

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**



**Molekulární diferenciace pohlavních chromosomů
předivek rodu *Yponomeuta***

Diplomová práce

Jana Veselá

Školitelka: RNDr. Magda Vítková, Ph.D.

Školitel specialista: prof. RNDr. František Marec, CSc., RNDr. Petr Nguyen

České Budějovice
2012

Veselá, J., 2012: Molekulární diference pohlavních chromosomů předivek rodu *Yponomeuta* [Molecular differentiation of sex chromosomes in ermine moths of genus *Yponomeuta*. Mgr. Thesis, in Czech.] - 35 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Structure of the karyotype of three species in ermine moths (*Yponomeuta*: Yponomeutidae, Lepidoptera) was investigated by means of several cytogenetic methods (DAPI staining, orcein staining, CGH and GISH with telomeric probe) focusing on their sex chromosomes. Additionally, the origin of the Z_2 chromosome in the $WZ_1Z_2/Z_1Z_1Z_2Z_2$ sex chromosome system (specific for this family of butterflies) was tested using southern hybridization.

Finanční podpora:

Tato práce byla financována z grantu GAAV reg. č. IAA600960925 při Entomologickém ústavu BC AV ČR.

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 27.4.2012.

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce, Magdě Vítkové a oběma školitelům specialistům, Frantovi Marecovi a Petru Nguyenovi za vedení, odborné rady a celkový přístup. Dále pak můj velký dík patří celému kolektivu z laborky nejen za skvělou atmosféru, ale taky za to, že mi nikdy neodmítli nabídnout svou pomocnou ruku, obzvláště když jsem se posledních šest měsíců snažila vyhýbat všem jedům. Moje díky bych samozřejmě chtěla také věnovat rodině, hlavně Petrovi, a to za jejich bezbřehou trpělivost a podporu. Všem Vám děkuju!

1. Úvod	1
1.1. Vznik a evoluce pohlavních chromosomů.....	1
1.2. Systémy pohlavních chromosomů.....	2
1.3. Cytogenetika a pohlavní chromosomy motýlů.....	2
1.3.1. Chromosom Z.....	3
1.3.2. Chromosom W.....	4
1.4. Pohlavní chromosomy u předivek rodu <i>Yponomeuta</i>	5
2. Cíle	7
3. Materiál a metody	8
3.1. Použité organismy.....	8
3.2. Výroba chromosomálních preparátů.....	8
3.3. Barvení preparátů lakto-aceto-orceinem a DAPI.....	9
3.3.1. Barvení lakto-aceto-orceinem.....	9
3.3.2. Barvení DAPI.....	9
3.4. Izolace nukleových kyselin.....	10
3.4.1. Izolace genomové DNA.....	10
3.4.2. Izolace RNA.....	10
3.5. Příprava a značení sond pro <i>in situ</i> hybridizace.....	11
3.6. <i>In situ</i> hybridizace.....	11
3.6.1. Příprava kompetitorové DNA.....	11
3.6.2. Komparativní genomová hybridizace a genomová <i>in situ</i> hybridizace.....	11
3.7. Izolace genů.....	12
3.8. Klonování a sekvenování.....	14
3.9. Příprava sond pro Southernovu hybridizaci.....	14
3.10. Southernova hybridizace.....	16
4. Výsledky	18
4.1. Chromosomy předivek.....	18
4.2. Izolace genů.....	19
4.3. Southernova hybridizace.....	19
5. Diskuze	21
5.1. Počty a charakter chromosomů vybraných druhů předivek.....	21
5.2. Pohlavní chromosomy u předivek.....	21
5.3. Ověření vzniku chromosomu Z_2 Southernovou hybridizací.....	23
6. Závěr	25
7. Literatura	26
8. Přílohy	31

1. Úvod

1.1. Vznik a evoluce pohlavních chromosomů

Pohlavní chromosomy jako prostředek genetické determinace pohlaví jsou rozšířené u většiny živočichů, kde vznikly mnohokrát zcela nezávisle. Ve většině případů vznikly pohlavní chromosomy s největší pravděpodobností z páru homologních autosomů, u nichž jeden z páru získal gen determinující pohlaví („sex-determining“ gene, SDG) (Ohno, 1967; Skaletsky a kol., 2003). Protože tento gen svým výskytem podmiňoval vývoj jednoho určitého pohlaví, bylo výhodné přesunutí a nashromáždění dalších pro dané pohlaví specifických genů do jeho blízkosti. Pravděpodobně kvůli takovémuto pohlavně antagonistickým genům, které zvýhodňují jedno pohlaví na úkor druhého, došlo ke ztrátě rekombinace v těchto lokusech a pár pohlavních chromosomů se od sebe začal postupně diferencovat.

Zastavení rekombinace mezi pohlavními chromosomy má za následek degeneraci heteromorfních chromosomů (chromosomu Y v případě systému XY/XX a chromosomu W v systému ZW/ZZ) (Charlesworth a kol., 2005; Bachtrog, 2006) projevující se ztrátou funkčních genů a akumulací repetitivních sekvencí, zejména transpozonů (Steinemann a Steinemann 2005), které vytvářejí bloky transkripčně inaktivního heterochromatinu. Tato degenerace je přisuzována několika mechanismům, mezi něž spadá např. jev zvaný „Müllerova rohatka“ („Mullers ratchet“), neboli nenávratnost škodlivé mutace z důvodu málo pravděpodobného výskytu zpětné mutace (Charlesworth a Charlesworth 1997), a pak genetický draft („hitchhiking“), což je jev popisující fixaci poškozeného či mutovaného genu, který se vyskytuje ve vazbě s v populaci preferovaným a rychle se šířícím genem (Bachtrog, 2006).

Na to, že degenerace pohlavních chromosomů Y/W je dynamický proces a diferenciace je poměrně rychlá, lze usuzovat na základě výsledků srovnání chromosomu Y šimpanze a člověka (Hughes a kol., 2010), kde lze pozorovat značnou ztrátu genů kódujících proteiny a expanzi palindromických sekvencí. Dalším příkladem rychlého vývoje těchto chromosomů je práce popisující rychlé ztráty sekvenční homologie chromosomu W u blízké příbuzných druhů motýlů z čeledi zavíječovitých (Vítková a kol., 2007).

Na chromosomu Y (nebo W) se nachází vedle řady satelitních sekvencí a pseudogenů též různé množství funkčních genů, jejichž degenerace není žádoucí. Nedávné studie zabývající se sekvenací lidského chromosomu Y odhalily několik amplikonických oblastí

obsahujících palindromicky uspořádané geny v mnoha kopiích (Skaletsky a kol., 2003), které se exprimují ve varlatech a jejichž značná homogenita je udržována genovou konverzí (Rozen a kol., 2003). Ta zde pravděpodobně hraje velice významnou roli v tom, že do určité míry nahrazuje meiotickou rekombinaci a slouží tak jako mechanismus zabraňující degeneraci.

1.2. Systémy pohlavních chromosomů

U živočichů, jejichž pohlaví je určeno geneticky, rozeznáváme dva hlavní systémy pohlavních chromosomů. Prvním z nich je systém XY/XX, kde je heterogametické pohlaví (XY) reprezentováno samci, a samice jsou homogametické (XX). Toto uspořádání pohlavních chromosomů se vyskytuje u všech savců včetně člověka, ale pozorováno bylo u většiny živočichů a dokonce i u některých rostlin. Druhým typem uspořádání pohlavních chromosomů je systém ZW/ZZ, kde jsou naopak samice heterogametické (ZW) a samci homogametičtí (ZZ). Tento typ je běžný u ptáků, hadů a u dvou sesterských řádů hmyzu – chrostíků a motýlů (Traut a Marec, 1996). Některé skupiny živočichů však mohou využívat oba dva systémy pohlavních chromosomů, jako je tomu například u některých ryb (Mank a kol., 2006), obojživelníků (Hillis a Green, 1990) a želv (Ezaz a kol., 2006). Byly dokonce objeveny druhy, kde se systémy heterogametických samců a heterogametických samic střídají v jednotlivých populacích, například u skokana *Rana rugosa* (Ogata a kol., 2007).

Možnou odchylkou od standardního uspořádání pohlavních chromosomů jsou vedle chybějícího heteromorfního chromosomu u heterogametického pohlaví (X0/XX; Z0/ZZ) také mnohočetné pohlavní chromosomy, tzv. neo-pohlavní chromosomy. Ty vznikají fúzí či translokací autosomů a byly objeveny např. u ježury a ptakopyska, kde během meiózy vytvářejí řetězky s organizací $X_1X_2X_3X_4X_5/Y_1Y_2Y_3Y_4Y_5$ (samec; Gruetzner a kol., 2006).

1.3. Cytogenetika a pohlavní chromosomy motýlů

Motýli společně se sesterskou skupinou, chrostíky, u svých chromosomů postrádají primární konstrikcii, tedy centromeru (Wolf a kol., 1997), a jsou proto považovány za chromosomy holokinetického typu. Kinetochor pokrývá převážnou část povrchu chromosomů (Suomalainen, 1969a; Murakami a Imai, 1974) a zajišťuje tím značnou stabilitu a odolnost genomu, neboť možné chromosomální zlomy, vzniklé například ionizačním zářením, nezpůsobí ztrátu chromosomálních fragmentů, ke které v takovém případě dochází u organismů s monocentrickými chromosomy (Marec a kol. 2001).

Absence centromery, nepoužitelnost klasických proužkovacích technik, ale také poměrně velký počet a uniformní vzhled malých mitotických chromosomů byl dlouhou dobu důvodem, proč byli motýli i přes svou druhovou bohatost méně využíváni k cytogenetickým studiím než jiné organismy a veškeré práce byly omezeny převážně na počítání chromosomů bez možnosti identifikovat jednotlivé chromosomální páry. Typický a pravděpodobně i původní karyotyp motýlů odpovídá počtu chromosomů $n = 31$, není ovšem výjimkou daleko nižší či vyšší počet chromosomů, jako například $n = 5$ u *Hypothyris thea* (Nymphalidae; Brown a kol., 2004) nebo $n = 223$ u *Polyommatus atlantica* (Lycaenidae; de Lesse, 1970).

