

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
České Budějovice 2008



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Identifikace genů chromosomu Z pro studium evoluce pohlavních  
chromosomů motýlů

Autor: Jan Provazník  
Vedoucí práce: Prof. RNDr. František Marec CSc.  
Rok vypracování: 2008

Provazník J., 2008: Identifikace genů chromosomu Z pro studium evoluce pohlavních chromosomů motýlů. [Identification of Z-linked genes for the study of sex chromosome evolution in Lepidoptera. Bc.Thesis, in Czech] - 22 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

#### Annotation:

Moths and butterflies (Lepidoptera) have a WZ/ZZ (female/male) sex chromosome system or its numerical variants. The non-recombining W chromosome is largely formed by heterochromatin, composed of repetitive DNA and almost free of genes. Its use for evolutionary studies is thus limited due to fast molecular divergence. Whereas the Z chromosome resembles to autosomes; it is rich in genes and thus expected to be more conserved. In this study, the Z-linked genes with available DNA sequence information are summarized in order to give reference to suitable candidates for the study on evolutionary history of sex chromosomes in Lepidoptera. The use of Z-linked genes to test current hypotheses on the origin of the lepidopteran W chromosome is also discussed.

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

Finanční podpora: práce byla financována z grantu Grantové agentury ČR, reg. č. 206/06/1860.

## PROHLÁŠENÍ

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

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

V Českých Budějovicích dne 6.května 2008

.....  
Jan Provazník

## Poděkování:

Na tomto místě bych si dovolil poděkovat především svým drahým rodičům a rozmilé rodině za veškerou péči, podporu a lásku, kterou mi doposud nezištně poskytovali, za umožnění studia na univerzitě a za neopakovatelnou domácí atmosféru, která je pro mě zdrojem inspirace a radosti. Dále bych velice rád poděkoval svému školiteli Františku Marecovi za trpělivost, za to že se mne ujal, rozšířil mé znalosti a poskytl mi možnost pracovat na zajímavém tématu. Také chci poděkovat vynikajícímu kolektivu v laboratoři a přilehlých místnostech za skvělé pracovní podmínky a přátelský přístup. V neposlední řadě jsem pak velice vděčen své přítelkyni za veškerou podporu a pomoc a za harmonický vztah, který je mi oporou a útočištěm. Nakonec nesmím zapomenout na své přátele, kteří mě jako povedená čertova kvítka provázeli celým studiem. Tak tedy: Děkuji!

1. Úvod .....	1
1.1. Systémy pohlavních chromosomů .....	1
1.2. Obecné mechanismy evoluce pohlavních chromosomů .....	1
2. Pohlavní chromosomy motýlů .....	3
2.1. Chromosom W .....	3
2.2. Chromosom Z .....	4
2.3. Sex chromatin .....	5
2.4. Konstituce pohlavních chromosomů chrostíků a motýlů .....	6
3. Hypotézy o vzniku pohlavního chromosomu W u motýlů .....	7
3.1. Hypotéza o autosomálním původu W (Traut & Marec 1996) .....	7
3.2. Hypotéza o vzniku W z B-chromosomu (Lukhtanov 2000) .....	9
4. Cíle práce .....	10
5. Identifikace genů Z chromosomu .....	11
5.1. Metodika .....	11
5.2. Výsledky .....	11
6. Diskuze .....	15
7. Souhrn .....	16
8. Literatura .....	17

# 1. Úvod

Pohlavní rozmnožování s jistým stupněm dimorfismu gamet je víceméně univerzální pro většinu eukaryotických organismů. Gamety mohou být produkovány jedním jedincem (pak hovoříme o kosexualitě / hermafroditismu), nebo jsou produkovány dvěma jedinci (pak se jedná o gonochorismus / dvoudomost). U většiny živočichů převažuje gonochorismus, zatímco hermafroditismus je běžný u rostlin a některých bezobratlých živočichů. Nejběžnějším mechanismem určení pohlaví je pak systém rozdílných pohlavních chromosomů. Tedy takových chromosomů, které nesou pohlaví determinující geny ("sex-determining genes"; SDG) a svou aktivitou tedy rozhodují o pohlaví jedince (Charlesworth 1991; shrnuto v práci Vítková 2007).

## 1.1. Systémy pohlavních chromosomů

Známe dva hlavní systémy pohlavních chromosomů. Tím nejznámějším a nejrozšířenějším je situace, kdy je heterogametické pohlaví samčí - samec má tedy konstituci pohlavních chromosomů XY nebo X0, samička pak XX. Tento systém se nazývá typ *Drosophila* podle *D. melanogaster*. Typ *Drosophila* je běžný u většiny řádů hmyzu a všech savců včetně člověka. Je známý dokonce i u stromu *Ginkgo biloba* (jinan dvoulaločný) (Lee 1954, Charlesworth 1991). Opakem je systém, kdy je samice heterogametická a má konstituci pohlavních chromosomů WZ nebo Z0, samec chromosomy ZZ – typ *Abraxas* podle *Abraxas glossulariata* (píd'alka angreštová). Tento systém je běžný u ptáků (Pigozzi 1999; Ellegren 2000), hadů (Jones & Singh 1985) a také se objevuje u některých dalších plazů, obojživelníků a ryb (Wallace *et al.* 1999, Graves & Shetty 2001, Schmid and Steinlein 2001, Schartl 2004). Nedávno byl WZ systém popsán i u parazitických motolic čeledi Schistosomatidae (Špakulová & Casanova 2004). Je uváděn i u několika druhů rostlin, kde však nebyl dosud jednoznačně prokázán (Vyskot & Hobza 2004). U hmyzu se heterogametické samice vyskytují pouze u jediné vývojové větve, taxonu Amphiesmenoptera, tvořeného dvěma sesterskými řády: Trichoptera (chrostíci) a Lepidoptera (motýli) (Traut & Marec 1996, Morse 1997).

## 1.2. Obecné mechanismy evoluce pohlavních chromosomů

Všeobecně se usuzuje, že se pohlavní chromosomy vyvinuly z páru homologních autosomů, které získaly gen nebo skupinu genů, determinující pohlaví jedince (SDG). Postupnou evolucí nebo přenosem z chromosomů určujících pohlaví se na nových pohlavních chromosomech sdružují pohlavně antagonistické geny (tedy ty, které prospívají jednomu pohlaví, na úkor druhého). V této situaci, je evolučně velmi výhodné zabránit rekombinaci mezi pohlavními chromosomy, tak aby nedošlo ke ztrátě výhod dvou oddělených pohlaví a ke kumulaci (pro dané pohlaví) nevýhodných genů. Důsledkem restrikce rekombinace, která může být na úrovni pohlavních chromosomů, nebo

dokonce všech chromosomů heterogametického pohlaví (známé u řádů Lepidoptera a Diptera; viz Marec 1996), je pak mimo jiné degenerace chromosomů Y nebo W (Charlesworth *et al.* 2005, Bachtrog 2006, Vítková 2007).

Degenerace chromosomů Y/W je pravděpodobně způsobena několika souběžně působícími mechanismy či jevy. Jedním z nich je proces známý jako „Mullerova rohatka“, jev který popisuje nenávratnost škodlivých mutací v místech, kde nedochází k rekombinaci nebo kde je možnost rekombinace limitována. Při vzniku takové mutace by se chromosom dostal do původního stavu pouze velmi nepravděpodobnou zpětnou mutací v přesně stejném místě. Dalším mechanismem, podílejícím se na degeneraci chromosomů Y/W je pak genetický draft („hitchhiking“). Gen na chromosomu Y/W se v případě těsné vazby na silně preferovaný gen v populaci rychle šíří a je fixován i přesto, že nese četné mutace (Bachtrog 2006, Vítková 2007).

## 2. Pohlavní chromosomy motýlů

Řády Trichoptera a Lepidoptera jsou díky mnoha synapomorfním znakům považovány za sesterské linie a dohromady tvoří nadřád Amphiesmenoptera (Morse 1997). Mezi společné znaky patří právě heterogametické samice a některé unikátní cytogenetické vlastnosti. Jednou z těchto vlastností je achiasmatická meiosa samic, při které nedochází k rekombinaci u pohlavních, ale ani u žádných jiných chromosomů.

