrotransposons on the W chromosome of the wild silkworm *Bombyx mandarina*. *Insect Molecular Biology* 11(4): 307-314 doi: 10.1046/j.1365-2583.2002.00339.x

Ahmad S. F., Singchat W., Jehangir M., Suntronpong A., Panthum T., Malaivijitnond S., Srikulnath K. 2020 Dark Matter of Primate Genomes: Satellite DNA Repeats and Their Evolutionary Dynamics. *Cells* December 18; 9 (12): 2714 doi: 10.3390/cells9122714

Bachmann L., Sperlich D. 1993 Gradual evolution of a specific satellite DNA family in *Drosophila ambigua*, *D. tristis*, and *D. obscura*. *Molecular Biology and Evolution* 10(3): 647-659 doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040029

Bachtrog D. 2006 A dynamic view of sex chromosome evolution. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16 (6), 578–585 doi: 10.1016/j.gde.2006.10.007

Belfort M., Curcio M. J., Lue, N. F. 2011 Telomerase and retrotransposons: Reverse transcriptases that shaped genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(51), 20304–20310 doi:10.1073/pnas.1100269109

Beliajeff N. K. 1930 Die Chromosomenkomplexe und ihre Beziehung zur Phylogenie bei den Lepidopteren. *Z. Ind. Abst. Vererbgs.* 54(1): 369-399 doi: 10.1007/BF01848966

Benson G. 1999 Tandem repeats finder: A program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research* 27: 573–580 doi: 10.1093/nar/27.2.573

Beukeboom L.W., Perrin N. 2014 *The evolution of sex determination*. Oxford, UK: Oxford University Press

Bigger T. R. L. 1960 Chromosome numbers of Lepidoptera. Part I. *Ent. Gaz.* 11: 149-152

Biscotti M. A., Olmo E., Heslop-Harrison, J. S. 2015 Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome Research*, 23(3), 415–420 doi:10.1007/s10577-015-9499-z

Bizzaro D., Manicardi G. C., Bianchi U. 1996 Chromosomal localization of a highly repeated EcoRI DNA fragment in *Megoura viciae* (Homoptera, Aphididae) by nick translation

and fluorescence in situ hybridization. *Chromosome Research* 4(5): 392-396 doi: 10.1007/BF02257275

Bonaccorsi S., Lohe A. 1991 Fine mapping of satellite DNA sequences along the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*: relationships between satellite sequences and fertility factors. *Genetics* 129(1): 177-89 doi: 10.1093/genetics/129.1.177

Brown K. S. Jr., Von Schoultz B., Suomalainen E. 2004 Chromosome evolution in Neotropical Danainae and Ithomiinae (Lepidoptera). *Hereditas* ;141(3): 216-236 doi: 10.1111/j.1601-5223.2004.01868.x.

Bull J.J. 1983 *Evolution of Sex Determining Mechanisms*. Benjamin/Cummings: Menlo Park, CA

Bush G.L. 1966 Female heterogamety in the family Tephritidae (Acalyptratae, Diptera). *The American Naturalist* 100: 119–126

Cabral-de-Mello D. C., Zrzavá M., Kubíčková 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

Charlesworth B. 1978 Model for evolution of Y chromosomes and dosage compensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 75: 5618-5622 doi: 10.1073/pnas.75.11.5618

Charlesworth B., Charlesworth D. 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy. *The American Naturalist* 112: 975–997 doi: 10.1086/283342

Charlesworth B. 1994 The effect of background selection against deleterious alleles on weakly selected, linked variants. *Genetics Research* 63: 213-228 doi: 10.1017/S0016672300032365

Charlesworth B., Sniegowsky P., Stephan W. 1994 The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371(6494): 215–220 doi: 10.1038/371215a0

Charlesworth B. 1996 The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Current Biology*, 6: 149-162 doi: 10.1016/s0960-9822(02)00448-7

Charlesworth B., Charlesworth D. 2000. The degeneration of Y chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B* 355: 1563–1572 doi: 10.1098/rstb.2000.0717

Charlesworth D., Charlesworth B., Marais G. 2005. Steps in the Evolution of Heteromorphic Sex Chromosomes. *Heredity* 95 (2): 118–128 doi: 10.1038/sj.hdy.6800697