Jak už bylo zmíněno v předchozí kapitole, motýli a chrostíci patří mezi organismy se samičím heterogametickým určením pohlaví, tedy se systémem pohlavních chromosomů Z0 nebo ZW u samic a ZZ u samců. Ačkoliv se u motýlů nejčastěji vyskytuje konstituce ZW/ZZ, chromosom W nebyl nalezen u chrostíků (Klingstedt, 1931; Marec a Novák, 1998; Lukhtanov, 2000) ani u primitivních skupin motýlů (Traut a Marec, 1997). Na základě toho se soudí, že méně častý stav Z0/ZZ je ancestrální a chromosom W vznikl až u společného předka linií Ditrysia a Tischerioidea (Traut a Marec, 1996).

1.3.1. Chromosom Z

Chromosom Z motýlů se svou kompozicí nijak výrazně neliší od ostatních autozomů (Traut a kol., 2008). Obsahuje řadu transkripčně aktivních genů, nicméně celkově není příliš dobře prostudován. Hlavní zdroj informací o tomto chromosomu poskytují především novější práce zabývající se sekvenací genomu modelového druhu bource morušového (*Bombyx mori*, Bombycidae), ale genetická mapa chromosomu Z byla vytvořena i u několika dalších druhů motýlů (*Ostrinia nubilalis*, Dopman a kol., 2004; *Heliconius melpomene*, Jiggins a kol., 2005; *Heliconius erato*, Tobler a kol., 2005).

V práci Koike a kol. 2003 byl v okolí genu *Bmkettin* osekvenován 320 kbp dlouhý úsek chromosomu Z bource morušového. 13 nově objevených protein kódujících genů společně s genem *Bmkettin* bylo posléze porovnáno s geny octomilky *Drosophila melanogaster* a háďátka *Caenorhabditis elegans* za účelem nalezení konzervovaného pořadí těchto genů (tzv. syntenie). Výsledky však syntenii nepotvrdily. Jedinou výjimku tvořila skupina genů na chromosomu Z bource (*Bmprojectin*, *Bmkettin*, *Bmtitin1*, *Bmtitin2*, a *Bmmiple*), jejichž pořadí bylo zachováno na chromosomu 3 u octomilky. Kromě zmíněných genů byla v osekvenované oblasti nalezena také řada nekódujících sekvencí jako jsou non-LTR retrotransposony, retroposony, DNA-transposony a další nedefinované repetice.

Ačkoli syntenie genů mezi bourcem, octomilkou a hád'átkem nebyla prokázána, pořadí genů na autosomech i chromosomu Z je v rámci řádu motýlů podle dosavadních studií konzervované, a to nejen u blízce příbuzných linií (*Bombyx mori*, Bombycidae a *Manduca sexta*, Sphingidae), ale i u evolučně vzdálenějších druhů (*B. mori* a *Heliconius melpomene*, Nymphalidae) (Yasukochi a kol., 2006; Pringle a kol., 2007; Sahara a kol., 2007).

1.3.2. Chromosom W

Chromosom W se svým celkovým charakterem velice liší od ostatních motýlích chromosomů, svého partnera pohlavního chromosomu Z nevyjímaje. Hlavní strukturální složkou chromosomu W jsou transposibilní elementy jako LTR („long terminal repeat“) retrotransposony, non-LTR retrotransposony, DNA transposony a jejich deriváty (Abe a kol., 2005). Kromě velkého množství těchto nekódujících sekvencí, jejichž výskyt je zde mnohem rozsáhlejší než na jiných místech v genomu (Traut a kol., 1999; Sahara a kol., 2003; Mediouni a kol., 2004; Fuková a kol., 2007; Vítková a kol., 2007), je několik genů, u kterých se předpokládá vazba na chromosom W. Mezi takovéto kandidátní geny patří například gen ovlivňující velikost vajíček, *Esd* (dříve *Ge*, „giant eggs“) (Kawamura a kol., 1988, 1990). Dalšími geny s možným výskytem na chromosomu W jsou geny podílející se na determinaci pohlaví. Jedním z nich je domnělý gen *Fem*, neboli feminizační faktor, který by mohl být příčinou vývoje samičího pohlaví v závislosti na přítomnosti chromosomu W, jak bylo popsáno v práci Tazima 1965. Zde měl výskyt alespoň jednoho chromosomu W u polyploidních linií bource morušového za následek vývoj samice, bez ohledu na počet chromosomů Z.

Vzhledem ke svému sekvenčnímu obsahu není překvapivé, že ve většině případů je chromosom W tvořen převážně heterochromatinem. To je patrné jak u pachytenních chromosomů po klasickém barvení orceinem či Giemsou (Traut a Marec, 1997), tak v samičích interfázních buňkách, kde chromosom W vytváří dobře barvitelné heterochromatinové tělísko zvané sex chromatin nebo také W chromatin. Na rozdíl od sex chromatinu u savců (Barrova tělíška), který je tvořen v buňkách samic inaktivovaným chromosomem X, sex chromatin u motýlů není výsledkem kompenzace genové dávky. To, že sex chromatin motýlů je opravdu tvořen chromosomem W, bylo dokázáno v práci Fuková a kol. 2007, kde byla ze sex chromatinu úspěšně připravena specifická malovací sonda pro chromosom W.

Snadná identifikace sex chromatinu ve tkáních samic umožnila ověření přítomnosti či nepřítomnosti chromosomu W u řady druhů motýlů (Traut a Marec, 1996), což přispělo k potvrzení hypotézy, předpokládající vznik chromosomu W až u předka skupin *Ditrysia* a *Tischerioidea*. Proces, jakým způsobem chromosom W vznikl, popisují dvě hlavní hypotézy. První z nich považuje za mechanismus vzniku chromosomu W fúzi chromosomu Z s autosomem. Z homologního partnera fúzního autosomu se pak stává tzv. neo-W chromosom (Traut a Marec, 1996). Podle druhé hypotézy má chromosom W svůj původ v chromosomu B (Lukhtanov, 2000).

1.4. Pohlavní chromosomy u předivek rodu *Yponomeuta*

Předivky rodu *Yponomeuta* jsou řazeny mezi motýly z linie *Ditrysia* a jejich blízkými příbuznými jsou například zástupci z čeledi *Plutellidae* (Kristensen a Skalski, 1999). Dosavadní studie zabývající se předivkami byly zaměřeny především na evoluci vztahu hmyz – rostlina (Menken, 1982) nebo alozymovou variabilitu v závislosti na utváření vazby k určité hostitelské rostlině (Menken, 1982; Raijmann, 1996; Raijmann a Menken, 1992).

V roce 1988 byla publikována práce skupiny Nilsson a kol., kde autoři zkoumali meiotické dělení u šesti druhů předivek. Na preparátech buněk z gonád dospělých samic a larev samců obarvených Giemsou byla pozorována jádra, která u samců obsahovala haploidní počet $n = 30 AA$ (autosomů) + ZZ a u samic $n = 29 AA +$ trivalent AA^WZ (jinak také: WZ_1Z_2). Autoři na základě těchto výsledků předložili hypotézu, že chromosom W v tomto případě sfúzoval s autosomem a dal vznik „novému“ chromosomu W (A^W), který se páruje s chromosomem Z a zároveň s homologem sfúzovaného autosomu. Samice by pak produkovaly dva typy vajíček, jeden nesoucí translokovaný chromosom A^W a druhý s chromosomem Z a zbylým autosomem. Po oplození tak vzniknou samice s konstitucí $29AA + AA^WZ$ a samci s $30AA + ZZ$, stejně jako bylo pozorováno.

Ke stejné konstituci pohlavních chromosomů však mohlo dojít i rozpadem původního Z na Z_1 a Z_2 , čímž u samic vznikl trivalent WZ_1Z_2 bez účasti autosomů. První teorie by mohla být podpořena jednak zjištěním, že část chromosomu W má euchromatinovou strukturu (pozůstatek euchromatinového charakteru autosomů), či nálezem genu, který se translokoval společně s tímto autosomem a stal se tak u skupiny předivek vázaný na pohlaví, zatímco u druhů s běžnou konstitucí pohlavních chromosomů (ZW/ZZ) se stále nachází na autosomu. Takovým genem, jenž odpovídá této hypotéze, je například gen pro β -karboxylesterázu, který je u bource morušového lokalizován na chromosomu 8 (*Bmbe1*) a 19 (*Bmbe2*) (Yu a kol., 2009), zatímco u předivek je jeho alozymová forma pohlavně vázaná

(Rajmann a kol., 1997). Možnými kandidáty na translokovaný chromosom jsou tedy autosomy 8 a 19.

2. Cíle

Cílem mé práce byla karyotypová analýza vybraných druhů předivek (předivka zhoubná – *Yponomeuta evonymellus*, p. ovocná – *Y. padellus* a p. brslenová – *Y. cagnagellus*), která zahrnovala ověření počtu chromosomů na mitotických preparátech z křídelních disků, identifikaci pohlavních chromosomů na preparátech pachytenních oocytů barvených orceinem a přibližné stanovení molekulární diference pohlavních chromosomů metodou komparativní genomové hybridizace (CGH). Dalším úkolem bylo ověření hypotézy vzniku systému pohlavních chromosomů WZ_1Z_2 fúzí chromosomu W s autosomem pomocí následujících metodických postupů: analýza konstituce pohlavních chromosomů pomocí GISH (genomová *in situ* hybridizace) kombinované s telo-FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace s telomerickou sondou), izolace fragmentů několika ortologních genů lokalizovaných na vybraných autosomech bource morušového z cDNA předivek, jejich klonování a ověření sekvenováním a předběžná identifikace vazby těchto ortologů na chromosom Z předivek Southernovou hybridizací s genomovou DNA samců a samic.