Achiasmatická meiosa probíhá následovně: fáze leptotene a zygotene probíhají u samic stejně jako u samců, v pachytene nedochází ke crossing-overu a po pachytene se tudíž neformují chiasmata. K diplotene a diakinesa nedochází, místo nich pokračuje modifikovaná verze pachytene. Bivalenty se zkracují a ztlušťují až do metafáze I, kde zůstávají spojeny díky "eliminačnímu chromatinu", který nahrazuje synaptonemální komplex. Eliminační chromatin je barvitelný DNA-nespecifickými barvivy. Tato náhrada synaptonemálního komplexu během anafáze I zůstává v ekvatorialní rovině, zatímco homologní chromosomy se posouvají k pólům (shrnuto v pracích Marec 1996 a Traut *et al.* 2008).

Chromosomy motýlů (a podobně i chrostíků) vykazují pro cytogenetika mnohá úskalí: jsou ve srovnání s chromosomy obratlovců velmi malé (oproti lidským cca 1/10 velikosti), uniformní a je jich zpravidla hodně – výchozím počtem je  $n=31$  u motýlů a  $n=30$  u chrostíků, navíc jsou u celé skupiny Amphiesmenoptera chromosomy holokinetického typu, tedy bez jasně definované centromery (Robinson 1971, Wolf *et al.* 1997, De Prins & Saitoh 2003). Kinetochory pokrývají značnou část povrchu (Wolf 1996, shrnuto v práci Nguyen 2006). To spolu s tím, že není možné používat standardních metod proužkování značně komplikuje aplikaci běžných cytogenetických metod, používaných u jiného hmyzu a u obratlovců a je také hlavním důvodem, proč je zatím detailně cytogeneticky prozkoumáno relativně malé množství (asi 40) z celkem asi 130 000 druhů motýlů; viz Traut *et al.* (2008). Základní mechanismus určení pohlaví, tj. heterogametické samice, je společnou vlastností chrostíků i motýlů. Chromosom W je specialitou motýlů, zatímco pro chrostíky je typický systém Z0/ZZ (Traut & Marec 1996, Marec & Novák 1998).

### 2.1. Chromosom W

Chromosom W je obdobou chromosomu Y, s nímž se shoduje ve většině obecných znaků. Nachází se na něm řada repetitivních sekvencí, celá řada LTR ("long terminal repeat") i non-LTR retrotransponů, DNA transponů a jejich derivátů (Abe *et al.* 2005), které jsou sice rozptýleny po celém genomu, avšak na W chromosomu je jejich zastoupení nesrovnatelně větší (Traut *et al.* 1999, Sahara *et al.* 2003, Mediouni *et al.* 2004, Fuková *et al.* 2007, Vítková *et al.* 2007). Obsahuje však i sekvence unikátní pro W chromosom. Jak ve své práci ukázali Fuková *et al.* (2007).

Největší znalosti o molekulárním složení motýlího chromosomu W jsou u bource morušového (*Bombyx mori*) (Abe *et al.* 2005).

Z práce Sahara *et al.* (2003) vyplývá uniformita složení chromosomu W u *B. mori*. Sahara a jeho tým použili pro značení chromosomu W sondy vytvořené ze čtyř klonů BAC (“bacterial artificial chromosome”). Přestože délka takové sondy je proti celému chromosomu velmi malá (cca 1% viz citovaná práce), stačila jedna, aby označila celý chromosom W. Autoři to vysvětlují tím, že sonda obsahuje repetitivní sekvence, které jsou rozprostřeny po celém chromosomu W. Osekvenováním jednoho BAC bylo zjištěno, že většina těchto repetitivních sekvencí jsou různé transposony.

Dosud se na chromosomu W nepodařilo najít žádnou celou sekvenci funkční genu, přesto se však předpokládá, že chromosom W motýlů nese nějaké geny. Gen determinující velikost vajíček (“egg size-determining gene”, *Esd*) byl objeven u *B. mori*. (Kawamura *et al.* 1988, 1990). Gen pro protein *Period* regulující cirkadiální rytmy se běžně vyskytuje na chromosomu Z. U martináče *Antheraea pernyi* se však jeho kopie našly i na chromosomu W (Gotter *et al.* 1999). Předpokládá se také, že na chromosomu W jsou geny, které hrají roli při determinaci pohlaví. Jedním z nich je *Fem* (feminizující faktor), tedy gen, který je zodpovědný za to, že absence / presence chromosomu W určuje pohlaví u *B. mori* (Tazima 1964, Ohbayashi *et al.* 2002). Gen *Fem* se dosud nepodařilo přesně lokalizovat. Práce kolektivu Fuji & Shimada (2007) však zúžila okruh pravděpodobných míst, kde bude třeba gen *Fem* na chromosomu W hledat.

Chromosom W prodělává díky své konstituci a zmiňované restrikci rekombinace rychlý vývoj a i u blízce příbuzných druhů dochází k rychlé divergenci, jak bylo potvrzeno pomocí druhově-specifických sond pro FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) v práci Vítková *et al.* (2007). Vzhledem k těmto vlastnostem je sledování evoluce W chromosomu, pomocí metod zaměřených jen na tento chromosom, více než obtížné.

## 2.2. Chromosom Z

Tak jako je chromosom W obdobou Y, je chromosom Z obdobou X. Obsahuje mnoho transkripčně aktivních genů a téměř se neodlišuje od autosomu (Traut *et al.* 2008). Celkově je však o něm známo velmi málo. Kromě bource morušového (Yoshido *et al.* 2005a, Yasukochi *et al.* 2006) byl chromosom Z zkoumán jen u několika druhů, jmenovitě u zavíječe kukuřičného, *Ostrinia nubilalis* (Dopman *et al.* 2004), a motýlů *Heliconius melpomene* (Jiggins *et al.* 2005) a *Heliconius erato* (Tobler *et al.* 2005), u kterých byly vytvořené jeho vazebné mapy. Nejvíce je opět známo o chromosomu Z *B. mori*, u kterého byl celý genom osekvenován nezávisle čínskými i japonskými laboratořemi. Vzhledem ke kompozici chromosomu W a problémům, který by jeho obsah mohl přinést při sekvenování, byli na sekvenaci genomu *B. mori* použiti pouze samci a chromosom Z je



tedy poměrně dobře zdokumentován (Mita *et al.* 2004, Xia *et al.* 2004).

Z experimentálních dat vyplývá, že u motýlů nedochází ke kompenzaci dávky genů na chromosomu Z u samců. Potvrzují to například studie na motýlech *H. melpomene* a *H. erato*, kde byla prokázána dvojnásobná aktivita enzymu 6-fosfoglukanát dehydrogenázy (gen *6-PGD*, viz kapitola 5.2.) u samců ve srovnání se samicemi (Johnson & Turner 1979). Podobné pokusy se stejným výsledkem byly provedeny i u *B. mori* a *A. pernyi* (Suzuki *et al.* 1998, 1999; Gotter *et al.* 1999).

Zkoumání syntenie izolovaných genů mezi *B. mori*, *Drosophila melanogaster* a *Caenorhabditis elegans* odhalilo, že pořadí genů u těchto druhů není konzervované a Koike *et al.* (2003) se domnívají, že pohlavní chromosomy *D. melanogaster* se vyvíjely nezávisle a několikrát došlo k promíchání pořadí jejich genů. Výjimku tvoří skupina tří genů (*Bmkettin*, *Bmtittin1* a *Bmtittin2*), která má zachované pořadí u všech tří druhů (Koike *et al.* 2003). V rámci řádu Lepidoptera je však situace odlišná. Podle dosavadních výzkumů se zdá, že pořadí genů na chromosomu Z a na autosomech je konzervované jak mezi druhy z příbuzných čeledí (*B. mori*: Bombycidae; *Manduca sexta*: Sphingidae), tak mezi druhy, které jsou vývojově vzdáleny (*B. mori* a *H. melpomene*: Nymphalidae) (Yasukochi *et al.* 2006, Pringle *et al.* 2007, Sahara *et al.* 2007).