Dalíková M., Zrzavá M., Hladová I., Nguyen P., Šonský I., Flegrová M., Kubíčková S., Voleníková A., Kawahara Y. A., Peters S. R., Marec F. 2017a New Insights into the

Evolution of the W Chromosome in Lepidoptera. *Journal of Heredity*, 108(7), 709–719
doi:10.1093/jhered/esx063

Dalíková M., Zrzavá M., Kubíčková S., Marec F. 2017b W-enriched satellite sequence in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae). *Chromosome Research* 25: 241–252 doi: 10.1007/s10577-017-9558-8

Dechaud C., Volff J. N., Scharl M., Naville M. 2019 Sex and the TEs: transposable elements in sexual development and function in animals. *Mob DNA* 3, 10: 42. doi: 10.1186/s13100-019-0185-0

Demková, M., 2022 Analýza chromosomu W u skvrnopásníka lískového, *Lomaspilis marginata*. Mgr. Thesis in Czech 41 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Doncaster, L. 1912 The chromosomes in the oogenesis and spermatogenesis of *Pieris brassicae*, and in the oogenesis of *Abraxas grossulariata*. *Journal of Genetics* 2, 189–200

Dopman E. B. 2004 Genetic Mapping of Sexual Isolation Between E and Z Pheromone Strains of the European Corn Borer (*Ostrinia nubilalis*). *Genetics*, 167(1), 301–309
doi:10.1534/genetics.167.1.301

Dover G. 2002 Molecular drive. *Trends in Genetics* 18(11): 587-589. doi: 10.1016/s0168-9525(02)02789-0

Elder J.F., Turner B.J. 1995 Concerted evolution of repetitive DNA sequences in eukaryotes. *The Quarterly Review of Biology* 70: 297–320 doi: 10.1086/419073

Erlandsson R., Wilson J. F., Pääbo, S. 2000 Sex Chromosomal Transposable Element Accumulation and Male-Driven Substitutional Evolution in Humans. *Molecular Biology and Evolution*, 17(5), 804–812 doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026359

Felsenstein J. 1974 The evolutionary advantage of recombination. *Genetics* 78:737-756 doi: 10.1093/genetics/78.2.737

Fraïsse C., Picard M. A. L., Vicoso B. 2017 The deep conservation of the Lepidoptera Z chromosome suggests a non-canonical origin of the W. *Nature Communications*, 8(1) doi: 10.1038/s41467-017-01663-5

Fugmann S. D. 2010 The origins of the Rag genes—From transposition to V(D)J recombination. *Seminars in Immunology*, 22(1), 10–16 doi:10.1016/j.smim.2009.11.004

Fujii T., Abe H., Kawamoto M., Banno Y., Shimada T. 2015 Positional cloning of the sex-linked giant egg (Ge) locus in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology* 24: 213–221 doi: 10.1111/imb.12150