3. Materiál a metody

3.1. Použité organismy

Zkoumanými organismy v této práci byly vybrané druhy motýlů nadčeledi Yponomeutoidea, a sice *Yponomeuta evonymellus* (Linnaeus, 1758, předivka zhoubná), *Y. padellus* (Linnaeus, 1758, p. ovocná) a *Y. cagnagellus* (Hübner, 1813, p. brslenová). Tyto tři druhy předivek byly získány z přírodních populací Nizozemska, kde vzorky nasbíral a poskytl Peter Roessingh z University of Amsterdam (Nizozemsko).

3.2. Výroba chromosomálních preparátů

Pro přípravu chromosomálních preparátů byly použity křídelní disky z larev samců a samic (mitotické chromosomy) a ovária z larev samic (pachytenní chromosomy). Disekce byla prováděna tzv. „spreading“ technikou (Traut, 1976) s drobnými úpravami. Housenky byly vypitvány ve fyziologickém roztoku pro *Ephestia kuehniella* (0,9% NaCl, 0,042% KCl, 0,025% CaCl₂, 0,02% NaHCO₃) (Glaser, 1917; citováno v Lockwood, 1961) a získaný materiál byl posléze přenesen do hypotonického roztoku na cca 10 minut. V případě preparátů z křídelních disků byl jako hypotonický roztok použit 0,075% roztok KCl, u preparátů z ovarii byl použit hypotonický roztok pro elektronovou mikroskopii (0,1M KCl : 0,1M NaCl v poměru 5:1; je jemnější a zachovává strukturu heterochromatinu chromosomu W u většiny motýlů [Marec a kol., 1993]). Alternativně byla místo hypotonického roztoku použita ledová destička (pro preparáty určené k barvení orceinem, z důvodu zachování struktury chromomer), na kterou byl preparát položen na pár vteřin před použitím histologické plotýnky. Materiál byl dále fixován 15 minut v čerstvě připravené fixáži Carnoy (etanol: chloroform: kyselina octová v poměru 6:3:1), přesunut do kapky 60% kyseliny octové na podložním sklíčku a rozmacerován pomocí wolframových jehel. Před použitím bylo podložní sklíčko smočeno v kyselém etanolu (1% HCl, 96% etanol). Sklíčko s materiálem bylo poté umístěno na histologickou plotýnku vyhřátou na 45 °C, kde se kapka, která byla po sklíčku posouvána pomocí jehly, pozvolna vypařila. Takto připravené preparáty byly posléze odvodněny v etanolové řadě (70% - 80% - 100% etanol, v každém roztoku 30 s) a uskladněny pro další použití při -20 °C nebo při -80 °C.

3.3. Barvení preparátů lakto-aceto-orceinem a DAPI

3.3.1. Barvení lakto-aceto-orceinem

Pro obarvení lakto-aceto-orceinem byly použity preparáty pachytenních chromosomů z ovárií, u kterých byla během výroby hypotonizace nahrazena umístěním preparátu na ledovou destičku (viz. kapitola 3.2). Před samotným barvením byly chromosomální preparáty vyjmuty z $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, případně $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, a odvodněny v etanolové řadě (pokud byla sklíčka vyjmuta z $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, byl jako první roztok etanolové řady použit předchlazený 70% etanol po dobu 2 minut, zbylé dva roztoky etanolu 80% a 100% po dobu 1 minuty). Na jednotlivá sklíčka byla poté nanesena kapka 1,5% lakto-aceto-orceinu (cca 25 μl) a preparáty se ponechaly po dobu 5 minut barvit. Následovalo položení krycího sklíčka na obarvenou oblast preparátu a odsátí přebytečného barviva pomocí filtračního papíru. Na závěr bylo krycí sklo po okrajích utěsněno a zafixováno lakem na nehty. Hotové preparáty byly po oschnutí prohlíženy pod světelným mikroskopem Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Jena, SRN) a foceny pomocí chlazené CCD kamery a programu AnalySIS Software. Konečné úpravy fotografií byly provedeny pomocí programu Adobe Photoshop.

3.3.2. Barvení DAPI

Barvení chromosomů pomocí DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) bylo prováděno u preparátů po předchozí hybridizaci podle protokolu Traut a kol., 1999 s mírnými odchylkami a sestávalo z těchto kroků: promytí preparátů 5 minut v roztoku 1% Triton X-100 v PBS pufru při pokojové teplotě (dále jen PT) (Triton – Sigma-Aldrich; PBS - 0,15M NaCl, 0,05M NaH_2PO_4 , pH 7,4), barvení preparátů 15 minut při PT v 1% Triton X-100 v 1x PBS pufru s DAPI (výsledná koncentrace DAPI – 0,5 $\mu\text{g/ml}$), promytí 3 minuty v 1% PhotoFlo v 1x PBS pufru při PT (PhotoFlo - Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA) a promytí 1 minutu při PT v 1% PhotoFlo ve sterilní miliQ vodě. Nakonec bylo každé sklo zakápnuto 20 μl antifade DABCO (Sigma-Aldrich) a zakryto krycím sklem, jehož okraje byly utěsněny lakem na nehty. Preparáty mitotických chromosomů určených pro karyotypovou analýzu byly barveny přímo nanesením kapky (25 μl) DAPI v DABCO (koncentrace DAPI – 0,5 $\mu\text{g/ml}$) a hned poté byly zakryty krycím sklíčkem a utěsněny lakem na nehty. Obarvené preparáty byly prohlíženy pod fluorescenčním mikroskopem Zeiss Axioplan 2 s příslušným filtrem a dokumentovány chlazenou CCD kamerou v programu AnalySIS Software. Fotografie byly posléze opět upraveny pomocí programu Adobe Photoshop.

3.4. Izolace nukleových kyselin

3.4.1. Izolace genomové DNA

Genomová DNA (gDNA) ze samců a samic předivek byla izolována tradiční fenol-chloroformovou metodou extrakce nukleových kyselin (Blin a Stafford, 1976), a to odděleně ze samic a samců v mikrozkušavkách s extrakčním pufrem (100mM NaCl; 10mM Tris-HCl o pH 8; 50mM EDTA o pH 8; 100µg/ml proteinázy K [přidaná těsně před extrakcí]; 0,5% sarkosyl). Postup byl následující: v každé mikrozkušavce s 500 µl extrakčního pufru byla tloučkem rozmělněna tkáň ze dvou housenek zbavených střev nebo ze dvou až tří dospělců (u samic dospělců byly předem odstraněny zadečky), čímž vznikl homogenát, který byl inkubován dvě hodiny při 37 °C. Po dvou hodinách se ke vzorku přidalo 0,5 µl RNázy A a směs se nechala inkubovat další hodinu při 37 °C. Následně bylo do mikrozkušavky přidáno 500 µl fenolu, směs byla zvortexována a centrifugována po dobu 15 minut při 5000 g. Oddělená vrchní fáze byla následně přenesena do čisté mikrozkušavky, doplněna 400 µl směsí fenol-chloroform-isoamylalkohol (25:24:1), zvortexována a centrifugována 15 minut při 5000 g. Vrchní fáze byla po centrifugaci opět přepipetována do čisté mikrozkušavky, do které bylo následně přidáno 400 µl směsí chloroform-isoamylalkohol (24:1) a stejně jako v předchozích krocích se vše zvortexovalo a zcentrifugovalo 15 minut při 5000 g. Nakonec byla vzniklá vrchní fáze v čisté mikrozkušavce precipitována přidáním 1/10 objemu 3M octanu sodného a 7/10 objemu isopropanolu, zcentrifugována 10 minut na maximální rychlost a vzniklý pelet byl před samotným rozpuštěním ve 30 µl sterilní miliQ vody ještě dvakrát přečištěn centrifugací 5 minut s 200 µl 70% etanolu. Výsledná koncentrace jednotlivých vzorků byla změřena na fluorimetru DyNA Quant 200 (Hoefer, Jolliston, Massachusetts) a kvalita DNA byla ověřena pomocí restrikčního štěpení.

3.4.2. Izolace RNA

Jako materiál pro izolaci RNA byly použity hlavičky housenek předivky zhoubné, které byly vypreparovány ve fyziologickém roztoku a uskladněny do samotné izolace v roztoku RNAlater (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) při -20 °C. Izolace byla provedena pomocí RNA blue (Top-Bio, Praha, ČR) podle návodu výrobce. Vyizolovaná RNA byla posléze inkubována 15 minut při 37 °C s DNázou I (Top-Bio) (na 10 µl reakce: 2 U DNázy I, pufr, 10 U SUPERase-In [Applied Biosystems]), přečištěna fenol-chloroformovou extrakcí (fenol pro purifikaci RNA, pH 4,7; Sigma Aldrich) a rozpuštěna ve

20 µl sterilní DEPC vody (miliQ voda ošetřená diethyl pyrokarbonátem, který ničí nukleázy).

3.5. Příprava a značení sond pro *in situ* hybridizace

Samičí a samčí sondy pro následné celogenomové hybridizace byly zhotoveny z vyizolované gDNA, která byla ještě před samotným značením sond namnožena pomocí soupravy GenomiPhi HY DNA Amplification Kit (GE Healthcare, Milwaukee, WI, USA) dle návodu výrobce. Značení bylo provedeno metodou nick-translace za pomoci soupravy Nick Translation Kit (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA) a probíhalo 12 hodin při 15 °C. Samčí sonda byla naznačena červeným fluorochromem Cy3-dUTP (GE Healthcare) a samičí sonda zeleným fluorochromem fluorescein-12-dUTP (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Další sondou používanou v této práci byla hmyzí telomerická sonda (TTAGG)_n, která byla zhotovena formou beztemplátové polymerázové řetězcové reakce (PCR) (Sahara a kol., 1999) o objemu 100 µl sestávající z těchto složek: 0,5 U Takara Ex *Taq* Hot Start polymerázy (Takara, Otsu, Japonsko); Ex *Taq* pufr; primery TELO1 a TELO2 o koncentracích 0,5 µM a 0,2mM dNTP mix. Teplotní profil reakce byl: počáteční denaturace 90 s při 94 °C a 30 cyklů obsahujících denaturaci 45 s při 94 °C, nasedání primerů 30 s při 52 °C a syntézu 60 s při 72 °C. Závěrečná syntéza při 72 °C trvala 10 minut. Takto vzniklá sonda byla vysrážena etanolem, rozpuštěna ve sterilní miliQ vodě a poté značena nick-translací (Nick Translation Kit [Abbott Molecular Inc.]) 1 hodinu při 15 °C.

