

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ UNIVERZITY
Katedra genetiky



**Analýza pohlavního chromosomu Z obaleče jablečného
(*Cydia pomonella*) pomocí laserové mikrodisekce**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: Jindra Šichová
Vedoucí práce: Prof. RNDr. František Marec CSc.
Rok vypracování: 2009

Šichová J., 2009: Analýza pohlavního chromosomu Z obaleče jablečného (*Cydia pomonella*) pomocí laserové mikrodisekce. [Analysis of the codling moth (*Cydia pomonella*) Z chromosome by means of laser microdissection. Bc.Thesis, in Czech]. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic. Pp. 49.

Annotation:

This study uses a new methodical approach for the molecular analysis of the lepidopteran Z chromosome. The Z-chromosome DNA was collected from male mitotic spermatogonial cells of the codling moth (*Cydia pomonella*) by laser microdissection and then amplified by degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction (DOP-PCR). Products of DOP-PCR were used to prepare painting probes and create a Z-chromosome DNA sequence library. Specificity of painting probes was tested on spread chromosomal preparations from testes and ovaries of the codling moth larvae using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). However, all painting probes made exhibited a low specificity for the Z chromosome: they hybridized evenly to all chromosomes in male preparations, whereas in female preparations highlighted almost the entire W chromosome. For construction of the Z-chromosome DNA library, DOP-PCR-generated DNA fragments were cloned, sequenced and further analyzed. A total of 30 different sequences were obtained. Only four of the sequences exhibited a significant homology to sequences in GenBank, all other represent unknown sequences. Five sequences were characterized by Southern hybridization. The results correlated with hybridization signals from FISH; we recovered highly repetitive sequences, either ubiquitous (i.e. occurring in all chromosomes) and/or accumulated on the W chromosome. Only a few copies were located on Z chromosome.

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 vypracovala 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.ledna 2009

.....
Jindra Šichová

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat svému školiteli Františku Marecovi za přijetí do laboratoře a za zadání velmi zajímavého tématu a Svatavě Kubičkové za pomoc při práci s mikroskopem vybaveným laserovým mikrodisektorem. Také bych chtěla poděkovat Magdě Vítkové, Martině Dalíkové a Petru Nguyenovi za skvělou atmosféru v naší laboratoři, velmi cenné rady a ochotnou pomoc, když bylo potřeba. Mé díky patří i naší laborantce, Marušce Korchové, a to za svědomitou péči o chovy motýlů. Nakonec bych také chtěla poděkovat rodičům a blízkým za nezdolnou důvěru v mé schopnosti.

OBSAH

| | | |
|--------|---|--------|
| 1. | Úvod..... | - 1 - |
| 1.1. | Evoluce pohlavních chromosomů | - 1 - |
| 1.2. | Chromosomální determinace pohlaví motýlů | - 1 - |
| 1.3. | Evoluce pohlavních chromosomů motýlů..... | - 1 - |
| 1.4. | Chromosom W | - 2 - |
| 1.5. | Chromosom Z..... | - 3 - |
| 1.6. | Metodické přístupy studia pohlavních chromosomů motýlů | - 3 - |
| 1.6.1. | Pachytemní mapování | - 3 - |
| 1.6.2. | Hybridizace genomových sond | - 4 - |
| 1.6.3. | BAC-FISH..... | - 5 - |
| 1.6.4. | Malovací („paintingové“) sondy | - 6 - |
| 1.6.5. | Zoo-FISH | - 7 - |
| 1.7. | Obaleč jablečný (<i>Cydia pomonella</i>)..... | - 7 - |
| 2. | Cíle práce..... | - 9 - |
| 3. | Materiál a metody..... | - 10 - |
| 3.1. | Použitý hmyz..... | - 10 - |
| 3.2. | Příprava preparátů pro laserovou mikrodisekci | - 10 - |
| 3.2.1. | Příprava skel se speciální PEN membránou..... | - 10 - |
| 3.2.2. | Příprava chromosomálních preparátů..... | - 10 - |
| 3.3. | Laserová mikrodisekce..... | - 11 - |
| 3.4. | Příprava malovací sondy pro chromosom Z | - 11 - |
| 3.5. | Hybridizace <i>in situ</i> | - 12 - |
| 3.5.1. | Příprava preparátů | - 12 - |
| 3.5.2. | Izolace genomové DNA ze samic obaleče jablečného..... | - 12 - |
| 3.5.3. | Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace..... | - 13 - |
| 3.6. | Příprava sekvencí DNA chromosomu Z | - 14 - |
| 3.6.1. | Klonování | - 14 - |
| 3.6.2. | Sekvenování | - 16 - |
| 3.6.3. | Southern hybridizace..... | - 17 - |
| 4. | Výsledky..... | - 20 - |
| 4.1. | První laserová mikrodisekce | - 20 - |
| 4.2. | Druhá laserová mikrodisekce | - 20 - |
| 4.2.1. | Laserová mikrodisekce a příprava sondy | - 21 - |
| 4.2.2. | Ověření specificity sond fluorescenční <i>in situ</i> hybridizací | - 22 - |
| 4.2.3. | Analýza sekvencí DNA získaných mikrodisekcí chromosomů Z..... | - 22 - |
| 5. | Diskuze..... | - 25 - |
| 5.1. | Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace se sondami pro chromosom Z | - 25 - |
| 5.2. | Klonování a analýza sekvencí DNA z chromosomu Z | - 26 - |
| 5.3. | Perspektiva laserové mikrodisekce chromosomu Z pro výzkum struktury a evoluce pohlavních chromosomů motýlů..... | - 28 - |
| 6. | Souhrn | - 29 - |
| 7. | Literatura | - 30 - |

1. Úvod

1.1. Evoluce pohlavních chromosomů

U většiny živočichů hrají důležitou roli při určení pohlaví jedince geny lokalizované na pohlavních chromosomech. Tyto chromosomy jsou na rozdíl od autosomů zastoupeny u obou pohlaví odlišně. Zatímco chromosomy Y nebo W jsou pohlavně specifické a vyskytují se pouze u jednoho pohlaví (tzv. heterogametické pohlaví), chromosomy X nebo Z jsou přítomny u obou pohlaví ale v různém počtu. Předpokládá se, že se pohlavní chromosomy vyvinuly postupnou diferenciací z původně homologního páru autosomů poté, co jeden z partnerů získal gen zodpovědný za určení pohlaví. Selektce následně preferovala stěhování genů, výhodných pro dané pohlaví, do vazby (tedy na stejný chromosom) k tomuto genu. Dalším typickým krokem v evoluci pohlavních chromosomů je restrikce rekombinace mezi homologními úseky s těmito geny nebo celými chromosomy, v extrémních případech i u celého heterogametického pohlaví. Důsledkem restrikce rekombinace je pak postupné odlišování obou pohlavních chromosomů degenerací funkčních genů a šířením repetitivních sekvencí u pohlavně specifických chromosomů, chromosomu Y v systémech určení pohlaví typu XY/XX a chromosomu W v systémech typu WZ/ZZ (Charlesworth a kol. 2005, Steinemann a Steinemann 2005, Bachtrog 2006, Traut a kol. 2007).

1.2. Chromosomální determinace pohlaví motýlů

U motýlů je samičí pohlaví heterogametické a je určeno chromosomální konstitucí WZ nebo ZO, zatímco samci mají pohlaví homogametické s pohlavními chromosomy ZZ. Tento systém určení pohlaví WZ/ZZ, nazývaný *Abraxas* podle píďalky angreštové (*Abraxas glossulariata*), je běžný u ptáků, hadů a u některých obojživelníků a ryb, (Graves a Shetty 2001), ale nachází se i u parazitických motolic čeledi *Schistosomatidae* (Špakulová a Casanova 2004). U motýlů jsou známé i různé numerické variace tohoto systému (Traut a Marec 1997, Traut 1999).

1.3. Evoluce pohlavních chromosomů motýlů

Primitivní druhy motýlů sdílí spolu s chrostíky (Trichoptera), sesterskou skupinou motýlů, chromosomální konstituci ZO/ZZ. Tato konstituce je tedy považována za výchozí podobu systému pohlavních chromosomů. Systém WZ/ZZ je evoluční novinkou čeledi Tischeriidae a podřádu Ditrysia, který zahrnuje 98 % všech žijících druhů motýlů (Traut a Marec 1996; shrnuto v práci Traut a kol. 2007). V zásadě existují dvě hlavní hypotézy, které se zabývají vznikem pohlavního chromosomu W. Podle první z nich pochází z autosomu, jehož homolog sfúzoval s pohlavním chromosomem Z. Takto vzniklý chromosom, označovaný jako neo-Z, se během meiózy pároval se zbylým autosomem,

ze kterého vznikl tzv. neo-W (Traut a Marec 1996). Podle druhé teorie vzniká chromosom neo-W z B-chromosomu, malého nadpočetného chromosomu vyskytujícího se v genomech celé řady rostlin a živočichů (Lukhtanov 2000). U některých z odvozenějších druhů motýlů však došlo k druhotné ztrátě chromosomu W, jako např. u můry *Orthosia gracilis* (Traut a Marec 1996) nebo poddruhu martináče *Samia cynthia ricini* (Yoshido a kol. 2005a), zatímco u jiných druhů došlo k zmnožení pohlavních chromosomů, jako např. u štetconoše *Orgyia thyellina* nebo u jiných geografických poddruhů *S. cynthia* (Yoshido a kol. 2005a).

Zatímco informací o evoluci pohlavních chromosomů u organismů se systémem určení pohlaví XY/XX rychle přibývá (Graves 2006), data o systému WZ jsou stále vzácná a ve většině případů se omezují pouze na hady a ptáky.

1.4. Chromosom W

Na chromosomu W bylo v nedávné době provedeno množství molekulárně cytogenetických studií, které nám alespoň částečně pomohly odhalit jeho celkové složení. Získaná data potvrdila přítomnost repetitivních sekvencí, které se sice vyskytují v celém genomu, ale na chromosomu W jsou akumulovány v mnohem větší míře (Sahara a kol. 2003b, Mediouni a kol. 2004, Fuková a kol. 2005). Stejně tak sekvence získané z RAPD fragmentů chromosomu W bource morušového ukázaly významné nahromadění různých transpozonů (Abe a kol. 2000, 2005). Díky výše zmíněnému složení a absenci rekombinace u samičího pohlaví dochází k rychlé ztrátě homologie mezi sekvencemi chromosomů W blízké příbuzných druhů, což bylo poprvé ukázáno u čeledi Pyralidae (zavíječovití) (Vítková a kol. 2007).

Předpokládá se, že se na chromosomu W vyskytuje několik genů. Jedním z nich je feminizující faktor *Fem*, který hraje významnou roli při determinaci pohlaví. Už Hasimoto (1933) zjistil, že o pohlaví u bource morušového rozhoduje přítomnost nebo absence chromosomu W (Ohbayashi a kol. 2002, Fujii a Shimada 2007). Gen *Fem* se však prozatím nepodařilo zaklonovat ani přesně lokalizovat. Druhým genem na chromosomu W je gen determinující velikost vajíček (*Esd*), objevený u *B.mori* (Kawamura 1988). Zajímavým případem je také gen pro protein *Period* regulující cirkadiální rytmy. Tento gen se nachází na chromosomu Z u martináče *Antheraea pernyi*, ale několik desítek jeho kopií bylo nalezeno i na chromosomu W (Gotter a kol. 1999; M. Vítková, nepublikované výsledky).

W chromosom samic tvoří v interfázním jádře heterochromatinové tělísko, W chromatin. Ve většině tkání se vyskytuje pouze jedno tělísko a s rostoucím stupněm polyploidizace jádra se zvětšuje (Traut a Marec 1996). U systému Z0/ZZ chrostíků a primitivních druhů motýlů je absence či ztráta chromosomu W spojena s nepřítomností sex chromatinu (Marec a Novák 1998, Traut a kol. 2007). Díky tomu je užitečným markrem, který nám dovolí rozpoznat pohlaví jedince i u raných stádií vývoje motýlů a je i dobrým indikátorem aberací pohlavních chromosomů (Traut a Marec 1996).

1.5. Chromosom Z

Chromosom Z obsahuje, na rozdíl od chromosomu W, množství transkripčně aktivních genů a u samců (ZZ) může stále docházet k jeho opravám mechanismem homologní rekombinace během meiotického dělení. Celkově se však o jeho složení ví poměrně málo a informace se omezují na několik modelových druhů motýlů. Nejvíce je známo o chromosomu *Z B.mori*, jehož genom byl osekvenován nezávisle na sobě dvěma laboratořemi (Mita a kol. 2004, Xia a kol. 2004). Významná data o chromosomu Z získal v předchozích pokusech Koike a kol. (2003), kterému se za pomoci BAC klonu podařilo osekvenovat 320-kb úsek kolem genu (*Bmkettin*) chromosomu Z bource morušového. V této oblasti našel 13 genů a množství repetitivních sekvencí.

Ačkoliv je chromosom Z velmi vděčným objektem pro studium evoluce genomu motýlů, doposud na něm nebyly provedeny žádné rozsáhlejší srovnávací studie. Právě geny vázané na pohlavní chromosom Z by se však daly využít jako markery při porovnávání chromosomů mezi fylogeneticky značně vzdálenými taxony. Dosud byla zjištěna konzervovaná syntenie dvou genů, *apterous* a *Tpi* (triózafosfát izomeráza), na chromosomu Z u *B. mori* a motýla *Heliconius melpomene* z čeledi Nymphalidae (babočkovití) (Yasukochi a kol. 2006), která naznačuje, že by genetický obsah chromosomu Z mohl být konzervován přinejmenším u evolučně nejmladší skupiny Macrolepidoptera.

Také se zatím nepodařilo prokázat, že by u motýlů existoval nějaký způsob kompenzace dávky genů chromosomu Z. Naopak u bource morušového bylo zjištěno dvojnásobné množství transkriptu genů lokalizovaných na chromosomu Z (*Bm kettin* a T15) u samčího pohlaví (ZZ) oproti pohlaví samičímu (WZ) (Suzuki a kol. 1998, 1999). Motýli jsou tedy pravděpodobně schopni tolerovat nebo využívat různé množství produktů genů chromosomu Z u obou pohlaví (Traut a Marec 1996).

1.6. Metodické přístupy studia pohlavních chromosomů motýlů

Chromosomy motýlů jsou ve srovnání s chromosomy obratlovců velmi malé, uniformní a je jich zpravidla hodně, výchozím počtem je $n = 31$. Navíc jsou tyto chromosomy holokinetického typu, tedy bez jasně definované centromery (Suomalainen 1969, Wolf a kol. 1997). Absence jakýchkoliv rozlišovacích znaků (velikost, pozice centromery) nám tedy znemožňuje identifikaci jednotlivých chromosomů (Traut a kol. 1999). Navíc nebyly vyvinuty žádné proužkovací techniky, které se běžně používají pro rozlišení metafázních chromosomů obratlovců. Detailnější informace o pohlavních chromosomech motýlů se nám podařily získat až za pomoci následujících metod.

1.6.1. Pachytenní mapování

Pro cytogenetický výzkum mají pachytenní chromosomy oproti mitotickým řadu nesporných výhod. V nejdelsí fázi meiotického dělení, v pachytene, se homologní chromosomy spárují a celkový

počet elementů v jádře se tím zredukuje na polovinu. Pachytenní bivalenty jsou mnohem delší než metafázní chromosomy a disponují charakteristickým chromomerovým vzorem, který nám v některých případech umožňuje rozlišení jednotlivých chromosomálních párů (Traut a Marec 1997).

Přestože se pohlavní chromosomy Z a W liší, během meiotického dělení tvoří bivalent. Ten je v některých případech v preparátech pachytenních oocytů dobře rozpoznatelný ve fázovém kontrastu světelné mikroskopie. Chromosom W některých druhů, díky své heterochromatinové struktuře, tvoří výrazný řetězec bez chromomerového vzoru, který je typický pro chromosom Z i autosomy (Marec a Traut 1994). Charakteristický chromomerový vzor byl použit k identifikaci 6 z celkem 28 pachytenních bivalentů *B. mori* (Traut 1976). Tato metoda ale není univerzální a pro široké použití nestačí; touto metodou se například nepodařilo identifikovat pohlavní chromosomy v pachytenních oocytech dvou zástupců skupiny Pyraloidea (Mediouni a kol. 2004, Vítková a kol. 2007).