- Fuková I., Traut W., Vítková M., Nguyen P., Kubicková S., Marec F. 2007 Probing the W chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin. *Chromosoma* 116: 135–145 doi: 10.1007/s00412-006-0086-0
- Gasparotto A.E., Milani D., Martí E., Ferretti A. B. S. M., Bardella V. B., Hickmann F., Zrzavá M., Marec F., Cabral-de-Mello D. C. 2022 A step forward in the genome characterization of the sugarcane borer, *Diatraea saccharalis*: karyotype analysis, sex chromosome system and repetitive DNAs through a cytogenomic approach. *Chromosoma* 131, 253–267 doi: 10.1007/s00412-022-00781-4
- Gelfand Y., Rodriguez A., Benson G. 2007 TRDB—The Tandem Repeats Database. *Nucleic Acids Research* 35: D80–D87 doi: 10.1093/nar/gkl1013
- Gotter A. L., Levine J. D., Reppert S. M. 1999 Sex-linked period genes in the silkworm, *Antheraea pernyi*: implications for circadian clock regulation and the evolution of sex chromosomes. *Neuron* 24: 953–965 doi: S0896-6273(00)81042-9
- Gregory T.R. 2005 The C-value enigma in plants and animals: a review of parallels and an appeal for partnership. *Annals of Botany*, 95, 133–146
- Grimaldi D.A., Engel M.S. 2005 *Evolution of the insects*. Cambridge insity Press, New York
- Hall S. E., Kettler G., Preuss D. 2003 Centromere satellites from *Arabidopsis* populations: maintenance of conserved and variable domains. *Genome Research* 13(2): 195–205 doi: 10.1101/gr.593403
- Hall S. E., Luo S., Hall A. E., Preuss D. 2005 Differential rates of local and global homogenization in centromere satellites from *Arabidopsis* relatives. *Genetics* 170(4): 1913–1927 doi: 10.1534/genetics.104.038208
- Hejníčková M., Dalíková M., Potocký P., Tammaru T., Trehubenko M., Kubičková S., Marec F., Zrzavá M. 2021 Degenerated, Undifferentiated, Rearranged, Lost: High Variability of Sex Chromosomes in Geometridae (Lepidoptera) Identified by Sex Chromatin. *Cells* Aug 28; 10(9): 2230 doi: 10.3390/cells10092230
- Hejníčková M., Dalíková M., Zrzavá M., Marec F., Lorite P., Montiel E. E. 2023 Accumulation of retrotransposons contributes to W chromosome differentiation in the willow beauty *Peribatodes rhomboidaria* (Lepidoptera: Geometridae). *Scientific Reports* Jan 11; 13(1): 534 doi: 10.1038/s41598-023-27757-3.
- Hill D. S. 1987 *Agricultural insect pests of temperate regions and their control*. Cambridge University Press, Cambridge, p 625

Hill J., Rastas P., Hornett E. A., Neethiraj R., Clark N., Morehouse N., de la Paz Celorio-Mancera M., Cols J. C., Dirksen H., Meslin C., Keehnen N., Pruisscher P., Sikkink K., Vives M., Vogel H., Wiklund C., Woronik A., Boggs C. L., Nylin S., Wheat C. W. 2019 Unprecedented reorganization of holocentric chromosomes provides insights into the enigma of lepidopteran chromosome evolution. *Science Advances*, 5(6), eaau3648 doi:10.1126/sciadv.aau3648

Hood M. E. 2005 Repetitive DNA in the automictic fungus *Microbotryum violaceum*. *Genetica*, 124(1), 1–10 doi:10.1007/s10709-004-6615-y

Hoskins R. A., Carlson J. W., Kennedy C., Acevedo D., Evans-Holm M., Frise E., Wan K. H., Park S., Mendez-Lago M., Rossi F., Villasante A., Dimitri P., Karpen G. H., Celniker S. E. 2007 Sequence finishing and mapping of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Science* 316(5831): 1625-8. doi: 10.1126/science.1139816

Hubley R., Finn R.D., Clements J., Eddy S.R., Jones T.A., Bao W., Smit A.F.A., Wheeler T.J. 2016 The Dfam database of repetitive DNA families. *Nucleic Acids Research* 44: D81–D89 doi: 10.1093/nar/gkv1272

Jiggins C. D. 2005 A Genetic Linkage Map of the Mimetic Butterfly *Heliconius melpomene*. *Genetics*, 171(2), 557–570 doi:10.1534/genetics.104.034686

Junakovic N., Terrinoni A., Di Franco C., Vieira C., Loevenbruck C. 1998 Accumulation of Transposable Elements in the Heterochromatin and on the Y Chromosome of *Drosophila simulans* and *Drosophila melanogaster*. *Journal of Molecular Evolution*, 46(6), 661–668 doi:10.1007/pl00006346

Kaiser V. B., Bachtrog D. 2010 Evolution of sex chromosomes in insects. *Annual Review of Genetics* 44: 91–112 doi: 10.1146/annurev-genet-102209-163600

Kandul N. P., Lukhtanov V. A., Pierce N. E. 2007) KARYOTYPIC DIVERSITY AND SPECIATION IN *AGRODIAETUS* BUTTERFLIES. *Evolution*, 61(3), 546–559 doi:10.1111/j.1558-5646.2007.00046.x