3.6. *In situ* hybridizace

3.6.1. Příprava kompetitorové DNA

Jako kompetitor byla použita gDNA ze samců, která musela být kvůli nedostatku vstupního materiálu namnožena kitem GenomiPhi HY DNA Amplification Kit (GE Healthcare). Výsledný produkt byl fragmentován sonikátorem Bandelin Sonopuls HD 2070 (Bandelin electronic, Berlín, SRN) podle postupu v práci Vítková a kol. 2007.

3.6.2. Komparativní genomová hybridizace (CGH) a genomová *in situ* hybridizace (GISH)

Obě varianty *in situ* hybridizací (CGH, GISH), testující celogenomové fluorescenčně značené sondy, byly prováděny s mírnými obměnami podle protokolu pro CGH (Traut a kol., 1999). Chromosomální preparáty byly nejprve vyjmuty z -20 °C nebo z -80 °C a

odvodněny etanolovou řadou. Poté byla všechna sklíčka denaturována 3,5 minuty při 68 °C se 100 µl 70% deionizovaného formamidu (Sigma-Aldrich) v SSC pufru. Hybridizační směs byla připravena smícháním kompetitorové DNA (4 µg), sonikované DNA z lososích spermií (2,5 µl) (Sigma-Aldrich) a značených sond (pro GISH: 400µg samičí sondy a 250 µg telomerické sondy; pro CGH: 400 µg samčí a 400 µg samičí sondy). Poté byla směs precipitována 3M octanem sodným (1/10 objemu hybridizační směsi) a 100% předchlazeným etanolem (2,5 násobek objemu) 30 minut při -80 °C. Dalším krokem byla centrifugace 20 minut při 15000 rpm, slítí supernatantu a opětovná centrifugace s 200 µl 70% předchlazeného etanolu 10 minut při 15000 rpm. Po pečlivém odstranění supernatantu byl pelet zakápnut 5 µl 100% deionizovaného formamidu (formamid byl předeřhřátý na 37°C) a inkubován 30 minut při 37 °C. Do rozpuštěného peletu byl poté přidán 20% dextran sulfát v 4x SSC pufru (5 µl) a nakonec byla směs denaturována 5 minut při 90 °C a prudce ochlazená na ledu. Takto zhotovená hybridizační směs se sondami byla nakápnuta na denaturované preparáty, přikryta krycím sklíčkem a utěsněna pomocí kaučukového lepidla Fixogum (Marabuwerke GmbH, Tamm, SRN). Hybridizace probíhala v krabici s filtračním papírem navlhčeným 2x SSC pufrem po 3 dny při 37 °C. Poté byly preparáty zbaveny krycích sklíček, promyty 5 minut v 1% Tritonu X-100 v 0,1x SSC pufru při 62 °C a nabarveny DAPI (viz kapitola 3.3.2).

3.7. Izolace genů

Geny potřebné k ověření původu pohlavních chromosomů zkoumaných druhů předivek byly získány z komplementární DNA (cDNA) pomocí metody PCR s degenerovanými primery. Syntéza prvního řetězce cDNA z vyizolované celkové RNA (kap. 3.4.2) proběhla za pomoci SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) podle pokynů výrobce (na reakci bylo použito 11,5 µl RNA). Reverzní transkriptáza byla tepelně inaktivována inkubací 15 minut při 70 °C a pro odstranění templátové RNA bylo použito 5 U RNázy H (USB Corporation, Cleveland, OH, USA), která byla s vzorky inkubována 20 minut při 37 °C a nakonec inaktivována zahřátím na 65 °C po dobu 20 minut. Degenerované primery byly navrženy bez použití softwaru na základě srovnání konzervovaných ortologních aminokyselinových sekvencí zástupců hmyzu (z řádů: Lepidoptera, Hymenoptera a Coleoptera) vybraných v databázi GenBank. Celkem byly navrženy 3 páry primerů pro konzervované geny z chromosomů 8 a 19 bource morušového, konkrétně *APC* (chr. 8), *CPK* (chr. 8) a *AS* (chr. 19). Jeden pár degenerovaných primerů (pro gen *EF*) byl převzat z práce Sýkorová (2011). PCR o objemu 20 µl obsahovala tyto komponenty: 0,5 U

Takara Ex *Taq* Hot Start polymerázy; Ex *Taq* pufr; 0,2mM dNTP mix; 1 μ l cDNA a primery o výsledné koncentraci 5 μ M. Teplotní profil reakce vypadal takto: 3 minuty počáteční denaturace při 94 °C a 35 cyklů sestávajících z 45 s denaturace při 94 °C, 45 s nasedání primerů při teplotě individuální pro jednotlivé páry primerů (viz Tab. 1., T_a) a 1 minuty syntézy při 72 °C (případně 1 minuty 15 s u očekávaného produktu o velikosti 1000 bazí a více). Závěrečná syntéza probíhala při 72 °C 3 minuty.

Tabulka 1.: Přehled degenerovaných primerů použitých pro izolaci genů:

Gen	Kód primeru	5'-3' Sekvence primeru	Původ	T_a (°C)	Velikost PCR produktů (bp)
AS	ATP_synthase_F0	GGTDCCHATTGGTCGTGGTC	Tato práce	58	~ 800
	ATP_synthase_R0	GCDGCATCCAARTCRGAACC	Tato práce	58	
APC	APCdeg_F01	GAYTTYGGNCAYATGGARGC	Tato práce	58	~ 900
	APCdeg_R01	TCYTGRTGYTTYTTNACNGC	Tato práce	58	
CPK	CpkCdeg_F01	TGYAARGAYTTYATHHTGGGG	Tato práce	58	~ 850
	CpkCdeg_R01	TTYTCNACCATNGTRCAYTC	Tato práce	58	
EF	EF1dF01	AARGARGCNCARGARATGGG	Sýkorová, 2011	58	~ 1000
	EF1dR02	GCNACNGTYTGYCTCATRTC	Sýkorová, 2011	58	

3.8. Klonování a sekvenování

Získané PCR produkty (velikost produktů viz Tab. 1.) byly vyříznuty z 1% agarózového gelu a přečištěny pomocí soupravy Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (Promega, Madison, WI, USA) podle protokolu od výrobce. Jednotlivé vzorky byly poté zaligovány do vektoru Promega pGEM T Easy Vector (Promega), který byl použit k transformaci chemicky kompetentních buněk *E. coli* kmene DH5 α . Na transformační reakci bylo použito 50 μ l kompetentních buněk a 2 μ l ligační směsi. Po půlhodinové inkubaci při 4 °C, byla tato směs zahřívána 90 s při 42 °C, zchlazena na ledu a po přidání 900 μ l sterilního LB média (2 g tryptonu, 1 g kvasinkového extraktu, 2 g NaCl a 200 ml miliQ vody) inkubována 1 hodinu při 37 °C. 150 μ l této směsi bylo pak vyseto na plotnu (LB médium, 2% agar, 100 μ g/ml ampicilin, 350 μ M isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid, 35 mg/ml X-gal) a inkubováno při 37 °C. Po vyselektování bílých kolonií byly vybrané klony namnoženy ve 3 ml LB média s ampicilinem (100 μ g/ml) přes noc při 37 °C. Z transformovaných bakterií byly získány plasmidy prostřednictvím soupravy pro izolaci plasmidové DNA - Qiaprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Düsseldorf, SRN). Takto získaná plasmidová DNA sekvence byla osekvenována v Laboratoři genomiky Biologického centra AV ČR s použitím univerzálních primerů M13F (5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3') a M13R (5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3'), upravena pomocí volně dostupného programu VectorScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>) a ověřena porovnáním s databází NCBI pomocí programu BLASTn (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome). Dále byly sekvence fragmentů genů testovány klastrovou analýzou se sekvencemi ortologních genů bource morušového v programu FastPCR na přítomnost intronových oblastí.

3.9. Příprava sond pro Southernovu hybridizaci

Sondy pro Southernovu hybridizaci byly připraveny ze zaklonovaných a osekvenovaných fragmentů genů *APC*, *CPK*, *AS* a *EF* pomocí metody PCR se specifickými primery a nukleotidy značenými alkali-labilním DIG-dUTP (Digoxigenin-11-dUTP, Alkali-labile, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Německo). Specifické primery pro jednotlivé geny (viz Tab.2.) byly navrženy ve volně dostupném programu Primer3. Primery pro geny *CPK* a *AS*, u kterých byl klastrovou analýzou zjištěn výskyt intronů, byly nejprve použity v PCR s gDNA jako templátem, za účelem získání fragmentů obsahujících introny (fragmenty s introny byly izolovány kvůli tomu, aby sondy, které z nich měly být připraveny, lépe

hybridizovaly s gDNA při Southernově hybridizaci). Tato reakce o objemu 20 μ l obsahovala: 0,5 U Takara Ex *Taq* Hot Start polymerázy; Ex *Taq* pufr; 0,2mM dNTP mix, zhruba 200 ng gDNA a specifické primery o výsledné koncentraci 0,5 μ M. Teplotní profil reakce byl obdobný jako u PCR v kap. 3.7., jen teplota nasedání primerů byla 57 °C (viz Tab. 2., T_a). Produkty byly posléze vyříznuty z gelu, přečištěny a klonovány. Samotná výroba sond pak probíhala při reakci o objemu 20 μ l a obsahovala: 0,5 U Takara Ex *Taq* Hot Start polymerázy; Ex *Taq* pufr; 0,2mM dNTP mix (1 mM dGTP, 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 0,65 mM dTTP a 0,35 mM DIG-dUTP); zhruba 7 ng osekvenované plasmidové DNA se zaklonovanými fragmenty genů (pro sondu z genu *CPK* byla jako templát použita plasmidová DNA se zaklonovaným fragmentem s introny; pro sondy ze zbylých genů byla použita plasmidová DNA s fragmenty bez intronů) a primery o výsledné koncentraci 0,5 μ M. Teplotní profil reakce vypadal následovně: 5 minut počáteční denaturace při 95 °C a 40 cyklů sestávajících z 30 s denaturace při 95 °C, 30 s nasedání primerů při teplotě 57 °C (viz Tab.2., T_a) a 75 s syntézy při 72 °C. Závěrečná syntéza probíhala při 72 °C 5 minut.