### 2.3. Sex chromatin

U 80% druhů řádu Lepidoptera se u samic v interfázním jádru objevuje heterochromatinové tělísko, zvané sex chromatin. Nejedná se však o obdobu Barrova tělíska samic savců, neboť u motýlů je sex chromatin tvořen četnými kopiemi chromosomu W. Nejde tedy o formu kompenzace dávky genů jako je tomu v případě Barrova tělíska u savců. Ve většině samičích tkání se sex chromatinové tělísko nachází jen jedno a s rostoucí polyploidizací jádra se zvětšuje (Traut & Marec 1996, Traut *et al.* 2008). Původ sex chromatinu byl prokázán například i díky metodě CGH (“Comparative Genomic Hybridization”), která barvila sex chromatin stejně jako chromosom W, ale zejména díky specifické malovací sondě pro chromosom W, připravené ze sex chromatinu laserovou mikrodisekcí; tato sonda barvila jak sex chromatin, tak i celý chromosom W (Fuková *et al.* 2007, Vítková *et al.* 2007). Autoradiografické studie naznačují, že W-chromatin je transkripčně neaktivní, nebo alespoň signifikantně méně aktivní než euchromatin somatických buněk (Traut & Scholz 1978). V souladu s evolučním pohledem na chromosom W je absence sex chromatinu u řádu Trichoptera a u primitivních motýlů, tedy tam, kde je Z0/ZZ systém chromosomální determinace pohlaví. Praktické využití sex chromatinu je velké. Poskytuje jednoduchý způsob, jak rozpoznat pohlaví u mladých stádií motýlů. Je též dobrým indikátorem aberací pohlavních chromosomů, jelikož jeho vzhled je úzce vázán na strukturu chromosomu W (shrnuto v Traut & Marec 1996).

#### 2.4. Konstituce pohlavních chromosomů chrostíků a motýlů

Jak již bylo řečeno, heterogametické samiččí pohlaví je charakteristické pro celý nadřád Amphiesmenoptera. Všichni dosud studovaní zástupci řádu Trichoptera (chrostíci), který je sesterským řádem pro Lepidoptera (motýli) sdílí konstituci Z0/ZZ i s primitivními druhy motýlů, jako je například *Micropterix calthella* (Micropterigidae). Konstituce Z0/ZZ je tedy považována za výchozí podobu systému pohlavních chromosomů nadřádu Amphiesmenoptera (Traut & Marec 1997, Marec & Novák 1998). Stavem převažujícím u naprosté většiny zatím zkoumaných motýlů je konstituce WZ/ZZ. Nedá se však říci, že by taxony odvozenějších motýlů (skupina Tischeriidae, u které je poprvé pozorována konstituce WZ/ZZ, plus skupina Ditrysia, zahrnující největší část motýlů), byly v konstituci pohlavních chromosomů uniformní. U několika druhů se vyskytuje konstituce Z0/ZZ. Pozorovány byly i systémy mnohonásobných pohlavních chromosomů  $W_1W_2Z/ZZ$  a  $WZ_1Z_2/Z_1Z_1Z_2Z_2$  (Yoshido *et al.* 2005b, Traut *et al.* 2008). Přehled současných poznatků o výskytu jednotlivých konstitucí pohlavních chromosomů u vývojové větve Amphiesmenoptera je shrnut v **Obrázku 1**.

### 3. Hypotézy o vzniku pohlavního chromosomu W u motýlů

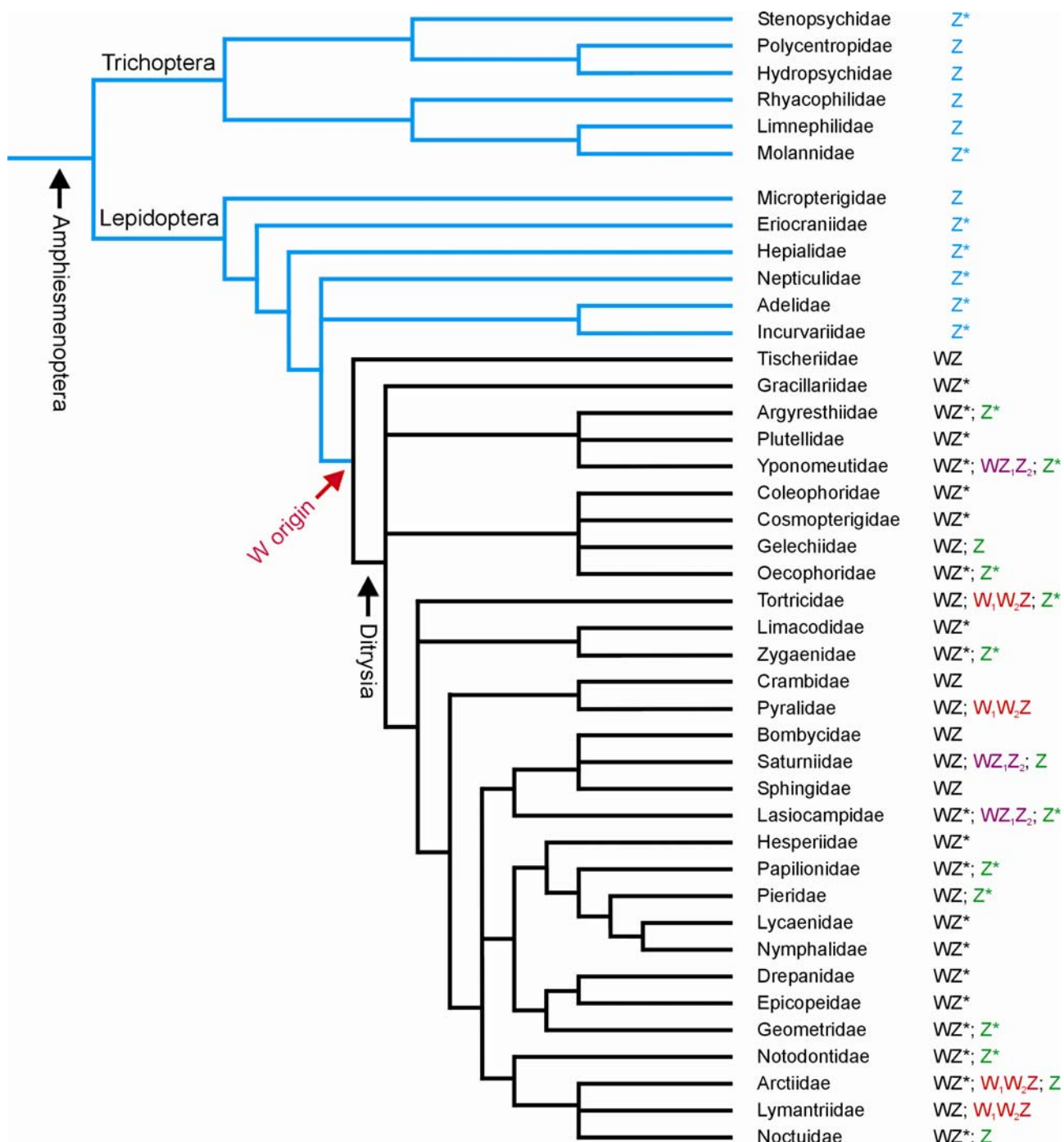
V zásadě existují dvě hlavní hypotézy o vzniku chromosomu W. První z nich formulovali Traut & Marec (1996), druhou pak Lukhtanov (2000). Obě hypotézy jsou založeny na předpokladu, že primitivní motýli a *Trichoptera* sdílí absenci chromosomu W a systém Z0/ZZ je tedy ancestrálním znakem. Obě hypotézy se na základě prokázané přítomnosti sex chromatinu shodují v tom, že se chromosom W objevil u společného předka skupin *Ditrysia* (většina motýlů) a *Tischeriina*. Liší se však v názoru na jeho původ.