Kazazian H. H. 2004 Mobile Elements: Drivers of Genome Evolution. *Science*, 303(5664), 1626–1632 doi:10.1126/science.1089670

Kejnovsky E., Hobza R., Cermak T., Kubat Z., Vyskot, B. 2009 The role of repetitive DNA in structure and evolution of sex chromosomes in plants. *Heredity*, 102(6), 533–541 doi:10.1038/hdy.2009.17

Kent W.J., Sugnet C.W., Furey T.S., Roskin K.M., Pringle T.H., Zahler A.M., Haussler A.D. 2002 The Human Genome Browser at UCSC. *Genome Research* 12: 996–1006 doi: 10.1101/gr.229102

Kiuchi T., Koga H., Kawamoto M., Shoji K., Sakai H., Arai Y., Ishihara G., Kawaoka S., Sugano S., Shimada T., Suzuki Y., Suzuki M. G., Katsuma S. 2014 A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm. *Nature* 509: 4–6 doi: 10.1038/nature13315

Kristensen N. P., Skalski A. W. 1998 2. Phylogeny and Palaeontology. *Lepidoptera, moths and butterflies*, 1, 7-25.

Krzywinski J. 2004 Satellite DNA From the Y Chromosome of the Malaria Vector *Anopheles gambiae*. *Genetics*, 169(1), 185–196 doi:10.1534/genetics.104.034264

Lohse K., Hayward A., Ebdon S. 2021 Darwin Tree of Life Barcoding collective; Wellcome Sanger Institute Tree of Life programme; Wellcome Sanger Institute Scientific Operations: DNA Pipelines collective; Tree of Life Core Informatics collective; Darwin Tree of Life Consortium. The genome sequences of the male and female green-veined white, *Pieris napi* (Linnaeus, 1758). *Wellcome Open Res.* Oct 26; 6: 288 doi: 10.12688/wellcomeopenres

Lohse K., Mackintosh A. 2021 Darwin Tree of Life Barcoding collective; Wellcome Sanger Institute Tree of Life programme; Wellcome Sanger Institute Scientific Operations: DNA Pipelines collective; Tree of Life Core Informatics collective; Darwin Tree of Life Consortium. The genome sequence of the large white, *Pieris brassicae* (Linnaeus, 1758). *Wellcome Open Res.* Oct 12; 6: 262. doi: 10.12688/wellcomeopenres

López-Flores I., Garrido-Ramos M. A. 2012 The Repetitive DNA Content of Eukaryotic Genomes. *Repetitive DNA*, 1–28 doi:10.1159/000337118

Lorkovic Z. 1941 Die Chromosomenzahlen in der Spermatogenese der Tagfalter. *Chromosoma* 2(1): 155-191 doi: 10.1007/BF00325958

Lu Y. J., Kochert G. D., Isenhour D.J., Adang M.J. 1994 Molecular characterization of a strain-specific repeated DNA sequence in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Molecular Biology* 3: 123–130 doi: 10.1111/j.1365-2583.1994.tb00159.x

Lukhtanov V.A. 2015 The blue butterfly *Polyommatus (Plebicula) atlanticus* (Lepidoptera, Lycaenidae) holds the record of the highest number of chromosomes in the non-polyploid eukaryotic organisms. *Comparative Cytogenetics* 7; 9(4): 683-690 doi: 10.3897/CompCytogen.v9i4.5760

Mackintosh A., Laetsch D. R., Hayward A., Charlesworth B., Waterfall M., Vila R., Lohse K. 2019 The determinants of genetic diversity in butterflies. *Nature Communications*, 10(1) doi:10.1038/s41467-019-11308-4

Mahendran B., Acharya C., Dash R., Ghosh S.K., Kundu S.C. 2006 Repetitive DNA in tropical tasar silkworm *Antheraea mylitta*. *Gene* 370: 51–57 doi: 10.1016/j.gene.2005.11.010

Makałowski W., Gotea V., Pande A., Makałowska, I. 2019 Transposable Elements: Classification, Identification, and Their Use As a Tool For Comparative Genomics. *Evolutionary Genomics*, 177–207 doi:10.1007/978-1-4939-9074-0_6