Tabulka 2.: Přehled specifických primerů použitých pro výrobu sond:

Gen	Kód primeru	5'-3' Sekvence primeru	Původ	T_a (°C)	Velikost PCR produktů (bp)	
					cDNA	gDNA
AS	Yev_ASsts_F01	CACAGAGAGACCGACGTTGA	Tato práce	57	~ 600	~ 1800
	Yev_ASsts_R01	ATCGACACCATCATCAACCA	Tato práce	57		
APC	Yev_APCsts_F01	AAGGGATTGCCCTAGCTGAT	Tato práce	57	~ 800	
	Yev_APCsts_R01	CAACCTGCTTTCGTCAAACA	Tato práce	57		
CPK	Yev_CPKsts_F01	CTCTCCGATCCCTACGTGAA	Tato práce	57	~ 300	~ 900
	Yev_CPKsts_R01	TCTTCAGCTGAGCCAAGTCC	Tato práce	57		
EF	Yev_EFsts_F01	ACATTGTCTCCGGGTACAGC	Tato práce	57	~ 800	
	Yev_EFsts_R01	CAAGGGCTCCTTCAAGTACG	Tato práce	57		

3.10. Southernova hybridizace

Celogenomová DNA ze samců a samic předivky zhoubné byla nejprve naštěpena pomocí restrikčních enzymů *Xba*I a *Dra*I (tyto enzymy byly vybrány z toho důvodu, že neštěpí uvnitř sekvence genových fragmentů, z nichž byly připraveny sondy) (Fermentas, Vilnius, Litva) při reakci o objemu 50 μ l a složení: 50 U každého enzymu, 1x pufr *Tango* (dodávaný společně s enzymy) a 6 μ g gDNA. Štěpení probíhalo přes noc při 37 °C a bylo zakončeno elektroforetickou separací vzniklých DNA fragmentů společně s velikostním DIG-značeným DNA markerem (DNA Molecular Weight Marker III, DIG labeled; Roche Diagnostics) na 1% agarózovém gelu v TBE pufru (45mM Trisborát, 1mM EDTA). Za účelem depurinace byl gel ponořen na 10 minut do 0,25M HCl, po čemž následovalo promytí 2x 15 minut při PT v denaturačním roztoku (50mM NaOH; 0,15M NaCl) a 2x 15 minut v neutralizačním roztoku (50mM Tris-HCl; 0,3M NaCl; pH 7,5). Kapilární přenos DNA z gelu na nylonovou membránu Hybond N+ (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), který probíhal přes noc, byl uskutečněn prostřednictvím sendvičového můstku, využívajícího 20x SSC pufr jako přenosové médium. Po 5-ti minutovém opláchnutí v 6x SSC pufru byla přenesená DNA fixována na membránu pomocí přístroje Stralinker UV Crosslinker (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Dále byla membrána navlhčena v 2x SSC pufru, inkubována hodinu při 42 °C v prehybridizačním roztoku DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics) a poté hybridizována přes noc při teplotě 42 °C v 6,5 ml roztoku DIG Easy Hyb se 100 ng denaturované sondy značené alkali-labilním DIG-dUTP. Dále následovalo promytí membrány 2x 5 minut při PT v roztoku 0,1% SDS v 2x SSC pufru a promytí 2x 15 minut při 68 °C v roztoku 0,1% SDS v 0,2x SSC pufru. Chemiluminiscenční detekce spočívala v těchto krocích: promytí membrány 5 minut v 0,3% Tweenu 20 v 1x TBS pufru (25 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl, pH 7,5), inkubace 45 minut v roztoku 5% odtučněného sušeného mléka (Difco Skim Milk, Becton, Dickinson and Company, Francie), inkubace 30 minut při PT znovu v blokovacím roztoku mléka společně s protilátkou proti digoxigeninu konjugovanou s alkalickou fosfatázou (Anti-Digoxigenin-AP ředěná 1:10000) (Roche Diagnostics), promytí 2x 15 minut v roztoku 0,3% Tween 20 v 1x TBS pufru při PT a inkubace 3 minuty při PT v detekčním pufru (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5). Nakonec bylo na membránu vloženou do hybridizačního sáčku nanášeno přibližně 40 kapek chemiluminiscenčního substrátu CDP-*Star*, ready-to-use (Roche Diagnostics) a po pěti minutách inkubace při PT byl konečný výsledek snímán pomocí CCD kamery Lumi-Imager LAS-3000 (Fujifilm Life Science, Stamford, CT, USA). Pro možnost opětovného použití

byla membrána po promytí 5 minut ve sterilní miliQ vodě zbavena digoxigeninu inkubací 2x 15 minut v roztoku „stripping solution“ (0,2M NaOH, 0,1% SDS pufr) při 37 °C. Poté byla opláchnuta 5 minut v 2x SSC pufru, vložena do hybridizačního sáčku a uskladněna do dalšího použití při 4 °C.

4. Výsledky

4.1. Chromosomy předivek

Zkoumanými druhy motýlů v této práci byly tři druhy předivek rodu *Yponomeuta*, konkrétně předivka zhoubná, p. ovocná a p. brslenová. Počty chromosomů těchto tří druhů předivek byly stanoveny a popsány v roce 1988 v práci Nilsson a kol. a odpovídají u samců diploidnímu počtu $2n = 62$ a u samic $2n = 61$. Jedním z mých úkolů bylo ověřit tento počet, což bylo provedeno na preparátech mitotických chromosomů z křídelních disků, které byly obarveny DAPI (Obr. 1). Počet chromosomů odpovídal výše zmíněné práci a byl stejný u všech tří druhů předivek, přičemž chromosomy spadaly do několika velikostních kategorií, ve kterých nebylo možné odlišit od sebe jednotlivé páry vzhledem k jejich uniformnímu tvaru a holokinetickému charakteru. Chromosom W na těchto preparátech nebyl od ostatních chromosomů diferencovaný.

Dalším úkolem bylo ověřit konstituci pohlavních chromosomů. Předivky mají systém pohlavních chromosomů se dvěma chromosomy Z, tedy $WZ_1Z_2/Z_1Z_1Z_2Z_2$ (Nilsson a kol., 1988). Výskyt chromosomu W byl patrný na preparátech pachytenních oocytů obarvených orceinem (Obr. 2), které byly pozorovány pod mikroskopem s fázovým kontrastem. Na těchto preparátech je vlákno chromosomu W zvládně díky silně obarvenému heterochromatinu, který pokrývá u předivky zhoubné a p. ovocné celý chromosom W a u p. brslenové je v jednom místě přerušeno (Obr. 2a). Na ostatních chromosomech je možné pozorovat strukturu chromomer a interchromomer. To, že se pohlavní chromosomy u samic předivek vyskytují v trivalentu, který obsahuje dva chromosomy Z místo jednoho, bylo potvrzeno na preparátech po genomové *in situ* hybridizaci (GISH) s telomerickou sondou. Trivalent byl zvládně díky hybridizaci chromosomu W se zeleně značenou samičí DNA, telomerická sonda pak označila jeho konce a zároveň konce dvou chromosomů Z uprostřed trivalentu (Obr. 3).

Další metodou použitou pro stanovení diference chromosomu W byla komparativní genomová hybridizace (CGH). U každého ze tří zkoumaných druhů předivek CGH zvládně trivalent pohlavních chromosomů díky silné vazbě samčí i samičí sondy na chromosom W (Obr. 4.). Obě sondy naznačily celé vlákno chromosomu W, s tím že hybridizační signál samičí (zelené) sondy byl v některých místech v porovnání se samčí (červenou) sondou silnější.

4.2. Izolace genů

Pro ověření hypotézy o vzniku systému pohlavních chromosomů předivek byly použity degenerované primery na izolaci a následnou hybridizaci ortologů genů ze dvou autosomů (chromosom 8 a 19) bource morušového. Celkem byly navrženy 4 páry primerů pro geny *APC*, *CPK*, *AS* a *EF*, přičemž *APC* a *CPK* jsou lokalizovány u bource na chromosomu 8, *AS* je na chromosomu 19 a *EF* byl izolován za účelem jeho použití jako referenčního autosomálního genu, který se u bource nachází na chromosomu 5. Pomocí těchto primerů byly z cDNA úspěšně izolovány, zaklonovány a osekvenovány fragmenty všech čtyřech genů. Sekvence fragmentů byly poté srovnány se sekvencemi ortologních genů bource morušového pomocí klastrové analýzy, čímž bylo zjištěno, že geny *CPK* a *AS* obsahují introny. Pro získání fragmentů s introny byla provedena PCR se specifickými primery pro tyto dva geny, ve které byla jako templát použita gDNA. Ze získaných produktů se však podařilo zaklonovat a osekvenovat jen fragment s introny z genu *CPK*. Fragment obsahující introny z genu *AS* nebyl úspěšně zaklonován.

4.3. Southernova hybridizace

Southernova hybridizace se sondami z genů *APC*, *CPK*, *AS* a *EF* byla provedena za účelem zjištění, zda jsou tyto geny u předivek lokalizovány na autosomech, stejně jako je tomu u bource morušového, nebo zda se v průběhu změn pohlavních chromosomů předivek translokovaly a jsou vázané na chromosom Z.