1.6.2. Hybridizace genomových sond

Dvě základní modifikace klasické fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), genomová *in situ* hybridizace (GISH) a komparativní genomová hybridizace (CGH), znamenaly obrovský přínos pro studium pohlavních chromosomů motýlů. Metody jsou založeny na hybridizaci jedné (GISH) nebo dvou (CGH) různě značených celogenomových sond v přítomnosti kompetitora, což může být fragmentovaná (např. sonikátorem) genomová DNA nebo Cot-1 frakce DNA (tj. frakce DNA s vysokým podílem krátkých repetitivních sekvencí). V závislosti na stupni diferenciaci pohlavních chromosomů dokáží obě metody identifikovat chromosom W ve všech stádiích mitózy, meiózy i v interfázních jádrech a to i v případech, kdy ostatní techniky selhávají. Například Yoshido a kol. (2006) potvrdili potenciál GISH, když za pomoci značené samičí genomové sondy identifikoval chromosom W u 8 různých druhů motýlů.

Zatímco genomová *in situ* hybridizace jednoduše označí chromosom W, komparativní genomová hybridizace má mnohem širší využití. Tato technika má uplatnění v nádorové cytogenetice (Brisset a kol. 2001), ale je také univerzální metodou, sloužící k identifikaci a analýze pohlavních chromosomů (Traut a kol. 1999, Traut a kol. 2001). Porovnáním intenzity signálů samičí a samčí genomové sondy, které spolu při hybridizaci kompetují o vazebná místa na chromosomech, získáme hrubý odhad molekulárního složení chromosomu W. Takto identifikoval Sahara a kol. (2003a) dva druhy sekvencí chromosomu W u *G. mellonella*, *E. kuehniella* a *B. mori*. Jsou to (i) repetitivní sekvence společné pro samce i samice (přítomné i na autosomech a chromosomu Z) a (ii) repetitivní sekvence vyskytující se výhradně nebo převážně na chromosomu W. Zatímco chromosom W všech tří druhů motýlů obsahoval první komponentu, unikátní sekvence byly přítomné pouze u prvních dvou druhů a u bource morušového chyběly (Sahara a kol. 2003a). Díky této metodě se podařilo vůbec poprvé identifikovat „wild-type“ (neaberantní) chromosom W u *B. mori* (Traut a kol. 1999). Předchozí

pokusy Kawamura a Niino (1991) využívaly k identifikaci tohoto chromosomu specifické translokace autosomu s chromosomem W.

1.6.3. BAC-FISH

Existuje několik různých vektorů sloužících ke klonování relativně dlouhých fragmentů DNA. Prvním z nich jsou YACs (umělé kvasinkové chromosomy) replikující se v kvasinkách. Tento vektor obsahuje vedle sekvencí bakteriálního plazmidu i části kvasinkového chromosomu důležité pro jeho stabilitu a autonomní replikaci, např. centromeru a telomery. Výhodou YACs je jejich velká klonovací kapacita (několik stovek kb), ale nevýhodou je na druhé straně nestabilita inzertů cizorodé DNA (Burke a kol. 1987). Dalšími vektory jsou umělé bakteriální chromosomy (BACs) odvozené z plazmidu F *E. coli*, a umělé chromosomy odvozené z bakteriofága P1 (PACs). Mezi jejich výhody patří jednoduchá konstrukce DNA knihoven, vyšší stabilita inzertů a větší výtěžnost při izolaci DNA (Shizuya a kol. 1992). BAC knihovny byly vytvořeny pro řadu druhů včetně bource morušového (shrnutí v Wu a kol. 1999). Ve výzkumu genomu motýlů se v posledních letech osvědčilo právě využití BAC klonů.

Bakteriální umělé chromosomy lze použít k lokalizaci sekvencí na chromosomech za pomoci tzv. BAC-FISH. Je to opět modifikace klasické fluorescenční *in situ* hybridizace jejíž princip spočívá v hybridizaci umělých bakteriálních chromosomů značených fluorochromem. Vzhledem k relativně velké velikosti inzertů (150-300 kb) je však nutné použít značné množství kompetiční DNA, která zabrání hybridizaci repetitivních sekvencí sondy a zvýší tak její specifitu.

BAC-FISH znamenala velký pokrok pro fyzikální mapování a pro studium syntenie genů u vybraných druhů motýlů (Yasukochi a kol. 2006, Sahara a kol. 2007), ale uplatnila se i v řadě dalších odvětví molekulární cytogenetiky. Yoshido a kol. (2005b) za pomoci této metody spolehlivě rozpoznal všech 28 pachytenních bivalentů *B. mori* a přiřadil je k příslušným vazebným skupinám. BAC-FISH je však i důležitým nástrojem k identifikaci a studiu pohlavních chromosomů. Sahara a kol. (2003b) vyizoloval čtyři BAC klony chromosomu W (W-BAC) bource morušového a hybridizoval je na samičí chromosomální preparáty. Délka jedné W-BAC sondy byla kolem 170 kb (asi 1% celkové délky chromosomu) a přesto všechny čtyři sondy označily celý chromosom W. Tyto výsledky potvrzují předpokládané nahromadění transpozonů a dalších repetitivních sekvencí na tomto chromosomu. V dalším pokusu použil Yoshido a kol. (2007) W-BAC sondy *B. mori* pro detekci chromosomu W u 16 různých druhů motýlů. U 15 z nich nebyly nalezeny žádné hybridizační signály na pohlavních chromosomech ani na autosomech, zatímco u divokého předka bource morušového, u *Bombyx mandarina*, W-BAC sondy chromosom W spolehlivě označily. Podobná absence jakýchkoliv hybridizačních signálů byla pozorována i při použití Z-BAC sond a autosomálních BAC son (F. Marec a K. Sahara, nepublikované výsledky). Tyto výsledky naznačují, že bakteriální umělé chromosomy

nejsou dobrým nástrojem pro „cross-hybridizace“ mezi vzdálenými druhy motýlů (Zoo-FISH – viz. níže).

1.6.4. Malovací („paintingové“) sondy

Další z možností, jak identifikovat a studovat chromosomy, je fluorescenční *in situ* hybridizace s použitím chromosomálně specifických sond. Podmínkou je však izolace jednotlivých chromosomů z karyotypu, čehož je možné dosáhnout několika způsoby.

Prvním z nich je třídění průtokovou cytometrií (flow-sorted cytometry). Tato metoda je založena na třídění fluorochromem obarvených chromosomů na základě intenzity emitovaného záření, která je přímo úměrná obsahu jejich DNA. Využívá se pro přípravu DNA knihoven specifických pro jednotlivé chromosomy a pro detekci chromosomálních aberací (Vooijs a kol. 1993). Tuto metodu nelze využít u druhů s malými nebo velikostně uniformními chromosomy (Christian a kol. 1999).

Druhým způsobem, který slouží k výrobě sond specifických pro určitý chromosom nebo dokonce pro jeho části (centromera, telomery, raménka,..), je vyříznutí chromosomu, tzv. mikrodisekce. U konvenční mikrodisekce je chromosom vyřezán a přenesen z buňky za pomoci speciálních skleněných jehel a mikromanipulátoru. Výhodou této metody je její přesnost, ale mezi nevýhody patří časová náročnost a možnost kontaminace (Murray 2007).

Mechanickému kontaktu a případnému znečištění vzorku můžeme předejít použitím laserové mikrodisekce, kde jsou preparáty připravené na speciální polyetylenové membráně umístěny do invertovaného mikroskopu spojeného s vlastním laserovým mikrodisekčním systémem. Pomocí mikroskopu je dohledán příslušný chromosom, který je následně slabým laserovým paprskem vyříznut a pomocí silnějšího paprsku katapultován do víčka mikroskopu (např. Kubíčková a kol. 2002; Thalhammer a kol. 2004).

Předpokladem pro úspěšné vyřezání u konvenční i laserové mikrodisekce je dostatek dobře rozptýlených chromosomů a jejich rozlišení na základě klasických barvicích technik (Giemsa, C-proužkování, G-proužkování) (Kubíčková a kol. 2002). Názory na to, kolik vyřezaných chromosomů nebo jejich částí je třeba k výrobě specifické malovací sondy se různí. Autoři uvádějí odlišné počty chromosomů pohybující se v rozmezí od více než 20 do méně než 10 kopií, v závislosti na velikosti a obsahu DNA (shrnuto v Thalhammer a kol. 2004). Vyřezávání velkého množství chromosomů však může být časově náročné a problematické, zvláště u druhů, u kterých jsou i po naproužkování chromosomy těžko rozlišitelné. Christian a kol. (1999) tuto nevýhodu vyřešil aplikací *in situ* DOP-PCR na cílový chromosom ještě před mikrodisekcí. Dostatečná amplifikace zvýší množství DNA natolik, že i jediný vyřezaný chromosom je následně schopen sloužit jako specifická sonda pro FISH. Po *in situ* DOP-PCR však nemohou být chromosomy naproužkovány (G-banding), což může být problém u chromosomů, které nepoznáme podle jejich morfologie (Christian a kol. 1999).

1.6.5. Zoo-FISH

Chromosomálně specifické sondy vyrobené sortováním průtokovým cytometrem nebo mikrodisekcí se staly dobrým nástrojem pro identifikaci a studium homologních segmentů chromosomů mezi karyotypy rozličných druhů pomocí metody “comparative chromosome painting”, zvané též Zoo-FISH. Princip této metody spočívá v „cross-hybridizaci“ specifické DNA sondy vybraného druhu na chromosomální preparáty druhu jiného (Scherthan a kol. 1994). Toto heterologní (mezidruhové) barvení chromosomů nám umožňuje odhalit konzervované homologní úseky u různě příbuzných druhů, což je výhodné nejen pro odhalení evoluční divergence genomů, ale i pro srovnávací mapování genů (Chowdhary a Raudsepp 2001).

Prvním významným úspěchem Zoo-FISH byla srovnávací analýza u evolučně blízce příbuzných druhů primátů (Jautch a kol. 1992). Lidské DNA knihovny zde posloužily jako zdroje chromosomů pro specifické barvicí sondy, které byly následně hybridizovány na chromosomální preparáty šimpanzů, orangutanů, goril a gibbonů. Výsledky jednoznačně ukazují na vysokou míru homologie a syntenie mezi chromosomy lidoopů a člověka. Na základě dalších studií, zahrnujících 8 živočišných druhů ze čtyř různých savčích řádů, vymezil Chowdhary a kol. (1998) tři odlišné kategorie zachování homologie a to na úrovni (i) celých chromosomů, (ii) celých ramen nebo velkých chromosomálních segmentů (iii) po sobě následujících chromosomálních sekvencí. Do první skupiny patří mimo jiné i pohlavní chromosom X, který je u savců vysoce konzervován. I druhy z různých řádů si uchovávají značnou homologii chromosomových úseků (Graves and Watson 1991).

Jak už bylo řečeno, informace o evoluční historii pohlavních chromosomů W a Z jsou stále vzácné a ve většině případů se týkají pouze hadů a ptáků (Matsuda a kol. 2005). Vítková a kol. (2007) vůbec poprvé zkoumala za pomoci Zoo-FISH míru homologie mezi chromosomy W u blízce příbuzných druhů motýlů čeledi Pyralidae (zavíječovití). Sondu, vyrobenou za pomoci laserové mikrodisekce ze sex chromatinu *E. kuehniella*, hybridizovala na chromosomální preparáty *Cadra cautella*, *Plodia interpunctella* a *Galleria mellonella*. Výsledky odhalily částečnou míru homologie mezi sekvencemi chromosomu W *E. kuehniella* a dvou druhů podčeledi Phycitinae (*C. cautella* a *P. interpunctella*), ale u zástupce podčeledi Galleriinae (*G. mellonella*) nebyly nalezeny téměř žádné hybridizační signály. Tato rychlá ztráta homologie mezi sekvencemi chromosomů W blízce příbuzných druhů je nejpravděpodobněji důsledkem jeho repetitivního složení (viz výše). Na chromosomu Z motýlů nebyly doposud takovéto evoluční studie provedeny.

1.7. Obaleč jablečný (*Cydia pomonella*)

Modelovým objektem této práce je obaleč jablečný, *Cydia pomonella* (L.), z čeledi Tortricidae (obalečovití). Tento druh je významným škůdcem mírného klimatického pásu, neboť jeho larvy způsobují červivost jádrového ovoce a ořechů. Má standardní systém pohlavních chromosomů typu WZ/ZZ, přičemž chromosom W tvoří v interfázních jádrech samic heterochromatinové tělíčko, W

chromatin. Karyotyp obaleče jablečného se skládá z $2n = 56$ chromosomů holokinetického typu. Chromosomy jsou rozděleny do pěti skupin podle velikosti: extra velké (3 páry), velké (3 páry), středně velké (15 párů), malé (5 párů) a nejmenší („dot-like“) (2 páry). Do první skupiny patří mimo jiné i pohlavní chromosom Z, který je vůbec největším elementem celého karyotypu. Díky své velikosti je relativně snadno rozpoznatelný, což je vzhledem k absenci proužkovacích technik u motýlů velmi výhodné (Fuková a kol. 2005).

2. Cíle práce

Rychlá degenerace a značná molekulární divergence ve složení chromosomu W nám znemožňuje jeho využití pro studium evoluční historie pohlavních chromosomů. Zvláště jeho vysoce repetitivní charakter brání identifikaci a sekvenaci hypotetických genů. Proto se další výzkumy naší laboratoře zaměřily na pohlavní chromosom Z, který obsahuje množství transkripčně aktivních genů. Díky tomu by mohl být chromosom Z vhodným nástrojem ke sledování homologie a rychlosti změn mezi pohlavními chromosomy i evolučně vzdálených druhů motýlů.

Pro ověření využitelnosti chromosomu Z pro studium evoluce pohlavních chromosomů lze použít dvou metodických přístupů. První z nich byl tématem mé bakalářské diplomové práce a spočíval v získání vzorku DNA chromosomu Z obaleče jablečného pomocí laserové mikrodisekce a jeho následné amplifikaci metodou PCR s degenerovanými primery (“degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction”, tzv. DOP-PCR). Tento vzorek jsem měla využít ke konstrukci malovací (“painting”) sondy pro pohlavní chromosom Z obaleče a v případě úspěchu tuto sondu hybridizovat na chromosomální preparáty vybraných druhů motýlů a přímo tak studovat evoluční historii chromosomů Z metodou Zoo-FISH. Alternativním využitím vzorku byla konstrukce DNA knihovny chromosomu Z s cílem získat specifické sekvence, jež by mohly být použity jako sondy pro prohledání (“screening”) BAC knihovny obaleče jablečného.

Druhý přístup je tématem magisterské diplomové práce mého kolegy Bc. Petra Nguyena a je založen na identifikaci a izolaci ortologů genů, známých z chromosomu Z bource morušového (*Bombyx mori*), a jejich následné využití jako markerů pro studium evoluce na chromosomech vybraných druhů motýlů.

3. Materiál a metody

3.1. Použitý hmyz

Pokusy byly prováděny na laboratorním kmeni Krym-61 obaleče jablečného (*Cydia pomonella*). Larvy obaleče byly chovány na umělé stravě v místnosti o stálé teplotě (27±1°C) a v nediapauzních světelných podmínkách při fotoperiodě 16/8 h (den/noc). Detailnější informace o původu tohoto kmene a o způsobu chovu jsou uvedeny v publikaci Fuková a kol. (2005).