Mandrioli M., Manicardi G. C., Marec F. 2003 Cytogenetic and molecular characterization of the MBSAT1 satellite DNA in holokinetic chromosomes of the cabbage moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera). *Chromosome Research* 11: 51-56 doi: 10.1023/a:1022058032217

Marec F. 1996 Synaptonemal complexes in insects. *International Journal of Insect Morphology and Embryology* 25(3): 205-233 doi: 10.1016/0020-7322(96)00009-8

Marec F., Tothová A., Sahara K., Traut W. 2001 Meiotic pairing of sex chromosome fragments and its relation to atypical transmission of a sex-linked marker in *Ephestia kuehniella* (Insecta: Lepidoptera). *Heredity*, 87(6), 659–671 doi:10.1046/j.1365-2540.2001.00958.x

Mills R. E., Bennett E. A., Iskow R. C., Devine, S. E. 2007 Which transposable elements are active in the human genome? *Trends in Genetics*, 23(4), 183–191 doi:10.1016/j.tig.2007.02.006

Montiel E.E., Panzera F., Palomeque T., Lorite P., Pita S. 2021 Satellitome Analysis of *Rhodnius prolixus*, One of the Main Chagas Disease Vector Species. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 6052 doi: 10.3390/ijms22116052

Mora P., Vela J., Ruiz-Ruano F.J., Ruiz-Mena A., Montiel E.E., Palomeque T., Lorite P. 2020 Satellitome analysis in the ladybird beetle *Hippodamia variegata* (Coleoptera, coccinellidae) *Genes* 11: 783. doi: 10.3390/genes11070783

Muller H.J. 1964 The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research* 1: 2-9 doi: 10.1016/0027-5107(64)90047-8

Nagaraju J., Gopinath G., Sharma V., Shukla J.N. 2014 Lepidopteran sex determination: A cascade of surprises. *Sexual Development* 8: 104–112 doi: 10.1159/000357483

Nanda I., Schlegelmilch K., Haaf T., Scharl M., Schmid M. 2008. Synteny conservation of the Z chromosome in 14 avian species (11 families) supports a role for Z dosage in avian sex determination. *Cytogenet Genome Research* 122: 150–156 doi: 10.1159/000163092

Nguyen P., Carabajal Paladino L. 2016 On the neo-sex chromosomes of Lepidoptera. In: Pontarotti P (ed) *Evolutionary Biology: Convergent Evolution, Evolution of Complex Traits, Concepts and Methods*. Springer, Heidelberg, 171–185 doi: 10.1007/978-3-319-41324-2_11

Nguyen P., Sahara K., Yoshido A., Marec F. 2009 Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica*, 138(3), 343–354 doi: 10.1007/s10709-009-9424-5

Novak, 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: 792-793 doi: 10.1093/bioinformatics/btt054

Ohno S. 1973 Ancient Linkage Groups and Frozen Accidents. *Nature*, 244(5414), 259–262 doi:10.1038/244259a0

Ostertag E. M., Kazazian Jr, H. H. 2001 Biology of Mammalian L1 Retrotransposons. *Annual Review of Genetics*, 35(1), 501–538 doi:10.1146/annurev.genet.35.102401.091032

Palomeque T., Lorite P. 2008 Satellite DNA in insects: a review. *Heredity*, 100(6), 564–573 doi:10.1038/hdy.2008.24

Peona V., Palacios-Gimenez O. M., Blommaert J., Liu J., Haryoko T., Jønsson K. A., Irestedt M., Zhou Q., Jern P., Suh A. 2021 The avian W chromosome is a refugium for endogenous retroviruses with likely effects on female-biased mutational load and genetic incompatibilities. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 13, 376(1833): 20200186 doi: 10.1098/rstb.2020.0186

Pilíková A. 2019 Analýza vybraných W obohacených repetíc u předivky brslenové *Yponomeuta cagnagella* (Lepidoptera). Bc. Thesis, in Czech – 54 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Pita S., Panzera F., Mora P., Vela J., Cuadrado Á., Sánchez A., Palomeque T., Lorite P. 2017 Comparative repeatome analysis on *Triatoma infestans* Andean and Non-Andean lineages, main vector of Chagas disease. *PLOS one* 12 (7) doi: 10.1371/journal.pone.0181635