Důležitou úlohu při formulování současných hypotéz hrálo objevení sex chromatinu (popsán v kapitole 2.3.). Sex chromatin je narozdíl od motýlích chromosomů dobře pozorovatelný světelným mikroskopem a jeho identifikace v tkáních samic je jednoduchá. Není tedy překvapením, že počet druhů motýlů s popsáním sex chromatinem značně převyšuje počet druhů, u kterých jsou dostupné ucelenější poznatky o pohlavních chromosomech. Pro srovnání: Traut & Marec (1996) uvádí 238 druhů s prozkoumaným sex chromatinem, naproti tomu systém pohlavních chromosomů je znám u přibližně 40 druhů (Traut & Marec, 2008). Právě absence sex chromatinu, jako společný znak řádu Trichoptera a primitivních motýlů, je jedním ze stěžejních důkazů, podporující hypotézy o původnosti Z0/ZZ konstituce.

#### 3.1. Hypotéza o autosomálním původu W (Traut & Marec 1996)

Dle této hypotézy nejdříve došlo k fúzi původního chromosomu Z s autosemem za vzniku tzv. chromosomu neo-Z. Zbylý autosom se dále pároval během meiózy s homologní částí chromosomu neo-Z a segregoval tak k druhému pólu vřeténka. Tím se dědil pouze z matky na dceru, pozbyl možnost rekombinace a stal se chromosomem W. Tuto hypotézu podporuje existence podobného mechanismu při vzniku neo-pohlavních chromosomů např. u štetconoše trnkového, *Orgyia antiqua* (Traut & Marec 1997). Dále by tuto hypotézu bylo možné podpořit prokázáním zachované syntenie genů části chromosomu Z vyšších motýlů a chromosomu Z primitivních motýlů a zároveň zachované syntenie genů jednoho z autosomů primitivních motýlů a části chromosomu Z vyšších motýlů.

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.4., konstituce WZ/ZZ není u vyspělejších motýlů jediná (viz **Obrázek 1.**). Traut & Marec (1996) se ve své práci zabývají i možným vznikem odvozených systémů pohlavních chromosomů. Systém Z0/ZZ, který se znovu objevuje například u jarnice hladké, *Orthosia gracilis* (Noctuidae), autoři vysvětlují jako sekundární ztrátu chromosomu W. Systémy mnohonásobných pohlavních chromosomů  $W_1W_2Z/ZZ$  a  $WZ_1Z_2/Z_1Z_1Z_2Z_2$ , mohou teoreticky vznikat buď rozpadem chromosomu W či Z nebo fúzí jednoho z pohlavních chromosomů s autosemem za vzniku neo-W či neo-Z, zatímco zbývající autosom se stává chromosomem  $W_2$  nebo  $Z_2$  (Traut *et al.* 2008).



**Obrázek 1.** Současný pohled na fylogenezi pohlavních chromosomů motýlů. Pravý sloupec reprezentuje souhrn konstitucí pohlavních chromosomů samic dané skupiny. Konstituce odvozené pozorováním W-chromatinu jsou označeny hvězdičkou (\*). Údaje o pohlavních chromosomech a sex chromatinu převzaty ze souhrnných publikací Traut and Marec (1996), Traut *et al.* (2008) a z původních publikací Marec & Novák (1998) a Lukhtanov (2000). Kladogram skupiny Trichoptera je založen na práci Morse (1997), kladogram skupiny Lepidoptera na práci Kristensen & Skalski (1999). Upraveno dle pracovní verze kladogramu (F. Marec, připravováno do tisku).

### 3.2. Hypotéza o vzniku W z B-chromosomu (Lukhtanov 2000)

Lukhtanov (2000) ve své práci dává přednost alternativní hypotéze vzniku chromosomu W. Tvrdí, že neo-W chromosom vzniká z B-chromosomu. B-chromosom je nadbytečný chromosom, jehož přítomnost v organismu není letální. Takový nadbytečný chromosom by se opravdu mohl začít párovat s Z chromosomem (za předpokladu výchozího stavu Z0/ZZ), například během pozdní pachytene, kdy se chromosomy snaží párovat tak říkajíc “za každou cenu“ (tento jev je nazýván heterosynapse; Marec 1996).

Problém, který však Lukhtanov neřeší je vznik B-chromosomu. Jednou z možných cest, kterou by B-chromosom mohl vzniknout je rozpad některého z chromosomů a následná chybná segregace jednoho z fragmentů, čímž by se tento fragment stal v další generaci nadbytečným. Vzhledem k holokinetické povaze chromosomů motýlů a tomu, že jejich kinetochory pokrývají velkou část povrchu, je možné, že by se fragment pravidelně dědil. U motýlů byly však dosud pozorovány B-chromosomy pouze u *O. antiqua* (Rego & Marec 2003). Problém nastává s experimentálním podpořením této hypotézy. Testování homologie hypotetického B-chromosomu a chromosomu W se zdá být velice obtížné, vzhledem k množství repetice, které komplikují sekvenování W a dále k relativně rychlé molekulární divergenci existujících chromosomů W (Abe *et al.* 2005, Vítková *et al.* 2007).

#### 4. Cíle práce

Cílem práce bylo zmapovat problematiku evoluce pohlavních chromosomů motýlů se zaměřením na Z chromosom, dále najít co nejvíce dostupných genů, které by mohly posloužit jako budoucí markery na hledání případné syntenie mezi chromosomem Z vyšších motýlů a autosomy nižších motýlů. V případě nalezení takové syntenie by bylo velmi pravděpodobné, že neo-Z a neo-W chromosomy vznikly právě fúzí původního chromosomu Z s autosomem. Tím by byla podpořena hypotéza Traut & Marec (1996). Vzhledem k tomu, že nejkompexnější informace o chromosomu Z jsou známy u druhu *Bombyx mori*, (Koike *et al.* 2003, Yasukochi *et al.* 2006) stal se právě bourec dobrým výchozím bodem.

## 5. Identifikace genů chromosomu Z

### 5.1. Metodika

Hlavní metodou užitou při vyhledávání genů bylo využití dostupné literatury, internetových databází (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), využití srovnávací metody BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”, reference v Altschul *et al.* 1990), tedy vyhledávání sekvencí nukleotidů / aminokyselin na základě podobnosti se známou sekvencí. Hlavním kritériem při výběru bylo potvrzené umístění na chromosomu Z nebo alespoň jeho odůvodněný předpoklad. Preferovány byly ty geny, u kterých bylo možno dohledat citaci a tedy důvěryhodný zdroj. Uvedeny jsou i nepublikované sekvence genů, které byly nalezeny na internetových databázích pomocí technologie BLAST, u kterých se pro sekvenci podobnou známým genům předpokládá, že jsou na chromosomu Z. Tam, kde to bylo možné, byly sekvence ověřeny v databázi genomu *B. mori* - Kaikoblast (<http://kaikoblast.dna.affrc.go.jp/>)

### 5.2. Výsledky

Jak již bylo řečeno, výchozím bodem byl pro dostupnost informací o chromosomu Z *Bombyx mori*. V práci Koike *et al.* 2003 byl osekvenován 320 kbp dlouhý segment chromosomu Z. V tomto segmentu bylo identifikováno celkem 14 ortologů známých genů (**Tab. 1**). Sekvence jednoho z těchto ortologů, genu pro protein Kettin, byly zjištěny u 4 dalších druhů motýlů (**Tab. 2**).