Genové sondy pro Southernovu hybridizaci byly připraveny metodou PCR se specifickými primery, kde v případě genů *APC*, *CPK* a *EF* jako templát sloužila plasmidová DNA s fragmenty těchto genů bez intronů, zatímco u genu *CPK* byla sonda vyrobena z templátu plasmidové DNA s fragmentem, jenž introny obsahoval. Všechny sondy byly naznačeny alkali-labilním digoxigeninem a byly postupně hybridizovány na dvě membrány s navázanou naštěpenou samčí a samičí gDNA.

První membrána byla hybridizována se sondou z genu *APC* a s kontrolní sondou z genu *EF*. Na druhou membránu byla použita jen sonda z genu *EF* za účelem rozpoznání signálu sondy *EF* od sondy *APC* na první membráně. Signál hybridizované sondy pro gen *APC* byl na membráně pozorován jako dvojitý proužek o velikosti 2 kbp (Obr. 5.), přičemž kratší proužek měl slabší intenzitu než ten delší. Oba proužky pak měly stejnou intenzitu u samčí i samičí gDNA, z čehož vyplývá, že daný gen je lokalizován na autosomu. Kontrolní sonda z genu *EF*, která byla na membráně lokalizována v úseku o velikosti 3,5 kbp,

hybridizovala také se stejnou intenzitou u obou pohlaví, čímž byla vyloučena nestejněměrná nanáška gDNA ze samce a samice. Po odstranění digoxigeninu ze zhybridizovaných sond byly na membrány hybridizovány zbylé dvě sondy (*CPK*, *AS*). Sonda pro gen *CPK* obsahovala intron, který podle charakteru hybridizačního signálu nesl repetitivní sekvenci. Ta způsobila, že sonda hybridizovala po celé gDNA (Obr. 5). Ačkoliv byl signál u samce a samice srovnatelný, na základě hybridizace repetitivní sekvence nelze s jistotou říci, že se jedná o gen na autosomu. Poslední testovaná sonda (*AS*) byla připravená z cDNA, tedy bez intronu, ačkoli gen *AS* v této oblasti intron obsahuje.

5. Diskuze

5.1. Počty a charakter chromosomů vybraných druhů přediček

Charakteristickým znakem karyotypů motýlů je poměrně velké množství malých chromosomů uniformního tvaru. U většiny druhů se diploidní počet chromosomů pohybuje kolem $2n = 60$ (Robinson, 1971), s tím že ancestrální stav je pravděpodobně $2n = 62$. Počet chromosomů u celkem šesti druhů přediček byl již dříve uveden v publikaci Nilsson a kol. (1988) a odpovídal u všech zkoumaných druhů diploidnímu počtu $2n = 61$ u samic a $2n = 62$ u samců. Stejný počet chromosomů byl pozorován také u vybraných druhů přediček v mojí práci, kde byly pro jejich odečet zhotoveny preparáty mitotických chromosomů z křídelních disků. Mitotické chromosomy na těchto preparátech byly dle očekávání malé, nelišící se navzájem výrazně tvarem. Co se týká velikosti, bylo možno je rozdělit do několika velikostních kategorií.

5.2. Pohlavní chromosomy u přediček

U motýlů byly doposud popsány 4 varianty konstitucí pohlavních chromosomů. Nejběžnějším je uspořádání WZ/ZZ (např. *B. mori*: Bombycidae; Tanaka, 1916). Méně časté, avšak pravděpodobně ancestrální uskupení pohlavních chromosomů je Z/ZZ, které bylo pozorováno především u bazálních skupin, ale sporadicky se vyskytuje i u odvozenějších druhů (*Samia cynthia ricini*: Saturniidae; Yoshido a kol., 2005). Dále bylo zaznamenáno uspořádání se dvěma chromosomy W (W_1W_2Z/ZZ ; např. *Bactra lacteana*: Tortricidae; Suomalainen, 1969b) a nakonec také systém se dvěma chromosomy Z ($WZ_1Z_2/Z_1Z_1Z_2Z_2$), který byl objeven u přediček (Nilsson a kol., 1988) a několika dalších druhů (např. *Trabala vishnu*: Lasiocampidae; Rishi a kol., 1999 nebo *Samia cynthia* subsp. indet.; Yoshido a kol., 2005).

To, že samice přediček nesou chromosom W a k němu se párující dva chromosomy Z, se ukázalo na preparátech pachytenních oocytů po genomové hybridizaci (GISH) kombinované s *in situ* hybridizací s telomerickou sondou (telo-FISH). Celogenomová sonda připravená z gDNA samice označila trivalent pohlavních chromosomů tím, že jasně zvýraznila heterochromatin na chromosomu W a telomerická sonda pak detekovala nejen jeho konce, ale hybridizovala také uprostřed trivalentu, kde končí jeden chromosom Z a začíná druhý. Na detailnějším snímku trivalentu je potom patrné, že sonda uprostřed neleží na silně značeném vlákně chromosomu W, ale na světleji obarvených chromosomech Z.

K obdobnému výsledku došli u jedné populace martináče *Samia synthia* subsp. indet. autoři článku Yoshido a kol. (2005), kteří tuto metodu (GISH s telo-FISH) zavedli ke stanovení konstituce pohlavních chromosomů u samic čtyř vybraných druhů motýlů.

Komparativní genomová hybridizace (CGH) byla použita za účelem stanovení stupně diferenciaci chromosomu W. Za předpokladu, že pohlavní trivalent u předivek vznikl translokací autosomu na chromosom W, bylo by možné, že translokovaná část chromosomu W ještě nestihla tolik zdegenerovat a jevila by se jako euchromatinová. Příkladem motýla s jen částečně heterochromatinizovaným chromosomem W je štětconoš trnkový (*Orgyia antiqua*: Lymantriidae), jehož chromosomy prošly během evoluce řadou fúzí (Traut a Clarke, 1997). Během pachytene tvoří jeho pohlavní chromosomy dlouhý bivalent, ve kterém je část chromosomu W heterochromatinová, zatímco zbytek je homologní s chromosomem Z (Traut a Marec, 1997). U předivek byl chromosom W stejně jako po GISH silně značen, s tím rozdílem, že zvýrazněn byl nejen samičí, ale také samčí sondou. Důvodem toho, že na chromosom W sedá ve velké míře i samčí sonda, jsou zřejmě repetice, které jsou roztroušené v genomu samice i samce, ale na chromosomu W došlo k jejich akumulaci (Vítková a kol., 2007). Na preparátech je také vidět, že signál samičí (zelené) sondy je místy silnější než samčí, avšak nikde nebyly nalezeny větší celky ryze samičích sekvencí, které se vyskytují například u některých zástupců z čeledi zavíječovitých (Pyralidae; Vítková a kol., 2007).

Kromě hybridizačních metod bylo k vizualizaci chromosomu W použito také barvení pachytenních chromosomů pomocí orceinu. Tato metoda byla využita u řady motýlů k rychlé a snadné identifikaci pohlavních chromosomů (Traut a Marec, 1997), nicméně u některých druhů s méně diferencovaným chromosomem W použít nelze (např. *Ectomyelois ceratoniae*: Pyralidae; Mediouni a kol., 2004). Orcein označil u dvou druhů předivek (p. zhoubné a p. ovocné) jednoduše výrazným signálem celý chromosom W, který na rozdíl od ostatních autosomů a chromosomů Z nevykazoval strukturu chromomer a interchromomer. U předivky brslenové byl tmavě zbarvený heterochromatin na chromosomu W v jednom místě přerušen. Co se velikosti týká, je chromosom W předivek poměrně velký, čímž se nijak neodlišuje od ostatních motýlů, kde je malý chromosom W spíše výjimkou (shrnuto v Marec a kol., 2010).

To, že je celý chromosom W předivek silně zvýrazněn po CGH i po barvení orceinem poukazuje na jeho pokročilou degeneraci, která se projevuje značnou akumulací repetitivních sekvencí, jako jsou retrotransposony (Marec a kol., 2010). Na základě těchto údajů můžeme tedy o vzniku nadpočetného chromosomu Z u předivek uvažovat ze dvou

hledisek, buďto vznikl chromosom Z_2 rozpadem původního chromosomu Z nebo je to homolog autosomu, jenž sfúzoval s chromosomem W před dostatečně dlouhou dobou na to, aby nová evolučně mladší část chromosomu W stihla zdegenerovat.

5.3. Ověření vzniku chromosomu Z_2 Southernovou hybridizací

Vznik mnohočetných pohlavních chromosomů motýlů se většinou přičítá fúzi jednoho z pohlavních chromosomů s autosomem (Suomalainen, 1969a; Traut, 1999), ale je také možné, že nadpočetný chromosom Z či W vznikl rozpadem původního chromosomu (Suomalainen, 1969b). Pro ověření vzniku nadpočetného chromosomu Z u předivek translokací autosomu, byly z cDNA (v jednom případě z gDNA) předivky zhoubné izolovány ortologní fragmenty konzervovaných genů z chromosomů 8 a 19 bource morušového. Tyto geny, respektive chromosomy, byly vybrány na základě údajů o lokalizaci genu pro β -karboxylesterázu. U bource se vyskytují dva geny pro tento enzym. Oba jsou autosomálního původu, jeden byl lokalizován na chromosomu 8 a druhý na chromosomu 19 (Yu a kol., 2009). U předivek je však alozymová forma β -karboxylesterázy vázána na chromosom Z (Raijmann a kol., 1997). Pokud by se ukázalo, že se i jiné ortologní geny z jednoho či druhého chromosomu u předivek přesunuly na chromosom Z , mohl by se daný chromosom považovat za onen translokovaný autosom.

Z chromosomu 8 byly vyizolovány fragmenty dvou genů (*APC* - adaptor-related protein complex 2; *CPK* - protein kinase C) a z chromosomu 19 fragment jednoho genu (*AS* - ATP synthase). K porovnání počtu kopií těchto genů v genomu samce a samice byla provedena Southernova hybridizace se samčí a samičí DNA, při které byl jako referenční gen použit elongační faktor (*EF*).