Plohl M., Meštrović N., Mravinac, B. 2012 Satellite DNA evolution. *Genome Dynamics* 7, 126–152 doi: 10.1159/000337122

Rat Genome Sequencing Project Consortium 2004 Genome sequence of the Brown Norway rat yields insights into mammalian evolution. *Nature* 2004(428): 493–521 doi: 10.1038/nature02426

- Rice W.R. 1984 Sex chromosomes and the evolution of sexual dimorphism. *Evolution: An International Journal of Organic Evolution* 38: 735-742 doi: 10.1111/j.1558-5646.1984.tb00346.x
- Rice W.R. 1987 Genetic hitchhiking and the evolution of reduced genetic activity of the Y sex chromosome. *Genetics* 116: 161- 167 doi: 10.1093/genetics/116.1.161
- Rice W.R. 1996 Evolution of the Y sex chromosome in animals. *Bioscience* 46: 331-343 doi: 10.2307/1312947
- Robinson R. 1971a Karyology of lepidoptera. *Lepidoptera genetics*. Pergamon Press, Oxford, 557–598
- Robinson R. 1971b *Lepidoptera genetics*. Pergamon Press, Oxford
- Rosolen L. A. M., Vicari M. R., Almeida M. C. 2018 Accumulation of Transposable Elements in Autosomes and Giant Sex Chromosomes of Omophoita (Chrysomelidae: Alticinae). *Cytogenetic and Genome Research* doi:10.1159/000495199
- Ruitberg C.M., Reeder D.J., Butler J.M. 2001 STRBase: A short tandem repeat DNA database for the human identity testing community. *Nucleic Acids Research* 29: 320–322 doi: 10.1093/nar/29.1.320
- Sahara K., Marec F., Traut W. 1999 TTAGG Telomeric Repeats in Chromosomes of Some Insects and Other Arthropods. *Chromosome Research* 7, 449–460 doi:10.1023/a:1009297729547
- Sahara K., Marec F., Eickhoff U., Traut, W.2003a Moth sex chromatin probed by comparative genomic hybridization (CGH). *Genome*, 46(2), 339–342 doi:10.1139/g03-003
- Sahara K., Yoshido A., Kawamura N., Ohnuma A., Abe H., Mita K., Oshiki T., Shimada T., Asano S., Bando H., Yasukochi Y. 2003b W-derived BAC probes as a new tool for identification of the W chromosome and its aberrations in *Bombyx mori*. *Chromosoma*, 112(1), 48–55 doi:10.1007/s00412-003-0245-5
- Sahara K., Yoshido A., Marec F., Fuková I., Zhang H. B., Wu C. C., Goldsmith M. R., Yasukochi Y. 2007 Conserved synteny of genes between chromosome 15 of *Bombyx mori* and a chromosome of *Manduca sexta* shown by five-color BAC-FISH. *Genome*, 50(11), 1061–1065 doi:10.1139/g07-082
- Sahara K., Yoshido A., Traut, W. 2011 Sex chromosome evolution in moths and butterflies. *Chromosome Research*, 20(1), 83–94 doi:10.1007/s10577-011-9262-z
- Schaper E., Korsunsky A., Pečerska J., Messina A., Murri R., Stockinger H., Zoller S., Xenarios I., Anisimova M. 2015 TRAL: Tandem repeat annotation library. *Bioinformatics* 31: 3051–3053 doi: 10.1093/bioinformatics/btv306

Schittenhelm R. B., Heeger S., Althoff F., Walter A., Heidmann S., Mechtler K., Lehner C. F. 2007 Spatial organization of a ubiquitous eukaryotic kinetochore protein network in *Drosophila* chromosomes. *Chromosoma* 116(4): 385-402. doi: 10.1007/s00412-007-0103-y

Śliwińska E. B., Martyka R., Tryjanowski, P. 2016 Evolutionary interaction between W/Y chromosome and transposable elements. *Genetica*, 144(3), 267–278 doi:10.1007/s10709-016-9895-0