**Tab. 1.** Ortology na chromosomu Z u *Bombyx mori* podle Koike *et al.* (2003)

Jméno ortologu	Accession no.	Délka sekvence	Produkt
<i>Bmfkbp13</i>	AB079859	3002 bp	Cis-transisomeráza, chaperon
<i>Bmhpa</i>	AB079860	4339 bp	
<i>Bmhig</i>	AB079861	13140 bp	Gen ovlivňující vývoj CNS pro pohybové ústrojí
<i>Bm6922</i>	AB079862	3845 bp	
<i>Bmlap</i>	AB079863	1680 bp	Aminopeptidáza
<i>Bmprojectin</i>	AB079864	4008 bp	Svalový protein
<i>Bmkettin</i>	AB079865	29280 bp	Modulární protein Z-disků
<i>Bmtitin1</i>	AB079866	20360 bp	Svalový protein
<i>Bmtitin2</i>	AB079867	23640 bp	Svalový protein
<i>Bmmiple</i>	AB079868	6900 bp	Růstový faktor, vážící se na heparin
<i>Bmsyx6</i>	AB079869	6834 bp	Intercelulární transport vezikul, t-SNARE
<i>Bm PM-Scl</i>	AB079870	13160 bp	Transkripční faktor
<i>Bmtkz</i>	AB079871	15701 bp	Tyrosinkináza
<i>BmubcD4</i>	AB079872	4687 bp	Ubiquitin konjugující enzym

**Tab. 2.** Přehled sekvencí genů pro kettin v řádu Lepidoptera. Zdroj: NCBI

Druh	Accession no.	Délka sekvence	Citace	Produkt
<i>Papilio glaucus</i>	EF115361	1191 bp	Putnam <i>et al.</i> 2007	kettin
<i>Papilio canadiensis</i>	EF115340	1191 bp	Putnam <i>et al.</i> 2007	kettin
<i>Papilio multicaudatus</i>	EF115363	1099 bp	Putnam <i>et al.</i> 2007	kettin
<i>Helicoverpa armigera</i>	AY253869	1267 bp	Niu <i>et al.</i> <sup>1</sup>	kettin
<i>Helicoverpa armigera</i>	EU109282	13365 bp	Qi <i>et al.</i> <sup>2</sup>	HaKettin1

<sup>1</sup> - Niu B, Weng H, Meng Z, Chen D - nepublikováno

<sup>2</sup> - Qi X, Niu B, He L, Weng H, Liu Y, Shen W, Meng Z: cDNA cloning and analysis of deduced amino acid sequence and expression of *HaKettin1* gene from *Helicoverpa armigera* - nepublikováno

V práci Kanga *et al.* (2001) je popsána hypotéza, podle které je resistance obaleče východního, *Grapholita molesta* (Tortricidae) vůči karbamátovým insekticidům pohlavně vázaná na chromosom Z. Autoři se domnívají, že jedním z genů zodpovědným za resistenci je mutovaný gen pro enzym acetylcholinesterázu (AChE, EC 3.1.1.7) a z experimentálního křížení vyvozují, že se tento gen nachází právě na chromosomu Z. Gen má dvě formy označované jako *ace1* a *ace2* (Moores *et al.* 1996). **Tabulka 3** je shrnutím nalezených genů pro AChE v řádu Lepidoptera. Zdrojem byla databáze NCBI.

**Tab. 3.** Přehled sekvencí genů pro AChE v řádu Lepidoptera. Zdroj: NCBI

Druh	Accession no.	Délka sekvence	Citace	Ortolog
<i>Chilo suppressalis</i>	EF470245	2472 bp	Qu <i>et al.</i> <sup>1</sup>	neupřesněno
<i>Chilo suppressalis</i>	EF453724	2521 bp	Jiang <i>et al.</i> <sup>2</sup>	<i>ace1</i>
<i>Bombyx mandarina</i>	EU262633	2423 bp	Li <i>et al.</i> <sup>3</sup>	<i>ace1</i>
<i>Bombyx mandarina</i>	EU262632	2475 bp	Li <i>et al.</i> <sup>3</sup>	<i>ace2</i>
<i>Bombyx mori</i>	EU328261	2052 bp	Li <i>et al.</i> <sup>3</sup>	<i>ace1</i>
<i>Bombyx mori</i>	EU328262	1917 bp	Li <i>et al.</i> <sup>3</sup>	<i>ace2</i>
<i>Bombyx mori</i>	DQ186605	2240 bp	Shang <i>et al.</i> <sup>4</sup>	<i>ace1</i>
<i>Bombyx mori</i>	DQ186606	3851 bp	Shang <i>et al.</i> <sup>4</sup>	<i>ace1</i>
<i>Plutella xylostella</i>	AY061975	2049 bp	Ni <i>et al.</i> (2003)	neupřesněno
<i>Helicoverpa assulta</i>	AY817736	2387 bp	Lee <i>et al.</i> (2006)	neupřesněno

<sup>1</sup> - Qu M, Jiang X, Han Z, Xu X, Chen M, - nepublikováno

<sup>2</sup> - Jiang XJ, Han ZJ - nepublikováno

<sup>3</sup> - Li B, Wu YD, Wang D, Zhao HQ, Xu YX, Wei ZG, Shen WD - nepublikováno

<sup>4</sup> - Shang JY., Zhang CX, Tang ZH - nepublikováno



Yasukochi *et al.* (2006) uvádí zachovanou syntenii mezi chromosomy Z u *B.mori* a *H. melpomene* pro geny *Tpi* a *Apterous*. *Tpi* je gen pro enzym triosafosfátisomeráza (EC 5.3.1.1), který se účastní glykolýzy a je přítomen prakticky u všech organismů, u kterých dochází ke glykolýze. Tento enzym má na starosti přesmyk dihydroxyacetonfosfátu na glycerinaldehyd 3–fosfát. *Apterous* je gen kódující protein z LIM rodiny. Proteiny z této rodiny regulují ontogenetický vývoj jedince. *Apterous* je zodpovědný za vývoj křídel (Cohen *et al.* 1992). Výsledky hledání sekvencí těchto genů jsou uvedeny v **Tabulce 4**.

**Tab. 4.** Přehled sekvencí genů pro *Apterous* a *Tpi* v řádu Lepidoptera. Zdroj: NCBI

Druh	Accession no.	Délka sekvence	Citace	Ortolog
<i>Bombyx mori</i>	AY734490	2874 bp	Niu <i>et al.</i> <sup>1</sup>	<i>Tpi</i>
<i>Helocoverpa armigera</i>	AY736358	2239 bp	Niu <i>et al.</i> <sup>1</sup>	<i>Tpi</i>
<i>Heliothis virescens</i>	U23080	1184 bp	Lodgson <i>et al.</i> (1995)	<i>Tpi</i>
<i>Bombyx mori</i>	AB024903	522 bp	Matsuoka & Fujiwara (2000)	<i>Apterous</i>
<i>Precis coenia</i>	L42140	591 bp	Carroll <i>et al.</i> 1994)	<i>Apterous</i>

<sup>1</sup> - Niu BL, Meng ZQ, Lu SL – nepublikováno

U motýlů byl nalezen i gen *period*, původně objevený u *D. melanogaster*, který se podílí na regulaci cirkadiánních rytmů. Známé sekvence pro ortology tohoto genu u motýlů jsou shrnuty v **Tabulce 5**.