3.2. Příprava preparátů pro laserovou mikrodisekci

3.2.1. Příprava skel se speciální PEN membránou

Pro laserovou mikrodisekci jsem nejdříve musela připravit skla se speciální polyethylén-naftthalátovou membránou (PEN membrána o tloušťce 0,013 mm; Goodfellow, Huntingdon, Anglie) a to následujícím způsobem. Do středu krycího skla (75 x 25 mm, tloušťka 0,17 mm; vyrobena na zakázku firmou MENZEL-GLASER, Braunschweig, SRN) jsem nanasla kapku cca 30 µl etanolu a ihned na ní umístila PEN membránu, kterou jsem před tím nastříhala na obdélníky o velikosti 18 x 35 mm. Membránu jsem následně uhladila kouskem papíru a okraje oblepila ze všech stran lakem na nehty. Po zaschnutí laku jsem přešla lakem všechny její strany ještě jednou, abych měla jistotu, že se etanol neodpaří. Takto připravené krycí sklíčka jsem před použitím sterilizovala 30 min. UV světlem, následně ponořila na 1 min. do 96% etanolu a nechala je na vzduchu uschnout. Takto připravená krycí skla jsem pro větší pevnost umístila na skla podložní.

3.2.2. Příprava chromosomálních preparátů

Samčí chromosomální preparáty pro laserovou mikrodisekci jsem připravovala pomocí tzv. "spreading" techniky na histologické plotýnce s drobnými obměnami podle protokolu Fuková a kol. (2007). Testes jsem vypitvala ve fyziologickém roztoku pro *Ephestia kuehniella* (0,9% NaCl, 0,042% KCl, 0,025% CaCl₂, 0,02% NaHCO₃, případně 0,025% glukosy; Glaser 1917, citováno v Lockwood 1961). Poté jsem je přenesla buď na 15 – 20 min. do hypotonického roztoku (0,075 M KCl) nebo na 10 min. do hypotonického roztoku s detergentem (0,075 M KCl, 0,02% roztok detergentu Joy od firmy Procter & Gamble, Cincinnati, OH, USA). Během hypotonizace jsem testes očistila wolframovými jehlami a v dalším kroku je přenesla na 10 - 30 min. do čerstvě připravené fixáže dle Carnoye (etanol – chloroform – kyselina octová, v poměru 6:3:1). Fixované testes jsem po dvou až třech kusech přemístila do 10 – 14 µl kapky 60% kyseliny octové na sklo potažené PEN membránou a macerovala je pomocí wolframových jehel. Po maceraci jsem sklo s membránou položila na vyhřátou histologickou plotýnku (45°C) a za občasného posouvání kapky jehlou jsem nechala kapku odpařit.

Připravené preparáty jsem nejméně 10 min. barvila v 5% Giemse (PENTA, Chrudim) v 0,1 M Sørensenově fosfátovém pufru (0,05 M Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 0,05 M KH₂PO₄, pH = 6,8). Nabarvené preparáty jsem skladovala při 4°C do dalšího použití.

3.3. Laserová mikrodisekce

Vlastní mikrodisekce byla provedena za pomoci P.A.L.M. Microlaser System (P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, SRN) za odborného vedení Dr. Svatavy Kubíčkové ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně. Preparáty umístěné v inverzním mikroskopu byly prohlédnuty a vybraly se pouze ty mitotické metafáze, u kterých byl chromosom Z dobře rozpoznatelný dle velikosti a izolovaný od ostatních chromosomů. Vybrané chromosomy Z byly vyříznuty slabým laserovým paprskem (1,5 – 1,7 μJ/puls, 1 μm v průměru) a pomocí silnějšího paprsku (2 μJ/puls) katapultovány do víčka mikrozkušavky s 2 μl minerálního oleje pro PCR. Každý vzorek obsahoval 6 – 15 vyřezaných chromosomů, které byly pro další použití rozpuštěny v pufru pro PCR (10 mM Tris-HCl, pH = 8,8) a stočeny v centrifuze 2 min. při 13000 r.p.m.

3.4. Příprava malovací sondy pro chromosom Z

DNA získanou z první mikrodisekce jsem namnožila pomocí polymerázové řetězové reakce s degenerovanými oligonukleotidovými primery (DOP-PCR) s mírnými obměnami podle protokolu Kubíčková a kol. (2002). PCR reakce o celkových objemech 11,7 μl a 14,7 μl obsahovaly 5,1 mM Tris HCl (pH = 8,8), 0,76x pufru “Blue buffer” (Top-Bio, Praha), 1,79 mM MgCl₂, 0,05% pufru W-1, směs 0,2 mM dNTP nukleotidů, 1,63 μM DOP-primerů (5'-CCGACTCGAGNNNNNNATGTGG-3') a 0,6 U *Ex Taq* polymerázy (Takara, Otsu, Japonsko). U jednoho vzorku jsem pro získání delších fragmentů k zaklonování použila místo *Ex Taq* polymerázy LA polymerázu (Top-Bio, Praha). Do PCR reakcí jsem přidala navíc 10 μl PCR oleje, abych zabránila případnému vypaření směsi. Teplotní profil každé reakce se skládal z denaturace 3 min. při 96°C, po které následovalo 8 cyklů sestávajících z denaturace 1 min. při 96°C, nasedání (“annealing”) 1 min. při 30°C a prodlužování (“extension”) 1 min. při 72°C. Další 35 cyklů reakce sestávalo z denaturace 1 min. při 94°C, nasedání 1 min. při 56°C a prodlužování 2 min. při 72°C. Posledním krokem bylo závěrečné prodlužování 5 min. při 72°C. PCR produkty jsem analyzovala v 1% agarózovém gelu v 1x pufru TAE (40 mM Tris-acetát, 1 mM EDTA, pH = 8).

Vzorky získané z druhé mikrodisekce jsem opět namnožila pomocí DOP-PCR, ale oproti předchozímu pokusu s mírnými obměnami. PCR reakce o celkových objemech 10 μl a 14 μl se skládaly z 0,25x “Blue buffer”, 1,95 mM MgCl₂, 0,05% pufru W-1, 1,55 μM DOP-primerů, 0,5x “PPP Master Mix” (Top-Bio, Praha) a 0,75 U *Ex Taq* polymerázy (Invitrogen Life Technologies,

Carlsbad, CA, USA). Do reakcí jsem opět přidala 10 µl PCR oleje. Teplotní profily reakcí a analýza produktů byly stejné jako v prvním případě.

Značení fluorochromem jsem pro všechny vzorky prováděla pomocí DOP-PCR značící reakce podle protokolu Fuková a kol. (2007). Jako templát jsem použila 2 µl PCR produktu první DOP-PCR. Reakce o celkových objemech 22 µl obsahovaly 0,68x "Blue buffer", 1,6 mM MgCl₂, 0,045% pufru W-1, směs 0,9 mM dNTP nukleotidů pro dUTP značení (všechny 0,18 mM až na dTTP, jejichž koncentrace byla 0,15 mM), 0,01 mM dUTP konjugované s fluorochromem SpectrumOrange (Vysis, Richmond, Anglie), 1,45 µM DOP-primerů a 1 U LA polymerázy. Reakce začínaly denaturací 3 min. při 95°C a poté následovalo 30 cyklů skládajících se z denaturace 30 s při 94°C, nasedání 40 s při 56°C a prodlužování 2 min. při 72°C. Závěrečné prodlužování bylo 5 min. při 72°C. PCR produkty jsem opět analyzovala v 1% agarózovém gelu.

3.5. Hybridizace *in situ*

3.5.1. Příprava preparátů

Preparáty pro fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH) jsem připravovala pomocí "spreading" techniky dle protokolu uvedeného v práci Mediouni a kol. (2004). Ovária i testes jsem vypitvala ve fyziologickém roztoku. Testes jsem nejdříve přenesla na 15 min. do hypotonického roztoku (0,075 M KCl) a poté na nejméně 10 min. do fixáže dle Carnoye (viz výše). Vypitvaná ovária jsem rovnou přenesla na 10 min. do fixáže. Fixovanou tkáň jsem přemístila do kapky 60% kyseliny octové na podložní sklo očištěné v kyselém etanolu (1% HCl v 96% etanolu) a macerovala ji pomocí wolframových jehel. Sklo jsem následně umístila na vyhřátou plotýnku, kde se kapka postupně odpařovala za občasného posouvání jehlou. Takto připravené preparáty jsem odvodnila v etanolové řadě (70% - 80% - 100%, v každém 1 min.) a skladovala do dalšího použití při -20°C.

3.5.2. Izolace genomové DNA ze samic obaleče jablečného

Genomovou DNA pro přípravu kompetitora pro FISH jsem izolovala z dospělých samic standardní fenol - chloroform - isoamylalkoholovou extrací. Nejdříve jsem si navázila 0,5 g samic bez zadečků, které jsem následně přenesla do tekutým dusíkem vychlazené třecí misky a tam je zhomogenizovala. Vzniklý prášek jsem přenesla do Falkonovy zkumavky s 10 ml připraveného extračního pufru (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 0,5% sarkosylu, 100 µg/ml proteinázy K) a nechala směs promíchávat při 37°C přes noc ve vodní lázni. Druhý den jsem k roztoku přidala 10 µl RNázy A (koncentrace zásobního roztoku: c = 10 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a nechala inkubovat další 1 h při 37°C. Poté jsem ke vzorku přidala 10 ml fenolu (pH = 8) a nechala inkubovat po dobu 30 min. na třepačce. Směs jsem následně 15 min. centrifugovala (5000 g, 20°C, zrychlení a zpomalení 5).

Po centrifugaci jsem přenesla horní vrstvu s DNA do čisté zkumavky, přidala k ní 10 ml fenolu, nechala 30 min. promíchávat a nakonec směs 15 min. centrifugovala za stejných podmínek. Horní fázi jsem opět přenesla do nové Falconovy zkumavky a nechala jí inkubovat 15 min. s 8 ml směsí fenolu - chloroformu - isoamylalkoholu v poměru 25:24:1. Poté jsem roztok nechala 15 min. centrifugovat (viz výše). Horní fázi jsem opět přenesla a doplnila 8 ml směsí chloroformu - isoamylalkoholu v poměru 24:1. Extrakce pokračovala stejně jako v předchozích krocích 15 min. inkubací na třepačce a centrifugací.

Vzniklou horní vrstvu jsem přenesla do čisté zkumavky a přidala 1/10 objemu 3M octanu sodného, promíchala a doplnila 7/10 objemu 100% isopropanolu. Směs jsem pozvolna promíchávala, dokud se nevysráželo klubko vláken DNA. Vysráženou DNA jsem přenesla pomocí skleněného háčku do zkumavky s 500 µl 70% etanolu a nechala 10 min. centrifugovat (3000 g, 20°C, zrychlení a zpomalení 5). Následně jsem odstranila etanol, přidala 500 µl čerstvého etanolu a nechala za stejných podmínek centrifugovat. Po centrifugaci jsem odsála veškerý etanol a pelet ponechala vyschnout. Nakonec jsem přidala tolik 1x TE pufru (0,01 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), aby přibližná koncentrace DNA byla kolem 500 ng/µl.

Kvalitu izolované DNA jsem zjišťovala štěpením DNA restriktázou *EcoRI* (Takara) a gelovou elektroforézou naštěpeného a nenaštěpeného vzorku. Na jednu kontrolní reakci jsem smíchala 7,5 µl miliQ vody, 1 µl pufru H (Takara), 0,5 µl enzymu *EcoRI* a 1 µl DNA a směs nechala 1 h inkubovat při 37°C. Připravené vzorky DNA jsem srovnávala v 1% agarózovém gelu.

3.5.3. Fluorescenční *in situ* hybridizace

Pro detekci chromosomu Z jsem použila fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH) se sondou získanou z DOP-PCR značící reakce a to v přítomnosti sonikátorem nafragmentované samičí celogenomové DNA jako kompetitora. Postupovala jsem podle protokolu Fuková a kol. (2007) s mírnými obměnami z protokolu pro komparativní genomovou hybridizaci (CGH) (Traut a kol. 1999).

Pro FISH jsem si nejprve připravila a zdenaturovala chromosomální preparáty. Skla s chromosomy obaleče jsem vyndala z mrazícího boxu, odvodnila v etanolové řadě (ledový 70% - 80% - 100%, v každém po dobu 1 min.) a nechala na vzduchu oschnout. Poté jsem na jednotlivé preparáty nanasla 100 µl 70% formamidu (příprava: 70 µl deionizovaného formamidu, 10 µl 20x SSC pufru a 20 µl miliQ vody). Směs jsem překryla krycím sklíčkem (24 x 50 mm) a nechala 3,5 min. denaturovat při 68°C. Ihned po denuraci jsem odstranila krycí sklíčko a preparát ponořila nejprve na 1 min. do ledového 70% etanolu a následně na 1 min. do 80% etanolu a na 1 min. do 100% etanolu. Takto odvodněné preparáty jsem nechala na vzduchu oschnout.

Na každý preparát jsem si připravila hybridizační směs, která obsahovala 0,9 µl nebo 2,7 µl fluorochromem značené sondy, 3 µg sonikátorem fragmentované samičí celogenomové DNA a 25 µg

sonikované DNA ze spermií lososa (Sigma-Aldrich). Pro precipitaci jsem přidala 1/10 objemu 3M octanu sodného a 2,5x objemu ledového 100% etanolu a hybridizační směs nechala 30 - 60 min. vysrážet při -80°C. Po precipitaci jsem vzorky 10 min. centrifugovala (13000 g, 4°C). Vzniklý supernatant jsem odstranila, pelet promyla přidáním 100 µl ledového 70% etanolu a opět 10 min. centrifugovala za stejných podmínek. Poté jsem supernatant dokonale odsála a pelet nechala vyschnout při 37°C. Pelet jsem rozpouštěla 30 min. v 5 µl 100% deionizovaného formamidu při 37°C, poté jsem přidala 5 µl 20% dextransu sulfátu v 2x SSC a hotovou hybridizační směs (výsledná koncentrace formamidu 50% a dextrans sulfátu 10%) denaturovala 5 min. při 95°C. Po denuraci jsem sondu okamžitě zchladila ponořením do ledové tříště na 3 min.

Na každé sklo s denaturovanými chromosomy jsem nanesla 10 µl denaturované sondy a preparát přikryla krycím sklíčkem (24 x 34 mm). Okraje krycího sklíčka jsem utěsnila kaučukovým lepidlem. Do připravené komůrky s papírem navlhčeným v 2x SSC pufru jsem takto připravené preparáty vložila a nechala 3 dny hybridizovat.

Po hybridizaci jsem z preparátů odmyla krycí sklíčka při pokojové teplotě v 1% Triton X-100/0.1x SSC. Podložní skla jsem následně přemístila do 1% Triton X-100/0.1x SSC přehřátého na 62°C a nechala odmyvat při této teplotě 5 min. ve vodní lázni. Po omytí jsem preparáty podbarvila DAPI (Sigma-Aldrich) tak, že jsem je nejdříve ponořila na 5 min. do PBS/1% Triton X-100 a poté na 15 min. do roztoku PBS/1% Triton X-100 s DAPI o koncentraci 0,5 µg/ml. Skla jsem po obarvení promyla nejdříve 5 min. v PBS/1% Kodak PhotoFlo a poté 1 min. v sterilní miliQ vodě/1% PhotoFlo. Nakonec jsem na každý preparát kápala 20 µl média zabraňujícího vyhasínání fluorescence, tzv. "antifade", připraveného z DABCO (Sigma-Aldrich) a vše zakryla krycím sklíčkem (24 x 32 mm). Přebytek média jsem odstranila filtračním papírem a okraje krycího sklíčka utěsnila lakem na nehty.

Preparáty jsem prohlížela ve fluorescenčním mikroskopu Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Jena, SRN). Fotografie jsem snímala pro každou fluorescenční barvu zvlášť chlazenou CCD kamerou F-View pomocí programu Analysis Software, verze 3.2 (Soft Imaging System GmbH, Münster, SRN). Snímky jsem poté obarvila a složila v programu Adobe Photoshop, verze 7.0.