Z výsledku hybridizace sondy *APC* je patrné, že gen leží na autosomu, protože intenzita signálu je u samce a samice srovnatelná. To, že sonda hybridizovala ve formě dvou proužků, z nichž jeden je světlejší, je pravděpodobně zapříčiněno přítomností pseudogenu. Jednak lze vyloučit, že enzymy, použité k fragmentaci samčí a samičí DNA štěpily uvnitř hybridizované sekvence, a potom slabší signál druhého proužku může být způsoben tím, že částečně pozměněná sekvence pseudogenu hybridizovala se sondou hůře než samotný funkční gen.

Po odmytí sondy *APC* byla na membránu hybridizována další sonda, tentokrát pro gen *CPK*. Protože bylo zjištěno, že fragment tohoto genu obsahuje intron, jeho sonda byla připravena z gDNA, aby se prodloužila cílová sekvence. Gen *CPK* je u bource stejně jako gen *APC* lokalizován na chromosomu 8, a proto byl očekáván obdobný výsledek

hybridizace. Nicméně se ukázalo, že v intronu, který sonda obsahovala, se nacházela repetice. Ta svým silným signálem označila v podstatě celý genom a přestože byla intenzita hybridizace srovnatelná u obou pohlaví, nelze na základě repetitivní sekvence s jistotou tvrdit, že je daný gen autosomální.

Poslední hybridizovanou sondou byla sonda pro gen *AS*. U fragmentu tohoto genu byl jako v předchozím případě nalezen intron, ale tentokrát byla sonda vyrobena z cDNA, protože se fragment s intronem nepodařilo včas zaklonovat a osekvenovat. Ačkoliv se zdálo, že je sonda i bez intronu dostatečně dlouhá, na membránu hybridizovala špatně, zřejmě proto, že cílová sekvence byla přerušena příliš dlouhým intronovým úsekem a sonda na ní nemohla správně nasednout. Výsledek proto nelze bez opakování pokusu nijak interpretovat.

Pro získání více informací o tom, zda jsou zkoumané geny lokalizovány na autosomu nebo byly translokovány na chromosom Z, je třeba v případě genů *CPK* a *AS* vytvořit sondu z jiného úseku izolovaného fragmentu, případně využít i jiné metody než Southernovu hybridizaci, jako například kvantitativní PCR, která byla použita k ověření vazby genů *Ace-1* a *Ace-2* na chromosom Z obaleče jablečného (*Cydia pomonella*: Tortricidae; Sýkorová, 2011).

6. Závěr

Tato práce byla zaměřena na studium molekulární diferenciace pohlavních chromosomů tří vybraných druhů předivek z čeledi Yponomeutidae, konkrétně předivky zhoubné (*Yponomeuta evonymellus*), p. brslenové (*Y. cagnagellus*) a p. ovocné (*Y. padellus*).

Jedním z dílčích cílů byla karyotypová analýza vybraných druhů, která zahrnovala jednak ověření počtu chromosomů, identifikaci pohlavních chromosomů a přibližné stanovení molekulární divergence pohlavního chromosomu W. Počty chromosomů byly odečteny z preparátů mitotických chromosomů připravených z křídelních disků, na nichž se ukázalo, že diploidní počet chromosomů u všech tří druhů odpovídá dříve prokázanému počtu $2n = 61$ u samic a $2n = 62$ u samců.

Dále byly rozpoznány pohlavní chromosomy na preparátech pachytenních chromosomů, a to na základě několika metod. Barvení orceinem, podobně jako genomová *in situ* hybridizace (GISH), zvýraznily chromosom W díky odlišnému charakteru tohoto chromosomu, jehož vlákno je v případě předivky zhoubné a ovocné po celé délce a u předivky brslenové z větší části pokryté heterochromatinem. Metodou komparativní genomové hybridizace (CGH) pak bylo zjištěno, že chromosom W je značen silným signálem jak samičí tak samčí sondy, což nasvědčuje akumulaci repetitivních sekvencí na tomto chromosomu. Větší úseky výhradně samičích sekvencí nebyly ani u jednoho druhu pozorovány.

Dalším úkolem této práce bylo ověřit konstituci pohlavních chromosomů a pokusit se zjistit její původ. Konstituce pohlavních chromosomů, v tomto případě trivalent WZ_1Z_2 u samic, byla prokázána na preparátech pachytenních chromosomů ošetřených GISH kombinovanou s fluorescenční hybridizací telomerické sondy (telo-FISH). Na trivalentu označeném samičí sondou byly lokalizovány signály telomerické sondy jednak na koncích trivalentu a pak také uprostřed, kde končí jeden chromosom Z a začíná druhý. Pro ověření hypotézy o fúzi chromosomu W s autosomem a vzniku chromosomu Z_2 z homologního partnera tohoto autosomu, byla testována vazba tří konzervovaných genů (*APC*, *CPK* a *AS*) ze dvou vybraných autosomů bource morušového (*Bombyx mori*) na chromosom Z pomocí Southernovy hybridizace. Z výsledků hybridizace je patrné, že gen *APC* z chromosomu 8 leží u předivek stejně jako u bource na autosomu. Vazbu dvou zbylých genů se z diskutovaných důvodů nepodařilo stanovit.

7. Literatura

- Bachtrog D (2006) A dynamic view of sex chromosome evolution. *Curr Opin Genet Dev* 16: 578-585.
- Blin N, Stafford DW (1976) A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 3: 2303–2308.
- Brown KSJ, von Schoultz B, Suomalainen E (2004) Chromosome evolution in Neotropical Danainae and Ithomiinae (Lepidoptera). *Hereditas* 141: 216–36.
- Dopman EB, Bogdanowicz SM, Harrison RG (2004) Genetic mapping of sexual isolation between E and Z pheromone strains of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). *Genetics* 167: 301–309.
- de Lesse H (1970) Les nombres de chromosomes dans le groupe de *Lysandra argester* et leur incidence sur la taxonomie. *Bull. Soc. Entomol. Fr.* 75:64–68.
- Ezaz T, Stiglec R, Veyrunes F, Marshall-Graves JA (2006) Relationships between vertebrate ZW and XY sex chromosome systems. *Curr Biol* 16: R736-R743.
- Fuková I, Traut W, Vítková M, Nguyen P, Kubičková S a kol. (2007) Probing the W chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin. *Chromosoma* 116: 135-145.
- Gruetzner F, Ashley T, Rowell D, Marshall Graves J (2006) How did the platypus get its sex chromosome chain? A comparison of meiotic multiples and sex chromosomes in plants and animals. *Chromosoma* 115, 75–88.
- Hillis DM, Green DM (1990) Evolutionary changes of heterogametic sex in the phylogenetic history of amphibians. *J. Evol. Biol.* 3, 49–64.
- Hughes JF, Skaletsky H, Pyntikova T, Graves TA, van Daalen SK a kol. (2010) Chimpanzee and human Y chromosomes are remarkably divergent in structure and gene content. *Nature* 463: 536–539.
- Charlesworth B, Charlesworth D (1997) Rapid fixation of deleterious alleles can be caused by Muller's ratchet. *Genet. Res.* 70: 63-73.
- Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G (2005) Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity* 95: 118-128.
- Jiggins CD, Mavarez J, Beltran M, McMillan WO, Johnston JS a kol. (2005) A genetic linkage map of the mimetic butterfly *Heliconius melpomene*. *Genetics* 171: 557–570.
- Kawamura N (1988) The egg size determining gene, *Esd*, is a unique morphological marker on the W chromosome of *Bombyx mori*. *Genetica* 76: 195–201.