**Tab. 5.** Přehled sekvencí ortologů pro *period* v řádu Lepidoptera. Zdroj: NCBI

Druh	Accession no.	Délka sekvence	Citace	Ortolog
<i>Bombyx mori</i>	DQ393413	3714 bp	Iwai <i>et al.</i> 2006	<i>Period</i>
<i>Bombyx mori</i>	AB179829	3827 bp	Takeda <i>et al.</i> <sup>1</sup>	<i>Period</i>
<i>Bombyx mori</i>	AB179830	3812 bp	Takeda <i>et al.</i> <sup>1</sup>	<i>Period</i>
<i>Bombyx mori</i>	AB184964	9356 bp	Atsumi <i>et al.</i> <sup>2</sup>	<i>Period</i>
<i>Mamestra brassicae</i>	AY485221	3017 bp	Merlin <i>et al.</i> 2006	<i>Period</i>
<i>Janiodes sp.</i>	AF063436	1008 bp	Regier <i>et al.</i> 1998	<i>Period</i>
<i>Danaus plexippus</i>	AY237279	3171 bp	Froy <i>et al.</i> 2003	<i>Period</i>
<i>Antheraea pernyi</i>	U12769	3652 bp	Reppert <i>et al.</i> 1997	<i>Period</i>
<i>Cydia pomonella</i>	AF063432	1046 bp	Regier <i>et al.</i> 1998	<i>Cpper</i>
<i>Cydia pomonella</i>	EU401727	1500 bp	Fuková <i>et al.</i> <sup>3</sup>	<i>Cpper</i>

<sup>1</sup> - Takeda Y, Chuman Y, Shirasu N, Sato S, Matsushima A, Kaneki A, Tominaga Y, Shimohigashi Y, Shimohigashi M: Structural analysis and identification of novel isoforms of the circadian clock gene *period* in the silk moth *Bombyx mori* – nepublikováno

<sup>2</sup> - Atsumi T, Yasukochi Y, Iwai S, Fujiwara Y, Shiomi K: Promoter analysis of *period* gene of *Bombyx mori* – nepublikováno

<sup>3</sup> – (submitted) sekvence není do uveřejnění článku veřejně dostupná

Přehled zbylých genů nalezených na chromosomu Z je uveden v **Tabulce 6**. *Ldh* je gen kódující enzym laktát dehydrogenázu (EC 1.1.1.27), která katalyzuje přeměnu laktátu na pyruvát a naopak, za současné konverze NADH na NAD<sup>+</sup>. Tento enzym je přítomný u velkého množství organismů včetně rostlin. *6-pgd* je gen pro 6-fosfoglukonát dehydrogenázu (EC 1.1.1.43) - enzym, který je součástí pentosového cyklu. *BmOR-4* je gen pro chemoreceptory tykadel u *B. mori*.

**Tab. 6.** Přehled sekvencí dalších genů chromosomu Z v řádu Lepidoptera. Zdroj: NCBI

Druh	Accession no.	Délka sekvence	Citace	Ortolog
<i>Bombyx mori</i>	EU334850	996 bp	Zhu <i>et al.</i> <sup>1</sup>	<i>Ldh</i>
<i>Bombyx mori</i>	EU000385	2556 bp	Zhu <i>et al.</i> <sup>1</sup>	<i>Ldh</i>
<i>Bombyx mori</i>	AB186506	1440 bp	Nakagawa <i>et al.</i> 2005	<i>BmOR-4</i>
<i>Bombyx mori</i>	DQ443274	2011 bp	Niu <i>et al.</i> <sup>2</sup>	<i>6-pgd</i>
<i>Antheraea paukstadtorum</i>	EU020899	1008 bp	Regier <i>et al.</i> <sup>3</sup>	<i>6-pgd</i>
<i>Cydia pomonella</i>	EU020900	3171 bp	Regier <i>et al.</i> <sup>3</sup>	<i>6-pgd</i>
<i>Prodoxus quinquepunctellus</i>	EU020901	3652 bp	Regier <i>et al.</i> <sup>3</sup>	<i>6-pgd</i>

<sup>1</sup> - Zhu M, Chen K, Yao Q: Identification and characterization of *Bombyx mori* *ldh* gene through bioinformatics approaches - nepublikováno

<sup>2</sup> - Niu BL, Meng ZQ, Weng HB, Shen WF, He LH, Zheng KF, Ye ST, Lin TB, Chen JE: Blast silkworm EST database for functional genes – nepublikováno

<sup>3</sup> - Regier JC, Cunningham CW: primers that amplify across Panarthropoda - nepublikováno

## 6. Diskuze

I přes relativní nedostatek informací o Z chromosomu existují dostupné sekvence 22 genů prokazatelně lokalizovaných na chromosomu Z. Zvláštní pozici má gen pro AChE, kterému je věnována samostatná část diskuze.

### Geny pro Kettin

Skupina genů nalezená v práci Koike *et al.* (2003) je velice dobrým kandidátem pro budoucí výzkum. Obsahuje proteiny, které jsou nutné pro správnou funkci svalů a slibuje tedy dobrou konzervovanost v organismech. Jelikož jde o proteiny, které se vyskytují ve všech svalových tkáních, a tedy i v létacích svalech, dá se spekulovat o výhodách, které by jeho zvýšená produkce (vlivem absence kompenzace dávky - viz Suzuki *et al.* 1999) u samců poskytovala díky jejich lokalizaci na chromosomu Z, neboť samci jsou často nuceni za samičkami létat na větší vzdálenosti.

Dalším příkladem genu, který by mohl být pro samce výhodný díky dvojnásobné produkci, je gen *BmOR-4* (Tab 6.). Produktem tohoto genu jsou pachové receptory na tykadlech samců *B. mori*. Tyto receptory slouží ke zpracování signálů pohlavních feromonů a pro samce jsou tedy velice důležité.

### Gen pro AChE

Acetylcholinesteráza (EC 3.1.1.7) je významným enzymem, který hydrolyzuje neurotransmitter acetylcholin v nervosvalových ploténkách a na nervových synapsích, tím přerušuje přenos vzruchu. Ve vztahu k motýlům je důležitá především proto, že je cílem celé řady insekticidů a nervových jedů, které fungují jako inhibitory AChE. Mutace v genu pro AChE způsobuje resistenci proti insekticidům, což je samo o sobě více než pádným důvodem, proč tyto geny zkoumat. Geny pro AChE by byly zajímavým objektem ke studiu též díky skutečnosti, že u *B. mori*, se gen pro formu *ace1* nachází na chromosomu 15 a gen pro *ace2* na chromosomu 9. Toto jsem ověřil srovnáním s databází Kaikoblast. Za předpokladu, že u *Grapholita molesta* je na chromosomu Z (Kanga *et al.* 2001), bylo by velmi zajímavé vysledovat, který stav je ancestrální. Z dostupných dat zatím nelze vyvozovat žádné závěry. Dá se spekulovat o tom, že přesunutí genu pro AChE na pohlavní chromosom Z by mělo pro daný druh jisté evoluční výhody. Translokace na chromosom Z by totiž pomohla urychlit fixaci mutantních alel, neboť by zabraňovala „utajení“ insekticid-sensitivních alel u samic. Samice s jedním chromosomem Z by tak mohly mít buď resistantní alelu - v tom případě by přežily pod tlakem insekticidu - nebo sensitivní alelu, která by pod tlakem insekticidů již gen do další generace nepřenesla.

## Geny *period*

Gen *period* ovlivňující cirkadiánní rytmy byl u motýlů poprvé izolován a popsán u *A. pernyi*. Jeho přítomnost byla prokázána na chromosomu Z (*perZ*) a jsou doloženy i jeho mnohonásobné kopie na chromosomu W. Gen *perW* (jak je označována kopie na W) chybí u samců, cirkadiánní rytmy však narušeny nejsou, neboť transkripční aktivita byla prokázána pouze u jedné kopie, ostatní nejsou úplné a jedná se tedy o pseudogeny. Na W chromosomu je navíc ještě antisense *perW*, tedy sekvence komplementární k transkriptu *per*. Gotter *et al.* (1999) se ve své práci domnívá, že tato antisense sekvence hraje roli při regulaci exprese genu *per*. Zajímavá je kompozice genu *perW* u *A. pernyi* z hlediska exonů a intronů. U *D. melanogaster* je *period* složen z 8 exonů a 7 intronů, naproti tomu u *A. pernyi* má *perZ* 20 exonů a 17 intronů (shrnuto v Gotter *et al.* 1999). Naopak mnohonásobné kopie pseudogenů *perW* jsou spíše dokladem molekulární degradace chromosomu W u *A. pernyi* (viz práce Vítková *et al.* 2007). Gen *period* je dozajista zajímavým kandidátem pro budoucí práci, neboť nejnovější výsledky v práci Fuková *et al.* (subm.) indikují kopii *per* na chromosomu Z i u *C. pomonella*.