3.6. Příprava sekvencí DNA chromosomu Z

3.6.1. Klonování

3.6.1.1. Namnožení a přesrážení PCR produktů

Pro klonování jsem použila DNA ze vzorku chromosomů Z získaných laserovou mikrodisekcí po první amplifikaci metodou DOP-PCR. Nejprve jsem však tuto DNA znovu namnožila pomocí DOP-PCR a přesrážela ji. PCR reakce o celkových objemech 22 µl obsahovaly 0,68x "Blue buffer", 1,6 mM MgCl₂, 0,045% pufru W-1, směs 0,9 mM dNTP nukleotidů, 1,45 µM DOP-primerů a 1 U *Ex*

Taq polymerázy (Takara). Jako templát jsem použila 2 µl PCR produktu z první DOP-PCR. Teplotní profil reakcí byl stejný jako u DOP-PCR značící reakce (viz kapitola 3.4.).

Po namnožení jsem ke každému vzorku přidala 0,1x objem 3M octanu sodného a 2,5x objem vychlazeného 100% etanolu. Směs jsem dala na 1 h do -80°C a následně ji 20 min. centrifugovala (13000 g, 4°C). Poté jsem odstranila supernatant, přidala 100 µl vychlazeného 70% etanolu a 5 min. centrifugovala za stejných podmínek. Následně jsem odstranila veškerý supernatant a pelet nechala vyschnout. Nakonec jsem takto přesráženou DNA rozpustila v 20 µl sterilní miliQ vody.

3.6.1.2. Ligační reakce

K ligaci vzorků jsem použila kit pGEM-T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA). Na jednu ligační reakci jsem smíchala 5 µl 2x ligačního pufru, 1 µl “Easy Vector” (50 ng), 1 µl ligázy, 1 µl miliQ vody a 2 µl DNA. Takto připravenou směs jsem nechala inkubovat přes noc při 4°C.

3.6.1.3. Klonování vzorků

Druhý den jsem 2 µl zligované směsi přidala k 50 µl elektrokompetentních buňek *E. coli* (kmen DH5α) a nechala směs cca 1 min. stát. Elektroporaci jsem prováděla v elektroporátoru 2510 (Eppendorf AG, Hamburg, SRN) při napětí 12,5 kV/cm. Pokud byl puls optimální, časová konstanta se pohybovala kolem 5,4 ms. Vzorky jsem následně přenesla do LB média (1% peptonu, 0,5% kvasničného extraktu, 0,5% NaCl) s 2% glukózou a nechala 1 h inkubovat při 37°C na třepačce.

Poté jsem bakterie vysela na plotny (LB médium s 2% agarem, 100 µg/ml ampicilinu, 350 µM IPTG, 35 µg/ml X-Gal). Na každou ligační reakci jsem použila dvě plotny. Na první z nich jsem přenesla 100 µl transformovaných buňek a rozetřela je sterilní skleněnou zahnutou tyčinkou („hokejkou“). Zbytek směsi jsem přelila do zkumavky a nechala 5 min. centrifugovat (3000 g, 4°C). Většinu supernatantu jsem odstranila až na cca 200 µl, ve kterých jsem pelet opět resuspendovala. Poté jsem směs přenesla na druhou plotnu a opět rozetřela „hokejkou“. Bakterie jsem nechala množit přes noc při 37°C.

3.6.1.4. Přečárkování a PCR kontrola vyrostlých kolonií

Na plotnách mohly vyrůst dva typy kolonií, modré bez inzertu a bílé s inzertem. Bílé kolonie jsem za pomoci sterilního párátko přečárkovala na nové plotny (LB médium s 2% agarem, 100 µg/ml ampicilinu) a abych zjistila velikost inzertů, provedla jsem zároveň kontrolu úspěšně zaklonovaného inzertu pomocí PCR. Každá reakce o celkovém objemu 10 µl obsahovala 1x *Ex Taq* pufru, směs 0,8 mM dNTP nukleotidů, 1 µM primeru M13-24 (5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3') a 1 µM primeru M13-26 (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') (Generi Biotech, Hradec Králové) a 1 U

Ex Taq polymerázy (Takara). DNA jsem do reakční směsi přenesla ještě před přečárkováním na novou ampicilinovou plotnu tak, že jsem párátka s kolonií ve směsi protřepala. Plotny jsem nechala inkubovat přes noc při 37°C. Produkty PCR jsem analyzovala v 1% agarózovém gelu.

3.6.2. Sekvenování

3.6.2.1. Množení bakterií a izolace plazmidů

Pro namnožení bakterií jsem si nejprve připravila do sterilních skleněných zkumavek médium, které obsahovalo 2 ml LB média a 20 µl ampicilinu. Sterilním párátkem jsem z ampicilinové plotny seškrábla kus vyrostlé kolonie obsahující inzert a párátka vhodila do připraveného roztoku. Zkumavku jsem překryla alobalem a nechala inkubovat přes noc při 37°C na třepačce.

Médium jsem druhý den přelila do čisté zkumavky, nechala 5 min. centrifugovat (13000 g, 4°C) a poté odstranila veškerý supernatant. Plazmidy jsem následně izolovala pomocí soupravy QIAprep Spin Miniprep Kit (250) (Qiagen, Düsseldorf, SRN) dle návodu výrobce.

Pro sekvenaci jsem DNA plazmidů s nízkou koncentrací namnožila pomocí PCR a přesrážela ji. PCR jsem prováděla stejně jako v kapitole 3.6.1.4., až na to, že objem reakční směsi byl 25 µl a jako templát jsem použila 0,1 µl plazmidové DNA. Výsledné produkty jsem přesrážela (viz kapitola 3.6.1.1.) a získanou DNA rozpustila v 10 µl sterilní miliQ vody.

3.6.2.2. Sekvenační reakce a precipitace

Pro sekvenaci vzorků jsem použila soupravu Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Do sekvenační reakce o celkovém objemu 20 µl jsem dala 600 – 900 ng plazmidové DNA spolu s 2 µl RR pufru, 3 µl sekvenačního pufru a 1 µl primeru M13-26. Inzerty delší než 650 bp jsem sekvenovala z obou stran tak, že jedna PCR reakce obsahovala primer M13-26 a druhá primer M13-24. Teplotní profil reakcí byl následující: počáteční denaturace 2 min. při 94°C, po které následovalo 35 cyklů denaturace 10 s při 94°C, nasedání 10 s při 53°C a prodlužování 4 min. při 60°C.

Každý produkt PCR jsem přenesla do 1,5 ml mikrozukavky, přidala 80 µl 75% isopropanolu a směs nechala stát 30 min. při pokojové teplotě. Poté jsem vzorky 20 min. centrifugovala (13000 g, 20°C), odstranila supernatant a doplnila 200 µl čerstvého 75% isopropanolu. Po další centrifugaci za stejných podmínek jsem odstranila veškerý supernatant a precipitovanou DNA nechala vyschnout. Takto připravené vzorky jsem předala k analýze na sekvenátoru.

3.6.2.3. Vyhodnocení výsledků

Získané sekvence jsem v dalších krocích upravila v internetovém programu BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”). Nejprve jsem odstranila za pomoci funkce “vector contamination” sekvence vektorového původu a poté jsem inzerty porovnávala s doposud známými nukleotidovými sekvencemi. Pro vyřazení duplikovaných sekvencí jsem inzerty srovnávala mezi sebou v programu BioEdit Sequence Alignment Editor.

3.6.3 Southern hybridizace

Southern hybridizace je technika založená na kapilárním přenosu naštěpené DNA z agarózového gelu na nylonovou membránu. Po takovéto imobilizaci DNA následuje hybridizace se značenou sondou, promývání a nakonec detekce sondy protilátkou.

3.6.3.1. Příprava sond

Značené sondy DNA pro Southern hybridizaci jsem získala z plazmidů obsahujících inzert pomocí PCR. Každá reakce o celkovém objemu 12,5 µl obsahovala 20 ng plazmidové DNA, 1x *Ex Taq* pufru, směs 0,8 mM dNTP nukleotidů (0,08 mM dGTP, dATP a dCTP, 0,054 mM dTTP, 0,028 mM dioxigenin-11-dUTP), 1 µM primeru M13-24, 1 µM primeru M13-26 a 1 U *Ex Taq* polymerázy (Takara). Teplotní profil reakce se skládal z denaturace 3 min. při 94°C, po které následovalo 30 cyklů sestávajících z denaturace 30 s při 94°C, nasedání 30 s při 55°C a prodlužování 2 min. při 72°C. Posledním krokem bylo závěrečné prodlužování 5 min. při 72°C.

3.6.3.2. Štěpení celogenomové DNA

Samičí i samčí DNA jsem izolovala standardní fenol - chloroform - izoamylalkoholovou extrakcí (viz kapitola 3.5.1.). Každý vzorek DNA jsem štěpila dvěma restrikčními enzymy, *EcoRI* a *PstI* (Takara). Štěpící reakce obsahovala 5 µg buď samičí nebo samčí DNA, 1x pufr H a 30 U enzymu. Vzorky jsem inkubovala přes noc při 37°C.

3.6.3.3. Elektroforetická separace naštěpené DNA

Druhý den jsem fragmenty naštěpené DNA elektroforeticky separovala v 1% agarózovém gelu v 1x TBE pufru (89 mM Trizma base, 2 mM EDTA, 89 mM kyselina boritá, pH = 8). Vzorky jsem nanasla do jamek v gelu společně s velikostním markerem značeným digoxigeninem, který jsem připravila smícháním 4 µl DIG markeru III (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, SRN), 4 µl

“Loading buffer” (Takara) a 2 μ l miliQ vody a inkubací směsi 10 min. při 65°C. Gelová elektroforéza probíhala rychlostí 5 V/cm po dobu 3 – 4 h. Poté jsem gel krátce obarvila v ethidium bromidu (0,5 μ g/ml) a vyfotila jej, abych se ujistila, že je DNA dobře naštěpená a že koncentrace samičí i samčí DNA je v jednotlivých drahách přibližně stejná.

3.6.3.4. Southern blotting

Po vyfocení jsem gel ponořila do 0,25 M HCl na dobu, než se modrá barva bromfenolu nosného pufru změnila na žlutou. Při tomto kroku se dlouhé fragmenty DNA degradovaly na kratší úseky, které byly následně schopny kapilárního přenosu na membránu. Po opláchnutí gelu destilovanou vodou jsem ho nechala inkubovat 2x 15 min. při pokojové teplotě v denaturačním roztoku (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) na třepačce. Po inkubaci jsem gel opláchla destilovanou vodou a nechala promíchávat 2x 15 min. při pokojové teplotě v neutralizačním roztoku (0,5 M Tris-HCl, 3 M NaCl, pH = 7).

Mezitím jsem připravila “sendvič” pro vlastní přenos fragmentů DNA na membránu a to tak, že jsem do misky vložila dnem vzhůru vaničku pro elektroforézu a na ní umístila filtrační papír předvlhčený v 20x SSC (pH = 6,4). Na tento papír jsem položila vrchní stranu připraveného gelu a vše zalila dostatečným množstvím 20x SSC. Na gel jsem přiložila nylonovou membránu (Hybond-N+, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Anglie) tak, aby přesahovala velikost gelu přibližně o 1 mm. Kraje membrány jsem obložila parafilmem, abych zabránila případnému vztlínání pufru mimo gel a membránu. Na membránu jsem následně umístila 2 filtrační papíry předvlhčené v 20x SSC a 6 cm silnou vrstvu buničiny. Na vrch jsem položila sklo se zátěží a celý sendvič nechala stát přes noc.

Druhý den jsem sendvič rozebrala a membránu promývala 5 min. v 6x SSC pufru. Po oschnutí jsem membránu fixovala v přístroji UV Crosslinker (Stratagene, San Antonio, TX, USA) při 120 mJ a poté ji opláchla 5 min. v 2x SSC pufru.

3.6.3.5. Hybridizace DNA se značenou sondou

Membránu s fixovanou DNA jsem přenesla do hybridizačního válce s 20 ml přehřátého prehybridizačního roztoku DIG Easy Hyb (Roche) a nechala ji inkubovat 30 – 60 min. při 42°C za stálého míchání v hybridizační píce. Mezitím jsem si připravila hybridizační roztok tak, že jsem smíchala 100 ng značené sondy s 50 μ l miliQ vody a směs denaturovala 5 min. při 95°C ve vodní lázni. Ihned po denuraci jsem vzorky chladila několik minut v ledové tříšti. K sondě jsem nakonec přidala 6,5 ml hybridizačního roztoku DIG Easy Hyb.

Po prehybridizaci jsem z válce odstranila veškerý roztok a membránu zalila hybridizačním roztokem obsahující denaturovanou sondu. Vše jsem nechala inkubovat přes noc při 42°C v hybridizační píce.

3.6.3.6. Promývání a chemiluminiscenční detekce

Po hybridizaci následovalo promývání membrány, které odstranilo nespecificky navázané molekuly sondy. Nejdříve jsem membránu ponořila na 2x 15 min. do pufru “Stringent wash buffer I” (2x SSC, 0,1% SDS) a nechala promývat při pokojové teplotě na třepačce. Následně jsem ji přemístila do předehřátého pufru “Stringent wash buffer II” (0,2x SSC, 0,1% SDS) a nechala inkubovat 20 minut při 68°C v hybridizační pánvi. Membránu jsem znovu promyla, tentokrát 5 min. v promývacím roztoku s 0,3% Tween v 1x TBS pufru (25 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl, pH = 7,5).

Následně jsem membránu přemístila do blokovacího roztoku s 5% sušeným mlékem Difco Skim Milk (Becton, Dickinson and Company, Francie) v 1x TBS pufru a nechala inkubovat 30 min. při pokojové teplotě. Poté jsem ji přenesla do blokovacího roztoku s protilátkou (ředění 1:10000) Anti-Dioxigenin-AP (Roche) obsahující alkalickou fosfatázu a nechala promíchávat nejméně 30 min. při 23°C.

Po inkubaci s protilátkou jsem membránu promyla 2x 15 min. promývacím roztokem a následně ji přemístila na 2 – 5 min. do detekčního pufru (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH = 9,5). Ještě vlhkou membránu jsem přenesla na otevřenou spodní stranu hybridizačního sáčku a nanasla na ni přibližně 40 kapek roztoku chemoluminiscenčního substrátu (CDP-Star ready to use, Roche). Membránu jsem inkubovala 5 min. při pokojové teplotě, poté odstranila přebytečný substrát a okraje sáčku zatavila. Výsledky hybridizace jsem dokumentovala pomocí přístroje LAS-3000 Lumi-Imager (Fuji Photo Film Europe GmbH, Düsseldorf, SRN).

4. Výsledky

Celý pokus s vyřezáváním chromosomů jsem provedla celkem dvakrát. Výsledky jsem pro přehlednost rozdělila do dvou oddělených kapitol.

4.1. První laserová mikrodisekce

Jak už bylo zmíněno v úvodu, předpokladem pro úspěšnou mikrodisekci je dostatek dobře rozptýlených chromosomů. Po sérii pokusů se ukázalo jako ideální stádium pro získání velkého množství mitotických chromosomů spermatogonií 9. - 10. den po vylíhnutí housenky z vajíčka. Pro snížení rizika kontaminace ostatními chromosomy jsem mitotická metafázní jádra rozptýlila za pomoci hypotonického roztoku (0,075 M KCl). Předběžné pokusy ukázaly, že metafázní chromosomy jsou u většiny jader v dostatečné vzdálenosti od sebe po 15 - 20 min. hypotonizaci (Obr. 1a). Oba chromosomy Z byly identifikovány jako dva největší elementy v karyotypu obaleče.