Smit A., Hubley R., Grenn P. 2015 RepeatMasker Open-4.0. [26. 10. 2023] Dostupné online: <http://www.repeatmasker.org/>

Smith C. D., Shu S., Mungall C. J., Karpen G. H. 2007 The Release 5.1 annotation of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Science* 15; 316(5831): 1586-91. doi: 10.1126/science.1139815

Smith G. 1976 Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science*. 191: 528–535 doi: 10.1126/science.1251186

Stephan W. 1986 Recombination and the evolution of satellite DNA. *Genetics Research* 47: 167–174 doi: 10.1017/S0016672300023089

Šatović-Vukšić E., Plohl M. 2023 Satellite DNAs-From Localized to Highly Dispersed Genome Components. *Genes (Basel)*. March 17; 14 (3): 742 doi: 10.3390/genes14030742

Šichová J., Voleníková A., Dincă V., Nguyen P., Vila R., Sahara K., Marec F. 2015 Dynamic karyotype evolution and unique sex determination systems in *Leptidea* wood white butterflies. *BMC Evolutionary Biology*, 15(1) doi:10.1186/s12862-015-0375-4

Šichová J., Ohno M., Dincă V., Watanabe M., Sahara K., Marec F. 2016 Fissions, fusions, and translocations shaped the karyotype and multiple sex chromosome constitution of the northeast-Asian wood white butterfly, *Leptidea amurensis*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 118(3), 457–471 doi:10.1111/bij.12756

Talavera G., Lukhtanov V. A., Rieppel L., Pierce N. E., Vila R. 2013 In the shadow of phylogenetic uncertainty: The recent diversification of *Lysandra* butterflies through chromosomal change. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(3), 469–478 doi:10.1016/j.ympev.2013.08.004

Tanaka S., Nishida T., Ohsaki N. 2007 Sequential rapid adaptation of indigenous parasitoid wasps to the invasive butterfly *Pieris brassicae*. *Evolution*, 61(8), 1791–1802 doi:10.1111/j.1558-5646.2007.00165.x

Tobler A., Kapan D., Flanagan N. S., Gonzalez C., Peterson E., Jiggins C. D., Johnson J. S., Heckel D. G., McMillan W. O. 2004 First-generation linkage map of the warningly colored butterfly *Heliconius erato*. *Heredity*, 94(4), 408–417 doi:10.1038/sj.hdy.6800619

Toder R., Wakefield M. J., Graves, J. A. M. 2000 The minimal mammalian Y chromosome – the marsupial Y as a model system. *Cytogenetic and Genome Research*, 91(1-4), 285–292 doi:10.1159/000056858

Traut W 1976 Pachytene mapping in the female silkworm, *Bombyx mori* L. (*Lepidoptera*). *Chromosoma* 58: 275-284 doi:10.1007/s004120050366

Traut W. 1977. A study of recombination, formation of chiasmata and synaptonemal complexes in female and male meiosis of *Ephestia kuehniella* (*Lepidoptera*). *Genetica* 47(2): 135-142 doi: 10.1007/BF00120178

Traut W., Marec F. 1996 Sex Chromatin in *Lepidoptera*. *The Quarterly Review of Biology*, 71(2), 239–256 doi:10.1086/419371

Traut W., Marec F 1997 Sex Chromosome Differentiation in Some Species of *Lepidoptera* (*Insecta*). *Chromosome Research*, 5(5), 283–291 doi:10.1023/b:chro.0000038758.08263.c3

Traut W., Sahara K., Otto T. D., Marec F. 1999 Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma*, 108(3), 173–180 doi:10.1007/s004120050366

Traut W., Sahara K., Marec F. 2007 Sex Chromosomes and Sex Determination in *Lepidoptera*. *Sexual Development*, 1(6), 332–346 doi:10.1159/000111765

Traut W., Vogel H., Glöckner G., Hartmann E., Heckel D. G. 2013 High-throughput sequencing of a single chromosome: A moth W chromosome. *Chromosome Research* 110: 491–505 doi: 10.1007/s10577-013-9376-6

Trehubenko, M., 2023 Role tandemových repetič v evoluci karyotypu a degeneraci pohlavního chromozomu W u skrvnopásníka lískového (*Lomaspilis marginata*). Mgr. Thesis, in Czech 47 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Ugarkovic D. 2005 Functional elements residing within satellite DNAs. *EMBO Reports* 6(11): 1035-1039 doi: 10.1038/sj.embor.7400558

Vajnarová, T. 2022 Analýza repetitivní DNA u píďalky podzimní (*Operophtera brumata*). Bc. Thesis, in Czech – 35 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech republic.