## Cíle budoucí práce

Následující krok při studiu evoluce pohlavních chromosomů motýlů bude výběr vhodných druhů. Pro mapování evoluční historie odvozenějších skupin motýlů budou vybráni zástupci z každé hlavní skupiny. U těchto druhů bude cílem najít ortology vybraných genů a potvrdit tak syntenii chromosomu Z u odvozených skupin. Plánované metody v tomto kroku jsou PCR za použití degenerovaných primerů, sekvenace nalezených úseků a tvorba sond z cDNA. První ověření vazby na chromosom Z může být provedeno například pomocí Southern hybridizace, kdy geny chromosomu Z budou hypoteticky dávat dvakrát silnější signály u samčích vzorků. Mapování na chromosomu bude prováděné metodou FISH. Výhodou by byla možnost využití BAC knihoven, ty jsou však dostupné jen u několika málo druhů a jejich použití je finančně a pracovní náročné.

Souběžně bude probíhat hledání ortologů u primitivnějších motýlů, jejichž úspěšný nálezn na některém z autosomů by byl silným důkazem podporujícím teorii o vzniku chromosomu W podle hypotézy v práci Traut & Marec (1996). Naopak zpochybněním by bylo nalezení zachované syntenie mezi chromosomy Z odvozených i primitivních motýlů bez známek translokace autosomálních genů na chromosomy Z u zástupců vyspělých skupin motýlů, která by potvrdila konzervovanost chromosomu Z.

## 7. Souhrn

Složení chromosomu W u motýlů značně komplikuje snahy o poznání evoluční historie jeho vlastního vzniku. Příčinou je jednak rychlá divergence v rámci sesterských druhů a dále jeho vysoce repetitivní obsah, který maskuje hypotetické geny před sekvenací. Nabízí se alternativní cesta - sledovat evoluci pohlavních chromosomů prostřednictvím genů nesených chromosomem Z.

Cílem mé práce bylo shrnout současné představy o evoluční historii systémů pohlavních chromosomů motýlů a vyhledat geny použitelné pro další výzkum na poli odhalování tajů pohlavních chromosomů a jejich historie v rámci řádu Lepidoptera.

Současná představa o možných dějích předcházejících vzniku chromosomu W vychází z předpokladu, že konformace Z0/ZZ je ancestrálním znakem pro řády Trichoptera a Lepidoptera. Existují dvě alternativní hypotézy o vzniku W. Hypotéza Traut & Marec (1996) hovoří o autosomálním původu W, naproti tomu hypotéza Lukhtanov (2000) mluví o původu z B-chromosomu. Vzhledem ke snadnější prokazatelnosti autosomální hypotézy, bylo moje hledání zaměřeno na geny chromosomu Z.

V odborné literatuře a internetových databázích jsem dohledal celkem 22 kandidátních genů a shromáždil relevantní dostupné sekvence spolu se základními informacemi o působení těchto genů. Zhodnotil jsem též jejich využitelnost pro sledování evoluční historie pohlavních chromosomů motýlů a naznačil metodické přístupy pro ověření hypotézy o původu chromosomu W.

## 8. Literatura

- Abe H, Mita K, Oshiki T, Shimada T (2005) Retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Cytogenet Genome Res* **110**: 144-151.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**: 403-410.
- Bachtrog D (2006) A dynamic view of sex chromosome evolution. *Curr Opin Genet Dev* **16**: 578-585.
- Carroll SB, Gates J, Keys DN, Paddock SW, Panganiban GE, Selegue JE, Williams JA (1994) Pattern formation and eyespot determination in butterfly wings. *Science* **265**: 109-114.
- Cohen B, McGuffin ME, Pfeifle C, Segal D, Cohen SM (1992) *apterous*, a gene required for imaginal disc development in *Drosophila* encodes a member of the LIM family of developmental regulatory proteins. *Genes & Development* **6**: 715-729.
- De Prins J, Saitoh K (2003) Karyology and sex determination. In: Kristensen NP (Ed.) *Lepidoptera, moths and butterflies 2: morphology, physiology, and development*. Walter de Gruyter, Berlin – New York, pp. 449–468.
- Dopman EB, Bogdanowicz SM, Harrison RG (2004) Genetic mapping of sexual isolation between E and Z pheromone strains of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). *Genetics* **167**: 301–309.
- Ellegren H (2000) Evolution of the avian sex chromosomes and their role in sex determination. *Trends Ecol Evol* **15**: 188–192.
- Froy O, Gotter AL, Casselman AL, Reppert SM (2003) Illuminating the circadian clock in monarch butterfly migration *Science* **300** (5623), 1303-1305.
- Fujii T, Shimada T (2007) Sex determination in the silkworm, *Bombyx mori*: A female determinant on the W chromosome and the sex-determining gene cascade. *Sem in Cell & Dev Bio* **18**: 379–388.
- Fuková I, Neven LG, Bárcenas NM, Gund NA, Dalíková M, Marec F: Rapid assessment of codling moth sex from eggs to larvae (submitted).
- Fuková I, Traut W, Vítková M, Nguyen P, Kubičková S, Marec F (2007) Probing the W chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin. *Chromosoma* **116**: 135-145.
- Graves JAM, Shetty S (2001) Sex from W to Z: evolution of eertebrate sex chromosomes and sex determining genes. *J Exp Zool* **290**: 449–462.

- Gotter AL, Levine JD, Reppert SM (1999) Sex-linked period genes in the silkworm, *Antheraea pernyi*: implications for circadian clock regulation and the evolution of sex chromosomes. *Neuron* **24**: 953–965.
- Charlesworth B (1991) The evolution of sex chromosomes. *Science* **251**: 1030-1033.
- Iwai S, Fukui Y, Fujiwara Y, Takeda M (2006) Structure and expressions of two circadian clock genes, *period* and *timeless* in the commercial silkworm, *Bombyx mori*. *J Insect Physiol* **52** (6), 625-637.
- Jiggins CD, Mavarez J, Beltran M, McMillan WO, Johnston JS, Bermingham E (2005) A genetic linkage map of the mimetic butterfly *Heliconius melpomene*. *Genetics* **171**: 557–570.
- Johnson MS, Turner JRG (1979) Absence of dosage compensation for a sex-linked enzyme in butterflies (*Heliconius*). *Heredity* **43**: 71–77.
- Jones KW, Singh L (1985) Snakes and the evolution of sex chromosomes. *Trends Genet* **1**: 55–61.
- Kanga LHB, Pree DJ, Plapp FW Jr., and van Lier LJ (2001) Sex-linked altered Acetylcholinesterase resistance to carbamate insecticides in adults of the oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Pest Biochem & Phys* **71**: 29–39.
- Kawamura N (1988) The egg size determining gene, *Esd*, is a unique morphological marker on the W chromosome of *Bombyx mori*. *Genetica* **76**: 195–201.
- Kawamura N (1990) Is the egg size determining gene, *Esd*, on the W chromosome identical with the sex-linked giant egg gene, *Ge*, in the silkworm? *Genetica* **81**: 205–210.
- Koike Y, Mita K, Suzuki MG, Maeda S, Abe H, Osoegawa K, deJong PJ, Shimada T (2003) Genomic sequence of a 320-kb segment of the Z chromosome of *Bombyx mori* containing a *kettin* ortholog. *Mol Gen Genomics* **269**: 137-149.
- Lee DW, Kim SS, Shin SW, Kim WT, Boo KS (2006) Molecular characterization of two acetylcholinesterase genes from the oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta*. *Biochim Biophys Acta* **1760**: 125-133.
- Logsdon JM Jr, Tyshenko MG, Dixon C, Jafari JD, Walker VK, Palmer JD (1995) Seven newly discovered intron positions in the triose-phosphate isomerase gene: evidence for the introns-late theory. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 8507–8511.
- Lukhtanov VA (2000) Sex chromatin and sex chromosome systems in nonditrysian Lepidoptera (Insecta). *Zool Syst Evol Res* **38**: 73-79.
- Marec F (1996) Synaptonemal complexes in insects. *Int J Insect Morphol & Embryol* **25**: 205-233.
- Marec F, Novák K (1998) Absence of sex chromatin corresponds with a sex-chromosome univalent in females of Trichoptera. *Eur J Entomol* **95**: 197-209.