Za pomoci laserové mikrodisekce jsem získala 3 vzorky, které obsahovaly 9, 9 a 15 vyřezaných chromosomů Z. DNA těchto vzorků jsem následně namnožila pomocí DOP-PCR a elektroforeticky separovala v 1% agarózovém gelu. Velikost získaných produktů PCR namnožených pomocí *Ex Taq* polymerázy se pohybovala v rozmezí 300 – 1200 bp. Nejdelší fragmenty DNA 300 – 2000 bp měl však vzorek, u kterého jsem použila místo *Ex Taq* polymerázy LA polymerázu. Tento vzorek jsem také následně zaklonovala a inzerty z pozitivních klonů osekvenovala. Po řadě pokusů se mi však podařilo získat pouze 5 inzertů, jejichž velikost byla 319 - 405 bp. Izolované plazmidy s inzertem jsem po namnožení a přesrážení osekvenovala. Všechny sekvence byly bakteriálního původu (*Acinetobacter baumannii*). Zbylé dva vzorky se mi vůbec nepodařily zaklonovat.

Sondy, vyrobené za pomoci DOP-PCR značící reakce o velikostech v rozmezí 200 - 4000 bp, jsem hybridizovala na samičí i samčí chromosomální preparáty obaleče jablčného, *C. pomonella*. Nejdříve jsem hybridizaci provedla bez kompetitora, poté s použitím neznačené sonikované samičí DNA jako druhově specifického kompetitora. Na samčích preparátech byly v obou případech hybridizační signály sond slabé a rovnoměrně rozšířené na pohlavních chromosomech i autosomech (Obr. 1b, 1c). Sondy hybridizované na samičích preparátech označily chromosom W a sex chromatin více než ostatní chromosomy (Obr. 1d, 1e). Ani u samice neměl kompetitor na specifitu sond žádný výrazný vliv, pouze ubral množství hybridizačních signálů (Obr. 1f, 1g).

4.2. Druhá laserová mikrodisekce

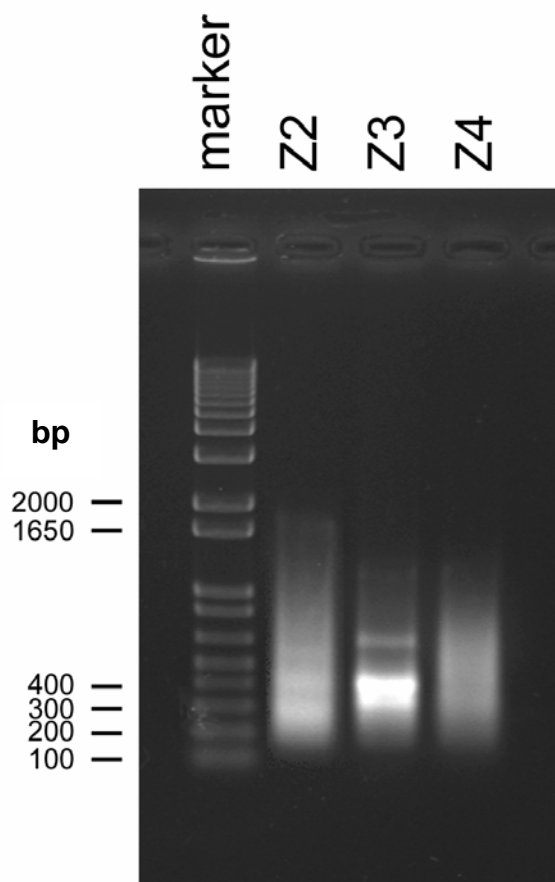
Jelikož nebyla žádná z připravených sond specifická pro chromosom Z a neuspěla jsem ani při zaklonování vyřezané DNA, celý pokus jsem proto s mírnými obměnami zopakovala.

4.2.1. Laserová mikrodisekce a příprava sondy

Pro ještě lepší rozptýlení chromosomů jsem tentokrát použila hypotonický roztok s Joy detergentem. Díky detergentu se chromosomy lépe uvolnily z mitotického jádra, což zvýšilo šanci, že bude alespoň kolem jednoho chromosomu Z dostatek místa pro laserový paprsek o průměru 1 μm (Obr. 3a).

Za pomoci druhé mikrodisekce jsem získala další 3 vzorky. Dva z nich (pracovní název Z2 a Z3) obsahovaly po 11 vyřezaných chromosomech a jeden (Z4) sestával pouze z 6 disektovaných pohlavních chromosomů. Každý vzorek jsem nejprve namnožila pomocí DOP-PCR. Získané produkty jsem analyzovala v 1% agarózovém gelu, který odhalil velikost DNA fragmentů pohybující se od 150 bp do 1500 bp. Značení červeným fluorochromem (SpectrumOrange) jsem pro všechny vzorky provedla pomocí DOP-PCR značící reakce. Následnou separací DNA fragmentů v agarózovém gelu jsem zjistila velikost produktů PCR odpovídající délce 150 – 1800 bp (Obr. 2). Složení jednotlivých sond se však po značící reakci značně lišilo. Zejména u sondy Z3 bylo amplifikováno nejvíce fragmentů DNA v rozmezí 300 – 400 bp.

Obr. 2. Sondy získané z DOP-PCR značící reakce separované na 1% agarózovém gelu.



4.2.2. Ověření specificity sond fluorescenční *in situ* hybridizací

Pro detekci chromosomu Z jsem opět použila fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH) se sondami získanými z DOP-PCR značící reakce. Nejdříve jsem hybridizovala sondu Z2 na samčí a samičí chromosomální preparáty bez použití kompetitora. Na samčích preparátech jsem ani tentokrát nenalezla žádné výraznější hybridizační signály. SONDY slabě označily autosomy i pohlavní chromosomy. Chromosom Z nebyl prokazatelně rozpoznatelný na pachytenních ani na mitotických chromosomech (Obr. 3b, 3c). Na samičích preparátech byl oproti ostatním chromosomům výrazně označen chromosom W, a to ve všech stádiích mitózy, meiózy i v interfázních jádrech (Obr. 3d, 3e, 3f). Velmi zajímavý byl pattern značení chromosomu W. SONDY označily téměř celý pohlavní chromosom až na krátké úseky na jeho koncích (Obr. 3e šipky). Při použití samičí kompetiční DNA jsem nenašla žádné významnější rozdíly. Kompetitor v malé míře odebral množství hybridizačních signálů a to na samčích i na samičích preparátech (Obr. 3g, 3h).

V dalších pokusech jsem hybridizovala sondy Z3 a Z4 na chromosomální preparáty samců i samic nejdříve bez kompetitora, poté s použitím neznačené sonikované samičí DNA jako kompetitora. Výsledky byly stejné jako v předchozích případech. Signál sondy Z3 byl na chromosomálních preparátech samců v přítomnosti kompetitora i bez něj slabý a rovnoměrně rozprostřený po všech chromosomech (Obr. 4a, 4b, 4c, 4d). Na preparátech samic však sonda v obou případech označila chromosom W a sex chromatin (Obr. 4e, 4f, 4g, 4h, 4i). Signál sondy byl však velmi slabý a kromě chromosomu W jsem nenalezla žádné výraznější hybridizace.

Mnohem silnější hybridizační signály však poskytovala sonda Z4. Na pachytenních i mitotických chromosomech samců byl signál sondy velmi výrazný, ale opět rovnoměrně roztroušený po celém genomu (Obr. 5a, 5b). Na chromosomálních preparátech samic však sonda Z4 velmi silně označila sex chromatin i celý chromosom W a to včetně jeho konců (Obr. 5c, 5d). Velmi výrazně hybridizovala sonda i v přítomnosti kompetitora (Obr. 5e, 5f, 5g).

4.2.3. Analýza sekvencí DNA získaných mikrodisekcí chromosomů Z

Všechny vzorky po první amplifikaci DOP-PCR jsem nejprve zaklonovala. Oproti prvnímu pokusu s mikrodisekcí chromosomů Z se mi podařilo získat celkem 48 pozitivních klonů obsahujících inzert. Pouze několik plazmidů mělo po izolaci nízkou koncentraci DNA; inzerty těchto plazmidů jsem proto pro sekvenční reakci nejprve namnožila pomocí PCR a přesrážela. Ze získaných sekvencí bylo 9 lidského původu, ostatní jsem pro přehlednost seřadila do Tab. 1. Nejvíce inzertů (19) jsem získala klonováním vzorku Z2. Z těchto 19 sekvencí vykazovaly dvě částečnou homologii se sekvencemi v GenBank. První z nich byla z 46% homologní se sekvencí chobotnatky *Helobdella robusta* (kmen Annelida) a druhá z 33% s mikrosatelitem motýla jasoně červenookého, *Parnassius apollo* (Papilionidae). Ostatní neměly žádné výraznější podobnosti s doposud známými sekvencemi. Zaklonováním vzorku Z3 se mi podařilo dostat dalších 15 plazmidů obsahujících inzert. Z těchto

sekvencí byla jedna z 54% a druhá z 55% homologní se sekvencí motýla *Heliconius melpomene* (Nymphalidae). Z posledního vzorku Z4 jsem získala 5 sekvencí, z nichž byly tři z 30% homologní se sekvencemi révy vinné, *Vitis vinifera*. Všechny získané sekvence jsou prozatím uloženy v laboratoři F. Marece a po dokončení jejich analýz budou zaslány do GenBank.

Ověření výskytu inzertu v genomu obaleče jablečného a jeho případné specificity pro chromosom Z jsem provedla pomocí Southern hybridizace, a to z časových důvodů prozatím pouze pro inzerty CpZ6, CpZ11, CpZ13, CpZ24 a CpZ28 (Obr. 6a-e). Výsledky ukázaly, že žádná z těchto sekvencí není specifická pro chromosom Z a že se jedná o sekvence repetitivní povahy, vyskytující se v genomu obaleče v mnoha kopiích. Výrazné proužky v drahách se samičí genomovou DNA u inzertu CpZ6 indikují výskyt více kopií sekvence na chromosomu W, zatímco několik méně výrazných proužků v dráhách DNA obou pohlaví představují kopie autosomálního původu. Pouze jediný proužek byl intenzivnější v dráze se samčí genomovou DNA, z čehož lze vyvodit výskyt sekvence na chromosomu Z vzhledem ke dvěma kopiím chromosomu Z u samce oproti jedné u samice. Sekvenční motiv CpZ6 se tedy vyskytuje na všech chromosomech. Sonda motivu CpZ11 hybridizovala převážně se samičí DNA, což naznačuje akumulaci na chromosomu W, ale jedna nebo více kopií se nachází i na chromosomu Z. U motivu CpZ13 je patrné velké množství proužků společných pro samičí i samčí DNA, což naznačuje jeho převážně autosomální výskyt. Opět však nalezneme sekvence vyskytující se na chromosomu W i na chromosomu Z. Sekvence motivu CpZ24 se nacházejí ve velké míře na chromosomu W, ale podle několika slabých signálů sondy, která hybridizovala i se samčí DNA lze soudit, že se některé kopie vyskytují i na autosomech. Motiv CpZ28 se vyskytuje na obou pohlavních chromosomech i na autosomech, přičemž ze všech testovaných sekvencí je na chromosomu Z zastoupen nejvíce. Dle výrazných hybridizačních signálů se samičí DNA je však též akumulován na chromosomu W.

Tab. 1 Přehled sekvencí DNA získaných mikrodisekcí chromosomů Z obaleče jablečného.

| Číslo inzertu | Pracovní název inzertu | Původ inzertu (vzorek) | Velikost (bp) | Homologie s jinými inzerty | Homologie v GenBank |
|---------------|------------------------|------------------------|---------------|---------------------------------|--|
| 1 | CpZ2 | Z2 | 112 | | ne |
| 2 | CpZ3 | Z2 | 193 | úplná s CpZ4 | ne |
| 3 | CpZ4 | Z2 | 193 | úplná s CpZ3 | ne |
| 4 | CpZ5 | Z2 | 234 | | ne |
| 5 | CpZ6 | Z2 | 157 | úplná s CpZ12 | ne |
| 6 | CpZ7 | Z2 | 436 | | ne |
| 7 | CpZ8 | Z2 | 231 | | ne |
| 8 | CpZ9 | Z2 | 277 | | ne |
| 9 | CpZ11 | Z2 | 277 | | ne |
| 10 | CpZ12 | Z2 | 157 | úplná s CpZ6 | ne |
| 11 | CpZ13 | Z2 | 282 | částečná s CpZ19 | ne |
| 12 | CpZ14 | Z2 | 362 | | homologie 46% (hodnota E = 6.10^{-4}) s <i>Helobdella robusta</i> |
| 13 | CpZ15 | Z2 | 329 | | ne |
| 14 | CpZ16 | Z2 | 391 | | homologie 33% (hodnota E = 2.10^{-9}) s mikrosatelitem <i>Parnassius apollo</i> |
| 15 | CpZ18 | Z2 | 271 | úplná s CpZ26 | ne |
| 16 | CpZ19 | Z2 | 281 | částečná s CpZ13 | ne |
| 17 | CpZ24 | Z2 | 304 | | ne |
| 18 | CpZ26 | Z2 | 271 | úplná s CpZ18 | ne |
| 19 | CpZ28 | Z4 | 231 | | ne |
| 20 | CpZ29 | Z3 | 270 | částečná s CpZ44 | ne |
| 21 | CpZ31 | Z3 | 378 | částečná s CpZ46 | ne |
| 22 | CpZ33 | Z3 | 379 | | ne |
| 23 | CpZ34 | Z3 | 631 | | ne |
| 24 | CpZ36 | Z2 | 242 | | ne |
| 25 | CpZ38 | Z3 | 396 | částečná s CpZ47 | homologie 54% (hodnota E = 1.10^{-25}) s <i>Heliconius melpomene</i> |
| 26 | CpZ39 | Z3 | 262 | | ne |
| 27 | CpZ40 | Z3 | 312 | | ne |
| 28 | CpZ41 | Z3 | 415 | | ne |
| 29 | CpZ43 | Z3 | 248 | | ne |
| 30 | CpZ44 | Z3 | 254 | částečná s CpZ29 | ne |
| 31 | CpZ45 | Z3 | 285 | | ne |
| 32 | CpZ46 | Z3 | 390 | částečná s CpZ31 | ne |
| 33 | CpZ47 | Z3 | 389 | částečná s CpZ38 | homologie 55% (hodnota E = 6.10^{-30}) s <i>Heliconius melpomene</i> |
| 34 | CpZ48 | Z3 | 374 | | ne |
| 35 | CpZ49 | Z4 | 247 | | ne |
| 36 | CpZ51 | Z4 | 355 | částečná s CpZ52, úplná s CpZ53 | homologie 30% (hodnota E = 2.10^{-4}) s <i>Vitis vinifera</i> |
| 37 | CpZ52 | Z4 | 356 | částečná s CpZ51 a CpZ53 | homologie 30% (hodnota E = 2.10^{-4}) s <i>Vitis vinifera</i> |
| 38 | CpZ53 | Z4 | 355 | úplná s CpZ51, částečná s CpZ52 | homologie 30% (hodnota E = 2.10^{-4}) s <i>Vitis vinifera</i> |
| 39 | CpZ56 | Z3 | 299 | | ne |

5. Diskuze

5.1. Fluorescenční *in situ* hybridizace se sondami pro chromosom Z

Příprava malovacích sond za pomoci laserové mikrodisekce a následné DOP-PCR se v naší laboratoři velmi osvědčila u pohlavních chromosomů W několika druhů motýlů. Vítková a kol. (2007) za pomoci mikrodisekce sex chromatinu zavíječe moučného (*Ephestia kuehniella*) připravili sondu, kterou následně hybridizovali na chromosomální preparáty tří dalších druhů motýlů metodou Zoo-FISH. Výsledky odhalily rychlou ztrátu homologie mezi sekvencemi chromosomů W. Fuková a kol. (2007) využili vzorky DNA chromosomu W, získané vyřezáním sex chromatinu obaleče jablečného (*C. pomonella*), nejen k přípravě vysoce specifické sondy pro FISH, ale i ke konstrukci první knihovny sekvencí DNA chromosomů W u motýlů.