VAN Nieuwerkerken E. J., Kaila L., Kitching I. J., Kristensen N. P., Lees D. C., Minet J., ... Simonsen T. J. 2011 Order Lepidoptera Linnaeus, 1758. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.) *Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*. *Zootaxa.*, 3148(1), 212 doi:10.11646/zootaxa.3148.1.41

van't Hof A. E., Zwaan B. J., Saccheri I. J., Daly D., Bot A. N. M., Brakefield P. M. 2005 Characterization of 28 microsatellite loci for the butterfly *Bicyclus anynana*. *Molecular Ecology Notes* 5: 169-172 doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00870.x

van't Hof A. E., Nguyen P., Dalíková M., Edmonds N., Marec F., Saccheri I. J. 2013 Linkage map of the peppered moth, *Biston betularia* (Lepidoptera, Geometridae): a model of industrial melanism. *Heredity* 110: 283–295 doi: 10.1038/hdy.2012.84

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

Vítková M., Fuková I., Kubíčková S., Marec F. 2007 Molecular divergence of the W chromosomes in pyralid moths (Lepidoptera). *Chromosome Research* 15: 917–930 doi: 10.1007/s10577-007-1173-7

Voleníková A. 2015 *Analýza pohlavních chromosomů vybraných druhů bazálních motýlů z čeledi hrotnokřídlecovití (Lepidoptera: Hepialidae)*. Mgr. Thesis, in Czech, 58 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Winnepenninckx B., Backeljau T., De Wachter R. 1993 Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends Genet. Dec*; 9(12): 407 doi: 10.1016/0168-9525(93)90102-n

Wolf K. W. 1996 The structure of condensed chromosomes in mitosis and meiosis of insects. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 25(1-2), 37–62 doi:10.1016/0020-7322(95)00021-6

Wright A. E., Dean R., Zimmer F., Mank J. E. 2016 How to make a sex chromosome. *Nature Communications*, 7(1), 12087 doi: 10.1038/ncomms12087

Yasukochi Y. 2006 A Second-Generation Integrated Map of the Silkworm Reveals Synteny and Conserved Gene Order Between Lepidopteran Insects. *Genetics*, 173(3), 1319–1328 doi:10.1534/genetics.106.055541

Yoshido A., Marec F., Sahara K. 2005 Resolution of sex chromosome constitution by genomic in situ hybridization and fluorescence in situ hybridization with (TTAGG) n telomeric probe in some species of Lepidoptera. *Chromosoma*, 114(3), 193–202 doi:10.1007/s00412-005-0013-9

Yoshido A., Šichová J., Pospíšilová K., Nguyen P., Voleníková A., Šafář J., Provazník J., Vila R., Marec, F. 2020 Evolution of multiple sex-chromosomes associated with dynamic genome reshuffling in *Leptidea* wood-white butterflies. *Heredity* doi:10.1038/s41437-020-0325-9

Yoshimura A., Nakata A., Mito T., Noji S. 2006 The characteristics of karyotype and telomeric satellite DNA sequences in the cricket, *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera, Gryllidae). *Cytogenetic and Genome Research* 112(3-4): 329-336 doi: 10.1159/000089889

Zhu Y., Dai J., Fuerst P. G., Voytas, D. F. 2003 Controlling integration specificity of a yeast retrotransposon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(10), 5891–5895 doi:10.1073/pnas.1036705100

Zrzavá M., Hladová I., Dalíková M., Šichová J., Ůunap E., Kubíčková S., Marec F. 2018 Sex Chromosomes of the Iconic Moth *Abraxas grossulariata* (Lepidoptera, Geometridae) and Its Congener *A. sylvata*. *Genes*, 9 (6), 279 doi: 10.3390/genes9060279