- Matsuoka T, Fujiwara H (2000) Expression of ecdysteroid-regulated genes is reduced specifically in the wing discs of the wing-deficient mutant (fl) of *Bombyx mori* *Dev Genes Evol* **210**: 120-128.
- Mediouni J, Fuková I, Frydychová R, Dhouibi MH, Marec F (2004) Karyotype, sex chromatin and sex chromosome differentiation in the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae). *Caryologia* **57**: 184–194.
- Merlin C, Francois MC, Queguiner I, Maibeche-Coisne M, Jacquin-Joly E (2006) Evidence for a putative antennal clock in *Mamestra brassicae*: Molecular cloning and characterization of two clock genes- *period* and *cryptochrome*- in antennae *Insect Mol Biol* **15** (2), 137-145.
- Mita K, Kasahara M, Sasaki S, Nagayasu Y, Yamada T, *et al.* (2004) The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori* . *DNA Res* **11**: 27–35.
- Morse JC (1997) Phylogeny of Trichoptera. *Annu Rev Entomol* **42**: 427-450.
- Moores GD, Gao X, Denholm I, Devonshire AL (1996) Characterisation of insensitive acetylcholinesterase in insecticide-resistant cotton aphids, *Aphis gossypii* Glover (Homoptera: Aphididae), *Pestic Biochem Physiol* **56**: 102– 110.
- Nakagawa T, Sakurai T, Nishioka T, Touhara K (2005) Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors *Science* **307** (5715), 1638-1642.
- Nguyen P (2006) Distribuce rDNA na chromosomech motýlů. Bakalářská práce, Biologická fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice.
- Ni XY, Tomita T, Kasai S, Kono Y (2003) cDNA and deduced protein sequence of acetylcholinesterase from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae) *Appl Entomol Zool* **38** (1): 49-56.
- Nokkala S (1987) Cytological characteristics of chromosome behaviour during female meiosis in *Sphinx ligustri* L. (Sphingidae, Lepidoptera). *Hereditas* **106**: 169–179.
- Ohbayashi F, Suzuki MG, Shimada T (2002) Sex determination in *Bombyx mori*. *Curr Sci (Bangalore)* **83**: 466–471.
- Pigozzi MI (1999) Origin and evolution of the sex chromosomes in birds. *Biocell* **23**: 79–95.
- Pringle EG, Baxter SW, Webster CL, Papanicolaou A, Lee SF, Jiggins CD (2007) Synteny and chromosome evolution in the Lepidoptera: evidence from mapping in *Heliconius melpomene*. *Genetics* **177**: 417-426.
- Putnam AS, Scriber JM, Andolfatto P (2007) Discordant divergence times among Z-chromosome regions between two ecologically distinct swallowtail butterfly species. *Evolution* **61** (4), 912-927.



- Rego A, Marec F (2003) Telomeric and interstitial telomeric sequences in holokinetic chromosomes of Lepidoptera: Telomeric DNA mediates association between postpachytene bivalents in achiasmatic meiosis of females. *Chrom Res* **11**: 681-694.
- Regier JC, Fang QQ, Mitter C, Peigler RS, Friedlander TP, Solis MA (1998) Evolution and phylogenetic utility of the *period* gene in Lepidoptera *Mol Biol Evol* **15** (9), 1172-1182.
- Reppert SM, Tsai T, Roca AL, Sauman I (1994) Cloning of a structural and functional homolog of the circadian clock gene *period* from the giant silkworm *Antheraea pernyi* *Neuron* **13** (5), 1167-1176.
- Robinson R (1971) *Lepidoptera Genetics*. Pergamon Press, Oxford.
- Sahara K, Yoshido A, Kawamura N, Ohnuma A, Abe H, *et al.* (2003) W-derived BAC probes as a new tool for identification of the W chromosome and its aberrations in *Bombyx mori*. *Chromosoma* **112**: 48–55.
- Sahara K, Yoshido A, Marec F, Fuková I, Zhang HB, Wu CC, Goldsmith MR, Yasukochi Y (2007) Conserved synteny of genes between chromosome 15 of *Bombyx mori* and a chromosome of *Manduca sexta* shown by five-color BAC-FISH. *Genome* **50**: 1061-1065.
- Schartl M (2004) Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* **14**: 634–641.
- Schmid M, Steinlein C (2001) Sex chromosomes, sex-linked genes, and sex determination in the vertebrate class Amphibia. In: Scherer G, Schmid M (eds) *Genes and mechanisms in vertebrate sex determination*. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp 143–176.
- Špakulová M, Casanova JC (2004) Current knowledge on B chromosomes in natural populations of helminth parasites: a review. *Cytogenet Genome Res* **106**: 222–229.
- Suzuki MG, Shimada T, Kobayashi M (1998) Absence of dosage compensation at the transcription level of a sex-linked gene in a female heterogametic insect, *Bombyx mori*. *Heredity* **81**: 275-283.
- Suzuki MG, Shimada T, Kobayashi M (1999) *Bm kettin*, homologue of the *Drosophila kettin* gene, is located on the Z chromosome in *Bombyx mori* and is not dosage compensated. *Heredity* **82**: 170–179.
- Tazima Y (1965) *The Genetics of the Silkworm*. Academic Press, London.
- Tobler A, Kapan D, Flanagan NS, Gonzalez C, Peterson E, Jiggins CD, Johnston JS, Heckel DG, McMillan WO (2005) First-generation linkage map of the warningly colored butterfly *Heliconius erato*. *Heredity* **94**: 408-417.
- Traut W, Scholz D (1978) Structure, replication and transcriptional activity of the sex-specific heterochromatin in a moth. *Exp Cell Res* **113**: 85–94.
- Traut W, Marec F (1996) Sex chromatin in Lepidoptera. *Q Rev Biol* **71**: 239-256.
- Traut W, Marec F (1997) Sex chromosome differentiation in some species of Lepidoptera (Insecta).

*Chromosome Res* **5**: 283-291.

Traut W, Sahara K, Otto TD, Marec F (1999) Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma* **108**: 173-180.

Traut W, Sahara K, Marec F (2008) Sex Chromosomes and Sex Determination in Lepidoptera. *Sex Dev* **1**: 332–346.

Vítková M, (2007) Structural and molecular differentiation of sex chromosomes in Lepidoptera. Ph.D. Thesis, Faculty of Biological Sciences, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Vítková M, Fuková I, Kubíčková S, Marec F (2007) Molecular divergence of the W chromosomes in pyralid moths (Lepidoptera). *Chromosome Res* **15**: 917–930.

Vyskot B, Hobza R (2004) Gender in plants: sex chromosomes are emerging from the fog. *Trends Genet* **20**: 432–438.

Wallace H, Badawy GMI, Wallace BMN (1999) Amphibian sex determination and sex reversal. *Cell Mol Life Sci* **55**: 901–909.

Wolf KW (1996) The structure of condensed chromosomes in mitosis and meiosis of insects. *Int J Insect Morphol Embryol* **25**: 37-62.

Wolf KW, Novák K, Marec F (1997) Kinetic organization of metaphase I bivalents in spermatogenesis of Lepidoptera and Trichoptera species with small chromosome numbers. *Heredity* **79**: 135-143.

Xia Q, Zhou Z, Lu C, Cheng D, Dai F, Li B, Zhao P, Zha X, Cheng T, Chai C, *et al.* (2004) A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science* **306**: 1937-1940.

Yasukochi Y, Ashakumary AL, Baba K, Yoshido A, Sahara K (2006) A second-generation integrated map of the silkworm reveals synteny and conserved gene order between lepidopteran insects. *Genetics* **173**: 1319–1328.

Yoshido A, Bando H, Yasukochi Y, Sahara K (2005a) The *Bombyx mori* karyotype and the assignment of linkage groups. *Genetics* **170**: 675-685.

Yoshido A, Marec F, Sahara K (2005b) Resolution of sex chromosome constitution by GISH and telomere-FISH in some species of Lepidoptera. *Chromosoma* **114**: 193-202.