Mým prvním úkolem bylo připravit sondu specifickou pro chromosom Z obaleče jablečného a hybridizovat ji na chromosomální preparáty blízce příbuzných druhů motýlu. Celkem jsem připravila sondy značené fluorochromem SpectrumOrange ze 6 různých vzorků DNA, získaných laserovou mikrodisekcí chromosomů Z z preparátů mitoticky se dělících spermatogonií obaleče. Sondy jsem pro určení jejich specifity nejprve hybridizovala na chromosomální preparáty samců obaleče. Už v tomto kroku jsem přišla na to, že ani jedna z testovaných sond není specifická pro chromosom Z a že hybridizační signály jsou roztroušeny na všech chromosomech karyotypu samců. Při testování sond na chromosomálních preparátech samic jsem však překvapivě zjistila, že všechny sondy ve větší či menší míře zvýrazňují pohlavní chromosom W, a to ve všech stádiích mitózy, meiózy i v interfázních jádrech. To je nejpravděpodobněji způsobeno tím, že se při první DOP-PCR s vyřezanými chromosomy Z přednostně namnožily repetitivní sekvence, které se ve větší míře vyskytují na pohlavním chromosomu W. Kromě těchto repetitivních sekvencí akumulovaných na chromosomu W se však amplifikovaly i repetitivní sekvence rozšířené po celém genomu, o čemž svědčí nejen hybridizační signály na všech chromosomech, ale i skutečnost, že použití samičí sonikované DNA jako kompetitora nemělo zásadní vliv na distribuci signálů, pouze odebralo jejich intenzitu.

Hybridizační signály sondy Z2 na chromosomu W měly dokonce stejný pattern jako u W specifické sondy v práci Fuková a kol (2007). Sonda označila téměř celý chromosom W až na krátké úseky na jeho koncích. Nejsilnější signály však poskytla sonda Z4, kterou jsem získala mikrodisekcí pouze 6 chromosomů. Ta také označila celý pohlavní chromosom W, a to včetně úseků na jeho koncích. Tyto menší odchylky v distribuci hybridizačních signálů jsou nejpravděpodobněji způsobeny určitou mírou náhodnosti amplifikace neznámých sekvencí templátu pomocí DOP-PCR. Sonda Z4 také nejvíce hybridizovala s ostatními chromosomy, i když signály byly vesměs rovnoměrně rozloženy. Výsledky naznačují, že i malé množství chromosomů stačí na výrobu sondy a že větší objem templátu nemusí automaticky vést k lepší sondě. Naopak u sondy Z3 jsem očekávala daleko silnější hybridizační signály, a to kvůli relativně homogenní amplifikaci fragmentů DNA v rozmezí

300 – 400 bp, které vyvolávaly dojem v genomu hojných repetitivních sekvencí. Slabé signály této sondy na všech chromosomech však svědčí spíše o namnožení repetit, které se v genomu obaleče vyskytují vzácněji.

Moje práce je vůbec prvním pokusem zaměřeným na přípravu specifické malovací sondy pro pohlavní chromosom Z motýlů. Výsledky jsou v kontrastu se zkušenostmi cytogenetického významu u obratlovců a zejména u savců, kde sondy vyrobené pomocí laserové mikrodisekce nebo tříděním průtokovým cytometrem spolehlivě a po celé délce značí daný chromosom (např. Kubíčková a kol. 2002). Je to nejpravděpodobněji způsobeno tím, že repetice savců jsou často chromosomálně specifické (Schmidt a Heslop-Harrison 1998). Díky tomu takto připravené sondy spolehlivě značí konkrétní chromosom. Tyto chromosomálně specifické sekvence jsou však neobvyklé u rostlin, kde sondy prakticky nikdy neoznačí pouze jediný chromosom (např. Hobza a kol. 2004). Z řady prací je známo, že některé repetitivní sekvence rostlin jsou rovnoměrně rozptýlené po celém genomu, čemuž odpovídají i roztroušené hybridizační signály sond (Schmidt a Heslop-Harrison 1998). Výskyt takových repetit pak znemožňuje přípravu chromosomálně specifických sond. Z mých výsledků vyplývá, že se pohlavní chromosom Z skládá z právě takových repetitivních sekvencí, které se stejně jako u rostlin vyskytují po celém genomu a z nichž některé jsou ve větší míře akumulovány na chromosomu W.

Jelikož malovací sondy připravené laserovou mikrodisekcí v této práci nebyly specifické pro pohlavní chromosom Z obaleče jablečného, nemělo smysl je dále používat pro Zoo-FISH a hybridizovat je na chromosomální preparáty jiných druhů motýlů. Tento metodický přístup studia evoluce pohlavních chromosomů se tedy ukázal jako neschůdný. Proto jsem se v dalších krocích zaměřila na přípravu knihovny sekvencí DNA chromosomu Z a případné získání sekvencí specifických pro tento chromosom.

5.2. Klonování a analýza sekvencí DNA z chromosomu Z

Ze všech tří vzorků obsahující disektované chromosomy z prvního pokusu se mi podařilo zaklonovat pouze jeden. Získala jsem tak pět pozitivních klonů obsahujících inzert. Po jejich sekvenaci jsem však zjistila, že jsou všechny bakteriálního původu. Je celkem jisté, že během manipulace s DNA došlo ke kontaminaci. Naprostý neúspěch při zaklonování DNA si vysvětluji tím, že DOP-PCR přednostně namnožila takové repetitivní sekvence, které se dají jen velmi těžko zaklonovat. Použití LA polymerázy při první DOP-PCR se také úplně neosvědčilo, protože má tendenci dělat řetězce DNA jen z primerů (S. Kubíčková, ústní sdělení). Proto jsem ji při druhém pokusu s laserovou mikrodisekcí už nepoužila a vrátila se k osvědčené *Taq* polymeráze.

U zaklonování vzorků získaných z druhé mikrodisekce jsem byla daleko úspěšnější. Ze všech 48 pozitivních klonů obsahujících inzert, bylo pouze 9 z nich kontaminováno lidskou DNA. I tento počet je však v porovnání s prací Fukové a kol. (2007) velký (v této práci byly vyřazeny jen 4

z 53 klonů). Avšak ve srovnání se snadným a rychlým nashromážděním relativně velkého vzorku při mikrodisekci sex chromatinu v přípravě W-specifické sondy bylo riziko kontaminace v mé práci nepoměrně větší. Problém spočíval zvláště ve větší pracnosti a časové náročnosti celého experimentu počínaje složitější přípravou preperátů a konče časově náročným vyhledáváním metafázních figur. Riziko se zvyšovalo i obtížnou mikrodisekci jednotlivých chromosomů o velikostech pohybujících se kolem 3 μm .

Z 39 zbývajících inzertů bylo 8 redundantních, to znamená, že částečně nebo úplně totožná sekvence byla obsažena ve dvou a v jednom případě dokonce ve třech klonech, CpZ51-53 (viz Tab. 1). Po odečtení redundantních inzertů bylo tedy získáno celkem 30 různých sekvencí DNA, což je téměř dvakrát víc než v práci Fuková a kol. (2007), kde bylo díky vysoké redundanci několika inzertů získáno jen 17 různých sekvencí. Délka mnou získaných sekvencí se pohybovala v rozmezí od 112 do 631 bp. Z těchto 30 sekvencí vykazovaly dvě (CpZ16 a CpZ38~CpZ47) homologii se známými sekvencemi jiných druhů motýlů. Tyto sekvenční motivy mohou představovat konzervovanější části genomu motýlů. Další dva motivy (CpZ14 a CpZ51-53) vykazovaly částečnou homologii se sekvencemi jiných organismů, kroužkoců a rostlin. U obou organismů je kontaminace málo pravděpodobná, spíše se jedná o náhodnou podobnost sekvencí těchto dvou druhů s motýlí DNA. Ostatní inzerty nevykazovaly žádné výraznější homologie a jejich původ a distribuci v genomu obaleče jablečného včetně specificitu pro jeho pohlavní chromosom Z prokáže až Southern hybridizace, provedená se všemi získanými inzerty.

Výsledky Southern hybridizace, kterou jsem prozatím provedla pouze u pěti inzertů (CpZ6, CpZ11, CpZ13, CpZ24 a CpZ28), korelují s hybridizačními signály připravených malovacích sond. Ve všech případech se jedná o vysoce repetitivní sekvence, vyskytující se jak na pohlavních chromosomech, tak na autosomech. Některé z nich, zejména sekvence CpZ11 a CpZ24, vykazují mnohem větší množství kopií v samičí DNA, což indikuje jejich akumulaci na chromosomu W. Naopak sekvence CpZ13 vykazuje především autosomální výskyt, jak vyplývá z téměř shodného vzoru hybridizačních signálů u DNA obou pohlaví. Avšak inzerty vykazovaly jen ojedinělé hybridizační signály, které byly intenzivnější u samčí DNA než u samčí DNA a které svědčily o lokalizaci na chromosomu Z (viz např. CpZ6 a CpZ28). Zjištěná distribuce kopií těchto motivů tak vysvětluje jak roztroušené hybridizační signály na všech chromosomech na samčích preparátech po FISH, tak i silnou afinitu sond k chromosomu W na samičích preparátech. Na druhé straně relativně malé množství kopií lokalizovaných na chromosomu Z evidentně nepostačuje pro přípravu sondy specifické pro pohlavní chromosom Z.

5.3. Perspektiva laserové mikrodisekce chromosomu Z pro výzkum struktury a evoluce pohlavních chromosomů motýlů

Tato práce ukázala, že je výroba malovací sondy pro pohlavní chromosom Z obaleče jablečného za pomoci laserové mikrodisekce a následné DOP-PCR nereálná. Důvodem je složení tohoto chromosomu spolu s tendencí DOP-PCR přednostně namnožit repetitivní sekvence. S ohledem na možné modifikace protokolu však nemůžeme vyloučit případný úspěch metody u obaleče i u ostatních druhů motýlů. Jednou z alternativních cest je použití Cot-1 kompetitora namísto celogenomové samičí kompetiční DNA, která se při fluorescenční *in situ* hybridizaci moc neosvědčila. Cot-1 DNA se skládá z krátkých, vysoce repetitivních sekvencí, takže by ve výsledku měla značně potlačit hybridizaci všudypřítomných repetitivních sekvencí a zvýraznit tak signály chromosomálně specifických sekvencí. Cot-1 kompetitor však není pro obaleče jablečného komerčně dostupný. Existují ale protokoly, podle kterých se tato frakce DNA dá separovat z celogenomové DNA bez speciálního přístrojového vybavení (Zwick a kol. 1997).

Daleko perspektivnější se zdá využití laserové mikrodisekce chromosomu Z ke konstrukci knihovny sekvencí DNA a jejich následné analýze. Takto získané výsledky mohou, jak ukazuje tato práce, za relativně nízkých nákladů přinést cenné poznatky o složení a molekulární struktuře chromosomu Z. Tímto způsobem by se také daly získat molekulární markery, které mohou být využity při prohledávání BAC knihoven a k izolaci specifických BAC klonů. Například sekvence inzertů CpZ6, CpZ13 a CpZ28, izolované v předložené bakalářské práci, byly již použity jako markery pro prohledání BAC knihovny obaleče jablečného v rámci pracovní stáže kolegyní z naší laboratoře, Magdy Vítkové a Martiny Dalíkové v laboratoři Dr. Lisa G. Neven na pracovišti Yakima Agriculture Research Laboratory (Wapato, Washington state, USA). Celkem bylo pomocí těchto markerů izolováno 30 klonů BAC, které budou v dalších krocích zamapovány na chromosomech metodou BAC-FISH s cílem získat cytogenetické markery pro chromosom Z i ostatní chromosomy.

6. Souhrn

Tato práce je jedním z metodických přístupů, které se zabývají využitelností chromosomu Z pro studium evoluce pohlavních chromosomů a je také vůbec prvním pokusem zaměřeným na přípravu specifické malovací sondy pro pohlavní chromosom Z motýlů.

Sonda byla vytvořena vyříznutím chromosomu Z za pomoci laserové mikrodisekce a následnou amplifikací jeho sekvencí DOP-PCR („degenerated oligonucleotide primed PCR“). Specifitu sondy jsem nejdříve ověřovala fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH) na chromosomální preparáty samců i samic obaleče jablečného, *Cydia pomonella*. Na samčích preparátech byl signál sondy rovnoměrně rozložený po celém genomu, zatímco u samic mi sonda překvapivě označila pohlavní chromosom W a to ve všech stádiích mitózy, meiózy i v interfázních jádrech. Je to nejspíše způsobeno charakterem repetitivních sekvencí, které jsou stejně jako u rostlin rovnoměrně rozptýlené po celém genomu a které jsou ve větší míře akumulovány na chromosomu W. Právě tyto sekvence byly přednostně namnoženy první DOP-PCR. Jelikož nebyla sonda specifická, nemělo smysl ji dále hybridizovat na chromosomální preparáty dalších druhů motýlů. Tento metodický přístup studia evoluce pohlavních chromosomů se tedy ukázal jako neschůdný.

Alternativním využitím disektovaných vzorků byla konstrukce DNA knihovny chromosomu Z obaleče jablečného za pomoci klonování a sekvenace. Pro tuto knihovnu se mi podařilo získat celkem 30 různých sekvencí DNA. Z toho vykazovaly dva sekvenční motivy homologii se sekvencemi motýlů a dva se sekvencemi jiných organismů; v ostatních případech se jednalo o doposud neznámé sekvence. U pěti z těchto motivů jsem ověřila jejich lokalizaci v genomu obaleče jablečného za pomoci Southern hybridizace a dále zjistila, že výsledky korelují s hybridizačními signály připravených malovacích sond. Ve všech případech se jednalo o vysoce repetitivní sekvence, vyskytující se na pohlavních chromosomech (převážně však na chromosomu W) i na autosomech.

Výsledky této práce přinášejí vůbec první informace o složení a molekulární struktuře chromosomu Z u jiného druhu motýla než u známého modelu, bource morušového, a jsou základem pro detailnější analýzu molekulární diference pohlavních chromosomů motýlů.

7. Literatura

Abe H, Mita K, Yasukochi Y, Oshiki T, Shimada T (2005) Retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Cytogenet Genome Res* **110**:144-151

Abe H, Ohbayashi F, Shimada T, Sugasaki T, Kawai S, Mita K, Oshiki T (2000) Molecular structure of a novel gypsy-Ty3-like retrotransposon (Kabuki) and nested retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Mol Gen Genet* **263**: 916-924

Bachtrog D (2006) A dynamic view of sex chromosome evolution. *Curr Opin Genet Dev* **16**: 578-585

Brisset S, Schleiermacher G, Peter M, Mairal A, Oberlin O, Delattre O, Aurias A (2001) CGH analysis of secondary genetic changes in Ewing tumors: correlation with metastatic disease in a series of 43 cases. *Cancer Genet Cytogen* **130**: 57-61

Burke DT, Carle GF, Olson MV (1987) Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* **236**: 806-812

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. *Semin Cell Dev Biol* **18**: 379-388

Fuková I, Nguyen P, Marec F (2005) Codling moth cytogenetics: karyotype, chromosomal location of rDNA, and molecular differentiation of sex chromosomes. *Genome* **48**: 1083–1092

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

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

Graves JAM (2006) Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. *Cell* **124**: 901-914

Graves JAM, Shetty S (2001) Sex from W to Z: evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. *J Exp Zool* **290**: 449–462

Graves JAM, Watson JM (1991) Mammalian sex chromosomes: Evolution of organization and function. *Chromosoma* **101**: 63-68

Hasimoto H (1993) citováno v: Tazima Y (1964) The Genetics of the Silkworm. Academic Press, London, United Kingdom

Hobza R, Lengerova M, Cernohorska H, Rubes J, Vyskot B (2004) FAST-FISH with laser beam microdissected DOP-PCR probe distinguishes the sex chromosomes of *Silene latifolia*. *Chromosome Res* **12**: 245–250

Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G (2005) Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity* **95**: 118-128

Chowdhary BP, Raudsepp T (2001) Chromosome painting in farm, pet and wild animal species. *Methods Cell Sci* **23**: 37-55

Chowdhary BP, Raudsepp T, Frönicke L, Scherthan H (1998) Emerging patterns of comparative genome organization in some mammalian species as revealed by Zoo-FISH. *Genome Res* **8**: 577-589

Christian AT, Garcia HE, Tucker JD (1999) PCR *in situ* followed by microdissection allows whole chromosome painting probes to be made from single microdissected chromosomes. *Mamm Genome* **10**: 628-631

Jauch A, Wienberg J, Stanyon R, Arnold N, Tofanelli S, Ishida T, Cremer T (1992) Reconstruction of genomic rearrangement in great apes and gibbons by chromosome painting. *P Natl Acad Sci USA* **89**: 8611-8615

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, Niino T (1991) Identification of the Z-W bivalent in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genetica* **83**: 121-123

Koike Y, Mita K, Suzuki MG, Maeda S, Abe H, Osoegawa K a kol. (2003) Genomic sequence of a 320-kb segment of the Z chromosome of *Bombyx mori* containing a *kettin* ortholog. *Mol Genet Genomics* **269**: 137-149

Kubičková S, Černohorská H, Musilová P, Rubeš J (2002) The use of laser microdissection for the preparation of chromosome-specific painting probes in farm animals. *Chromosome Res* **10**: 571-577

Lockwood APM (1961) "Ringer" solutions and some notes on the physiological basis of their ionic composition. *Comp Biochem Physiol* **2**:241-289

Lukhtanov VA (2000) Sex chromatin and sex chromosome systems in nonditrysian Lepidoptera (Insecta). *J Zool Syst Evol Res* **38**: 73-79

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

Marec F, Traut W (1994) Sex chromosome pairing and sex chromatin bodies in W-Z translocation strains of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). *Genome* **37**: 426-435

Matsuda Y, Nishida-Umehara C, Tarui H, Kuroiwa A, Yamada K, Isobe T, Ando J a kol. (2005) Highly conserved linkage homology between birds and turtles: Bird and turtle chromosomes are precise counterparts of each other. *Chromosome Res* **13**: 601-615

Mediouni J, Fuková I, Frydrychová R, Dhoubi MH, Marec F (2004) Karyotype, sex chromatin and sex chromosome differentiation in the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae). *Caryologia* **57**: 184-194

Mita K, Kasahara M, Sasaki S, Nagayasu Y, Yamada T a kol. (2004) The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Res* **11**: 27-35

Murray GL (2007) An overview of laser microdissection technologies. *Acta Histochem* **109**: 171-176

Ohbayashi F, Shimada T, Suzuki MG (2002) Sex determination in *Bombyx mori*. *Curr Sci India* **83**: 466-471

Sahara K, Marec F, Eickhoff U, Traut W (2003a) Moth sex chromatin probed by comparative genomic hybridization (CGH). *Genome* **46**: 339-342

Sahara K, Yoshido A, Kawamura N, Ohnuma A, Abe H, a kol. (2003b) 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
- Shizuya H, Birren B, Kim UJ, Mancino V, Slepak T, Tachiiri Y, Simon M (1992) Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *P Natl Acad Sci USA* **89**: 8794-8797
- Scherthan H, Cremer T, Arnason U, Weier HU, Lima-de-Faria A, Frönicke L (1994) Comparative chromosome painting discloses homologous segments in distantly related mammals. *Nat Genet* **6**: 342-347
- Schmidt T a Heslop-Harrison JS (1998) Genomes, genes and junk: the large-scale organization of plant chromosomes. *Trends Plant Sci* **3**: 195-199
- Steinemann S, Steinemann M (2005) Y chromosomes: born to be destroyed. *BioEssays* **27**: 1076–1083
- Suomalainen E (1969) Chromosome evolution in the Lepidoptera. In: Darlington CD, Lewis KR (Eds.) *Chromosomes Today* **2**. Oliver and Boyd, Edinburgh. pp. 132-138
- Suzuki MG, Shimada T, Kobayashi M (1998) Absence of dosage compensation at the transcriptional level of sex-linked gene in a female heterogametic insect, *Bombyx mori*. *Heredity* **81**: 275-283
- Suzuki MG, Shimada T, Kobayashi M (1999) *Bmkettin*, homologue of the *Drosophila kettin* gene, is located on the Z chromosome in *Bombyx mori* and is not dosage compensated. *Heredity* **82**: 170-179
- Špakulová M, Casanova JC (2004) Current knowledge on B chromosomes in natural populations of helminth parasites: a review. *Cytogenet Genome Res* **106**: 222-229
- Thalhammer S, Langer S, Speicher MR, Heckl WM, Geigl JB (2004) Generation of chromosome painting probes from single chromosomes by laser microdissection and linker-adaptor PCR. *Chromosome Res* **12**: 337-343
- Traut W (1976) Pachytene mapping in female silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera). *Chromosoma* **58**: 275-284

Traut W (1999) The evolution of sex chromosomes in insects: Differentiation of sex chromosomes in flies and moths. *Eur J Entomol* **96**: 227-235

Traut W, Eickhoff U, Schorch JC (2001) Identification and analysis of sex chromosomes by comparative genomic hybridization (CGH). *Methods Cell Sci* **23**: 155-163

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. (2007) Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sex Dev* **1**: 332-346

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

Vooijs M, Yu LC, Tkachuk D, Pinkel D, Johnson D, Gray JW (1993) Libraries for each human-chromosome, constructed from sorted-enriched chromosomes by using linker-adpater PCR. *Am J Hum Genet* **52**: 586-597

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.

Wu C, Asakawa S, Shimizu N, Kawasaki S, Yasukochi Y (1999) Construction and characterization of bacterial artificial chromosome libraries from the silkworm, *Bombyx mori*. *Mol Gen Genet* **261**: 698-706

Xia Q, Zhou Z, Lu C, Cheng D, Dai F a kol. (2004) A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science* **306**: 1937-1940

Yasukochi Y, Ashakumary LA, 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 (2005b) The *Bombyx mori* karyotype and the assignment of linkage groups. *Genetics* **170**: 675-685

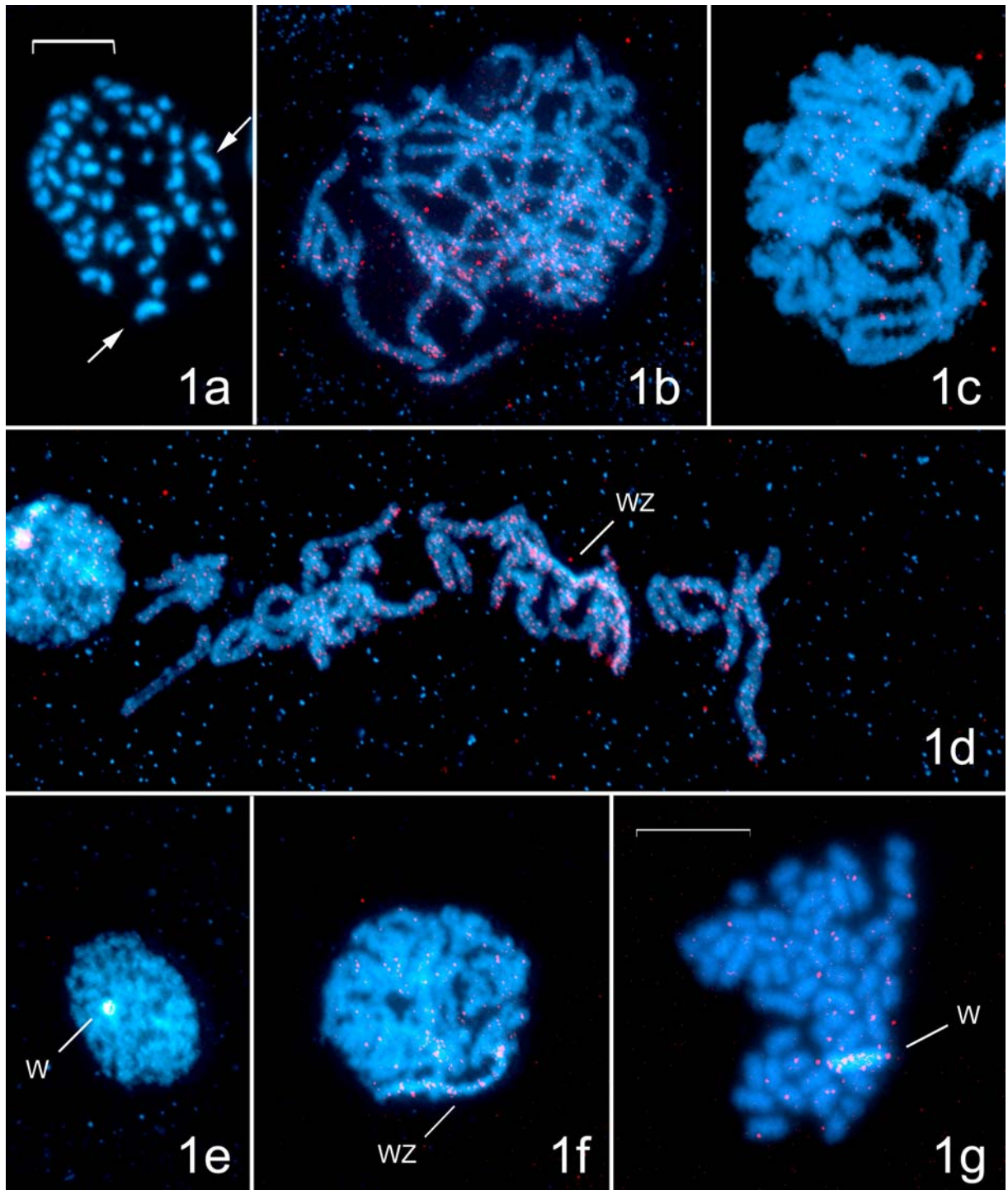
Yoshido A, Marec F, Sahara K (2005a) Resolution of sex chromosome constitution by genomic *in situ* hybridization with (TTAGG)_(n) telomeric probe in some species of Lepidoptera. *Chromosoma* **114**: 193-202

Yoshido A, Yamada Y, Sahara K (2006) The W chromosome detection in several lepidopteran species by genomic *in situ* hybridization (GISH). *J Insect Biotechnol Sericology* **75**: 147-151

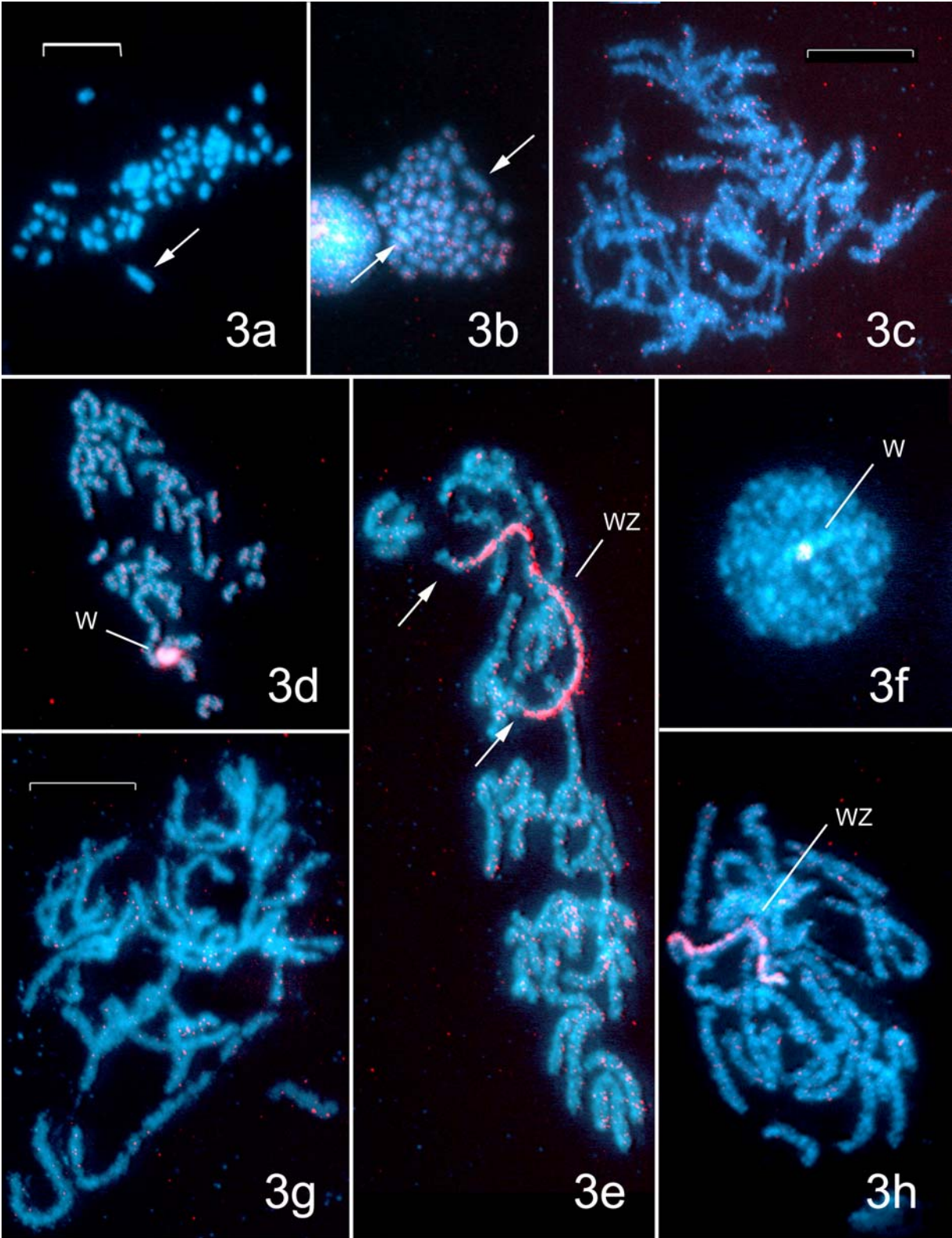
Yoshido A, Yasukochi Y, Marec F, Abe H, Sahara K (2007) FISH analysis of the W chromosome in *Bombyx mandarina* and several other species of lepidoptera by means of *B. mori* W-BAC probes. *J Insect Biotechnol Sericology* **76**: 1-7

Zwick MS, Hanson RE, McKnight TD, Islam-Faridi MN, Stelly DM, Wing RA, Price AH (1997) A rapid procedure for the isolation of C₀t-1 DNA from plants. *Genome* **40**: 138-142

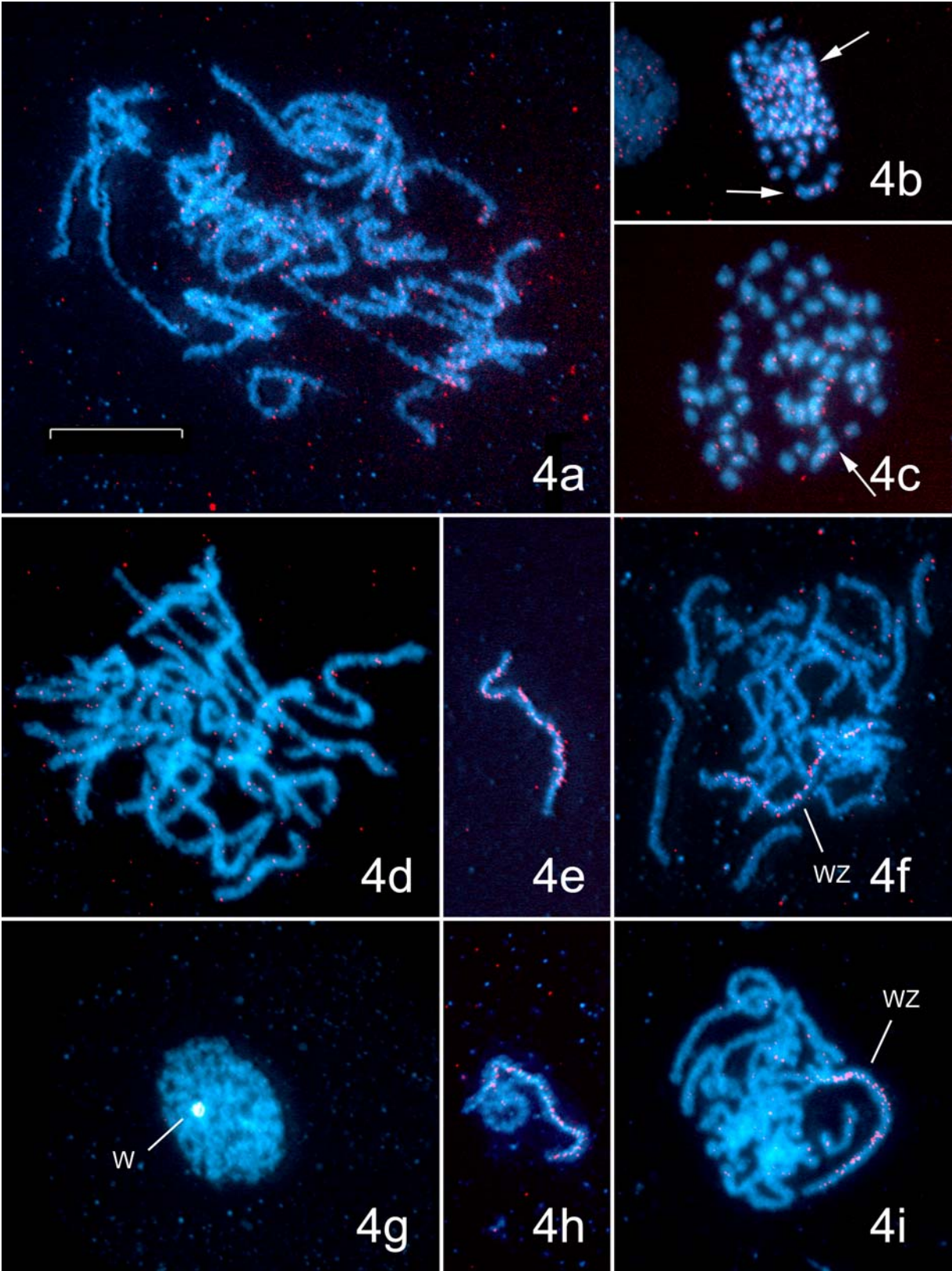
Obr. 1. Rozptýlené mitotické chromosomy a FISH se sondami připravenými ze vzorku chromosomů Z získaných při první mikrodisekci. Chromosomy byly podbarveny DAPI (modrá), sondy byly značeny fluorochromem SpectrumOrange (červená). **a** Rozptýlené mitotické jádro spermatogonie v metafázi (obarvené pouze DAPI); šipky ukazují na chromosomy Z. **b** Samčí pachytenní jádro po FISH bez použití kompetitora. **c** Samčí pachytenní jádro po FISH s použitím neznačené sonikované samičí DNA jako kompetitora. **d** Samičí pachytenní jádro po FISH bez kompetitora se silnějšími hybridizačními signály téměř po celé délce chromosomu W; WZ označuje pohlavní bivalent. **e** Interfázní jádro po FISH bez kompetitora se sondou označeným W-chromatinem; W označuje W-chromatin. **f** Samičí pachytenní jádro po FISH s kompetitorem; WZ označuje pohlavní bivalent. **g** Samičí mitotická metafáze po FISH s kompetitorem se sondou označeným chromosomem W identifikovaným podle DAPI-pozitivního barvení heterochromatinu; W označuje pohlavní chromosom W. Měřítko = 10 μ m; obrázky **a-f** mají stejné měřítko.



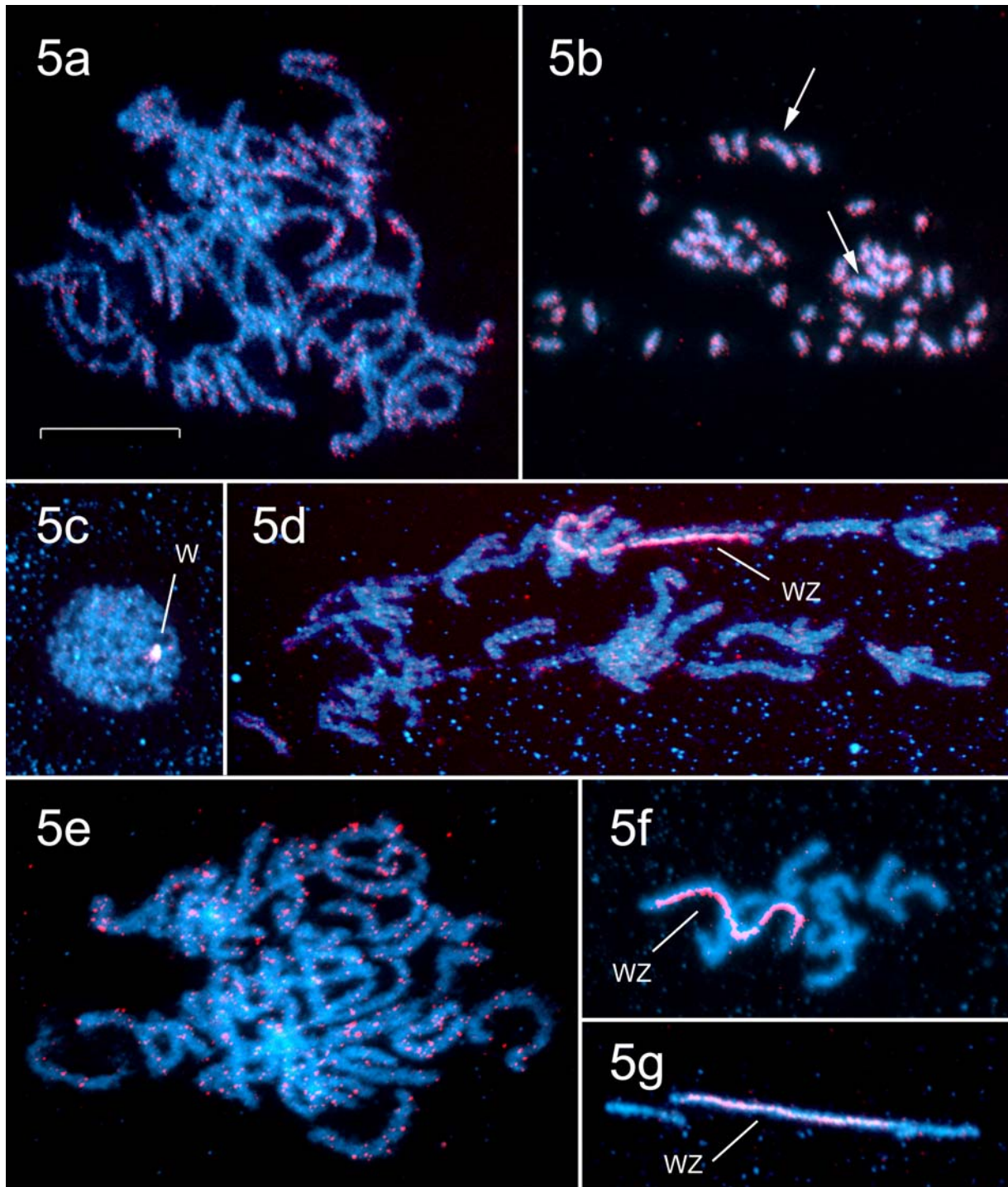
Obr. 3. Rozptýlené mitotické chromosomy a FISH se sondou Z2 přípravou ze vzorku chromosomů Z získaných při druhé mikrodisekci. Chromosomy byly podbarveny DAPI (modrá), sonda byla značena fluorochromem SpectrumOrange (červená). **a** Mitotické metafázní jádro rozptýlené v hypotonickém roztoku 0,075 M KCl s Joy detergentem; šipka ukazuje na izolovaný chromosom Z. **b** Samčí mitotické jádro po FISH bez kompetitora, šipky ukazují na oba chromosomy Z. **c** Samčí pachytenní jádro po FISH bez kompetitora. **d** Samičí mitotická oogoniální metafáze po FISH bez kompetitora; sonda silně hybridizovala s chromosomem W identifikovaným podle DAPI-pozitivního barvení heterochromatinu; W označuje pohlavní chromosom W. **e** Samičí pachytenní jádro po FISH bez kompetitora; WZ označuje pohlavní bivalent; šipky ukazují na nenaznačené konce chromosomu W. **f** Samičí metafázní jádro po FISH bez kompetitora se sondou označeným W-chromatinem; W označuje W-chromatin. **g** Samčí pachytenní jádro po FISH s kompetitorem. **h** Samičí pachytenní jádro po FISH s kompetitorem se sondou značeným chromosomem W; WZ označuje pohlavní bivalent. Obrázky **a**, **b**, **d-f** a **h**: měřítko = 10 μm ; obrázky **c** a **g**: měřítko = 20 μm .



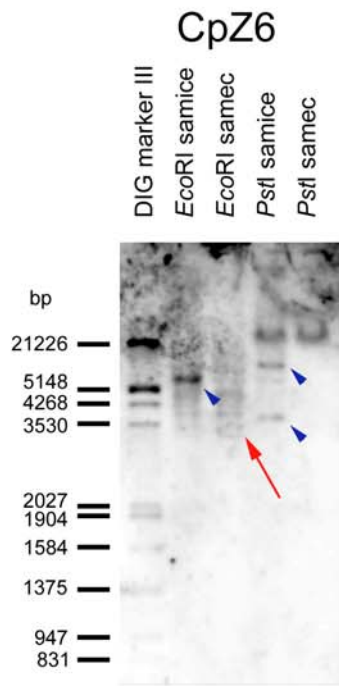
Obr. 4. FISH se sondou Z3. Chromosomy byly podbarveny DAPI (modrá), sonda byla značena fluorochromem SpectrumOrange (červená). **a** Samčí pachytenní jádro po FISH bez kompetitora. **b** Mitotická spermatogoniální metafáze po FISH bez kompetitora; šipky ukazují na chromosomy Z. **c** Mitotická spermatogoniální metafáze po FISH s kompetitorem; šipka ukazuje na chromosom Z. **d** Samčí pachytenní jádro po FISH s kompetitorem. **e** Bivalent WZ z pachytenního oocyty po FISH bez kompetitora; hybridizační signály jsou roztroušeny téměř po celé délce chromosomu W s výjimkou terminálních segmentů. **f** Samičí pachytenní jádro po FISH bez kompetitora; sonda označila chromosom W; WZ označuje pohlavní bivalent. **g** Samičí interfázní jádro po FISH bez kompetitora se sondou označeným W-chromatinem; W označuje W-chromatin. **h** Bivalent WZ z pachytenního oocyty po FISH s kompetitorem; roztroušené hybridizační signály dekorují chromosom W. **i** Samičí pachytenní jádro po FISH s kompetitorem; sonda označila chromosom W; WZ označuje pohlavní bivalent. Měřítko = 20 μm .



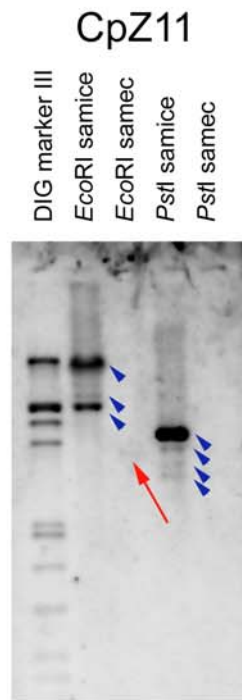
Obr. 5. FISH se sondou Z4. Chromosomy byly podbarveny DAPI (modrá), sonda byla značena fluorochromem SpectrumOrange (červená). **a** Samčí pachytenní jádro po FISH bez kompetitora. **b** Mitotická spermatogoniální metafáze po FISH bez kompetitora; šípky ukazují na chromosomy Z. **c** Samičí interfázní jádro po FISH bez kompetitora se sondou označeným W-chromatinem; W označuje W-chromatin. **d** Samičí pachytenní jádro po FISH bez kompetitora; sonda silně hybridizovala s chromosomem W; WZ označuje pohlavní bivalent. **e** Samčí pachytenní jádro po FISH s kompetitorem. **f** Část samičího pachytenního jádra po FISH s kompetitorem; bivalent WZ lze snadno identifikovat dle hybridizačních signálů po celé délce chromosomu W; WZ označuje pohlavní bivalent. **g** Bivalent WZ pachytenního oocyty po FISH s kompetitorem vykazující silné hybridizační signály na chromosomu W; WZ označuje pohlavní bivalent. Měřítko = 20 μ m.



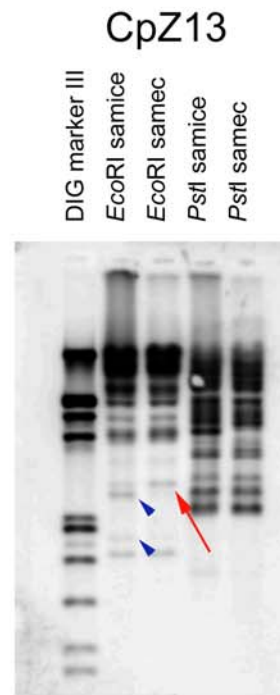
Obr. 6a-e. Southern hybridizace sekvencí CpZ6, CpZ11, CpZ13, CpZ24 a CpZ28 s genomovými DNA samic a samců obaleče jablečného, štěpenými restriktázami *EcoRI* a *PstI*. Modré hroty šipek označují hybridizační signály sekvencí obohacených na chromosomu W; červené šipky ukazují na hybridizační signály sekvencí chromosomu Z. **a** Motiv CpZ6 vykazuje několik výrazných proužků v drahách se samičí genomovou DNA a několik o něco slabších proužků v drahách DNA obou pohlaví. **b** U motivu CpZ11 jsou patrné 3 silné a několik slabších proužků lokalizovaných v drahách se samičí DNA, ale pouze jeden silnější proužek v dráze se samčí DNA. **c** Motiv CpZ13 vykazuje podobný vzor signálů u obou pohlaví; vyskytují se zde i kopie obohacené na chromosomu W a minimálně jedna kopie lokalizovaná na chromosomu Z. **d** U motivu CpZ24 je patrné množství různě intenzivních proužků v drahách se samičí DNA a malé množství slabých proužků, které jsou společné pro samičí i samčí DNA. **e** Sonda motivu CpZ28 hybridizovala výrazně se samičí DNA, ale několik kopií se nachází i na chromosomu Z; vyskytují se zde i slabší proužky společné pro samičí i samčí DNA.



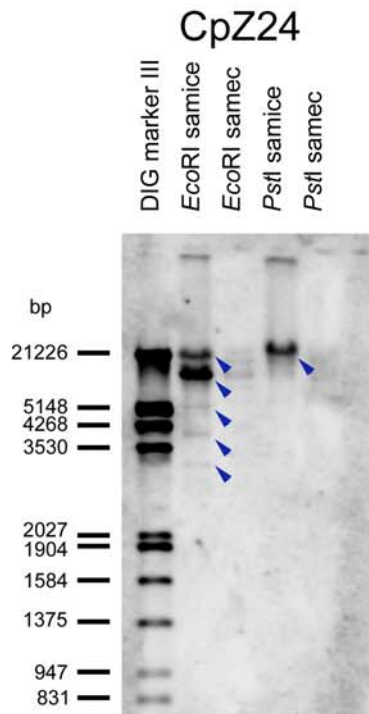
a)



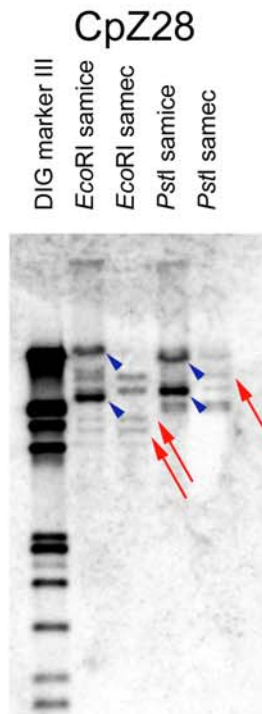
b)



c)



d)



e)