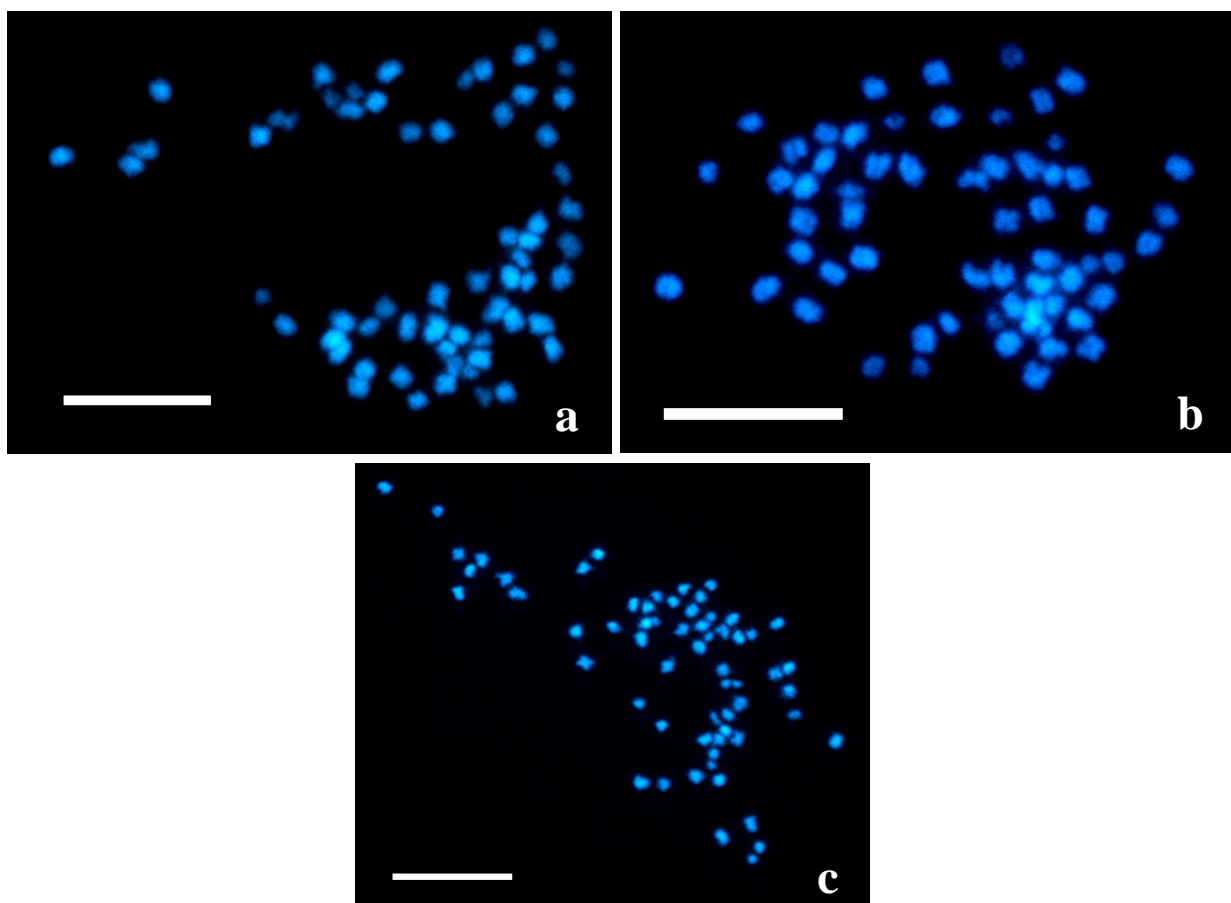
- Kawamura N (1990) Is the egg size determining gene, Esd, on the W chromosome identical with the sex-linked giant egg gene, Ge, in the silkworm? *Genetica* 81: 205–210.
- Klingstedt H (1931) Digametie bei Weibchen der Trichoptere *Limnophilus decipiens* Kol. *Acta Zool Fennica* 10:1–69.
- Koike Y, Mita K, Suzuki MG, Maeda S, Abe H a kol. (2003) Genomic sequence of a 320-kb segment of the Z chromosome of *Bombyx mori* containing a kettin ortholog. *Mol Gen Genomics* 269: 137-149.
- Kristensen NP, Skalski AW (1999) Phylogeny and palaeontology. In *Lepidoptera, moths and butterflies. 1. Evolution, systematics, and biogeography*, ed. Kristensen NP, 7–25. *Handbook of Zoologie*, Vol. 4, Part 35, *Arthropoda: Insecta*. Berlin and New York: Walter de Gruyter.
- 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 nonditrypsian Lepidoptera (Insecta). *Zool Syst Evol Res* 38: 73-79.
- Mank JE, Promislow DEL, Avise JC (2006) Evolution of alternative sex-determining mechanisms in teleost fishes. *Biol J Linnean Soc* 87: 83-93.
- Marec F, Leutelt J, Traut W, Wolf KW (1993) Visualization of polyfusomes in gonads of a moth, *Ephestia kuehniella* Z. (Lepidoptera: Pyralidae) by a microspreading technique and electron microscopy. *Int. J. Insect Morphol Embryol* 22: 487-496
- 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, Sahara K, Traut W (2010) Rise and fall of the W chromosome in Lepidoptera. In Goldsmith MR, Marec F (eds.) *Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 49-63.
- Marec F, Tothová A, Sahara K, Traut W (2001) Meiotic pairing of sex chromosome fragments and its relation to atypical transmission of a sex-linked marker in *Ephestia kuehniella* (Insecta: Lepidoptera). *Heredity* 87:659–71.
- Mediouni J, Fuková I, Frydychová 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.
- Menken SBJ (1982) Biochemical genetics and systematics of small ermine moths (Lepidoptera, Yponomeutidae). *Z Zool Syst Evolut-forsch* 20: 131-143

- Murakami A, Imai HT (1974) Cytological evidence for holocentric chromosomes of the silkworms, *Bombyx mori* and *B. mandarina* (Bombycidae, Lepidoptera). *Chromosoma* 47:167–78.
- Nilsson N-O, Löfstedt C, Dävring L (1988) Unusual sex chromosome inheritance in six species of small ermine moths (*Yponomeuta*, Yponomeutidae, Lepidoptera). *Hereditas* 108:259–65.
- Ogata M, Hasegawa Y, Ohtani H, Mineyama M, Miura I (2007) The ZZ/ZW sex-determining mechanism originated twice and independently during evolution of the frog, *Rana rugosa*. *Heredity* 100: 92–99.
- Ohno S (1967) Sex chromosomes and sex-linked genes. *Springer*, New York
- Pringle EG, Baxter SW, Webster CL, Papanicolaou A, Lee SF a kol. (2007) Synteny and chromosome evolution in the Lepidoptera: evidence from mapping in *Heliconius melpomene*. *Genetics* 177: 417-426.
- Raijmann LEL (1996) In search for Speciation: Genetical Differentiation and Host Race Formation in *Yponomeuta padellus* (Lepidoptera, Yponomeutidae). PhD thesis, University of Amsterdam, the Netherlands
- Raijmann LEL, Menken SBJ (1992) Population genetical evidence for host-race formation in *Yponomeuta padellus*. In Menken SBJ, Visser JH, Harrewijn P (eds), *Proceedings of the 8th International Symposium on Insect-Plant relationships*, pp. 209-212. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht
- Raijmann LEL, Van Ginkel WE, Heckel DG, Menken SBJ (1997) Inheritance and linkage of isozymes in *Yponomeuta padellus* (Lepidoptera, Yponomeutidae). *Heredity* 78: 645-654.
- Rishi S, Sahni G, Rishi KK (1999) Inheritance of unusual sex chromosome evidenced by AA^WZ sex trivalent in *Trabala vishnu* (Lasiocampidae, Lepidoptera). *Cytobios* 100: 85–94.
- Robinson R, (1971) Lepidoptera genetics. Oxford: *Pergamon Press*.
- Rozen S, Skaletsky H, Marszalek JD, Minx PJ, Cordum HS a kol. (2003) Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and apes Y chromosomes. *Nature* 423: 873-876.
- Sahara K, Marec F, Traut W (1999) TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Res.*7: 449-460.

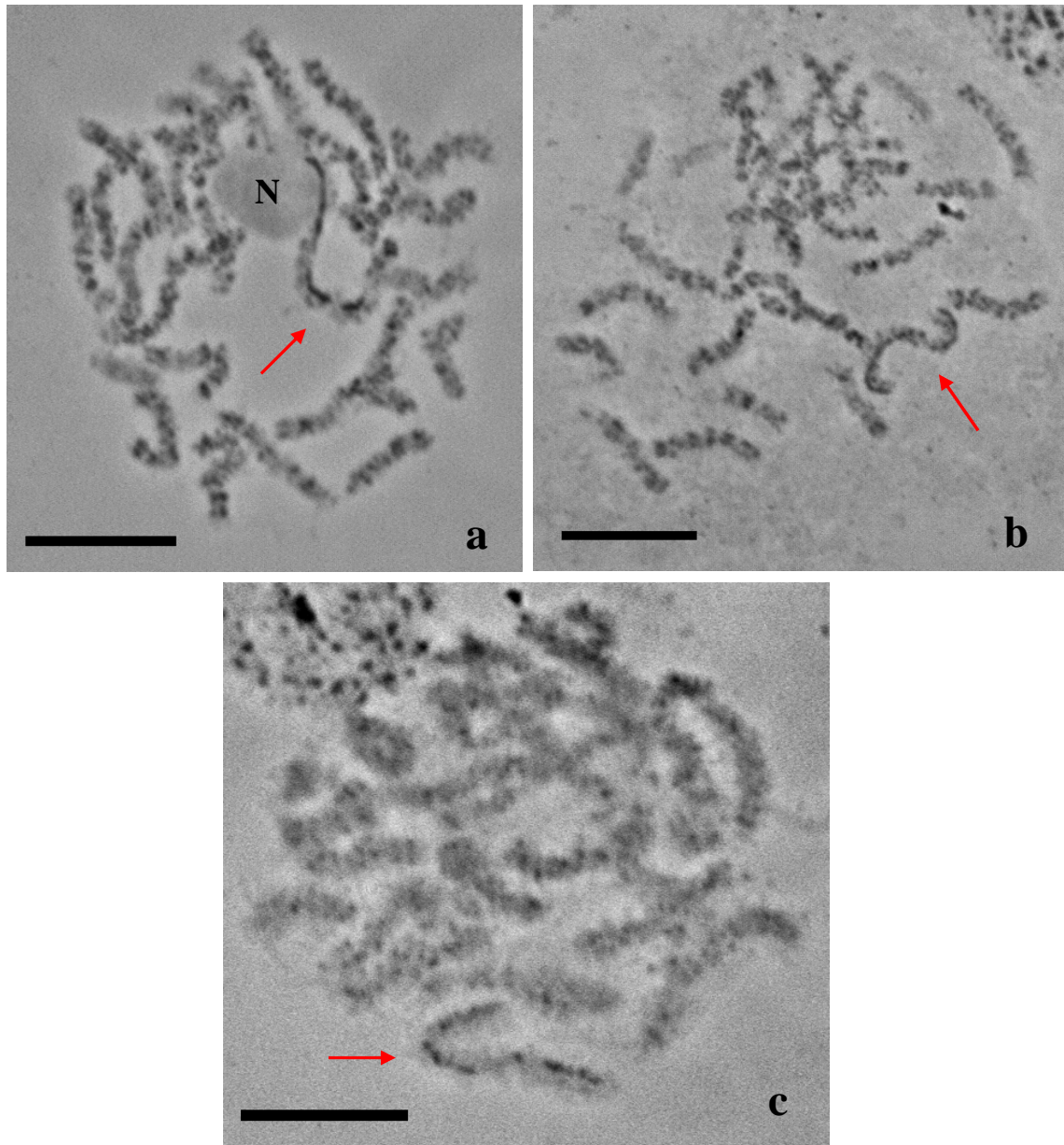
- Sahara K, Yoshido A, Kawamura N, Ohnuma A, Abe H a kol. (2003) W-derived BAC probes as a new tool for identification of the W chromosome and its aberrations in *Bombyx mori*. *Chromosoma* 112: 48–55.
- Sahara K, Yoshido A, Marec F, Fuková I, Zhang HB a kol. (2007) Conserved synteny of genes between chromosome 15 of *Bombyx mori* and a chromosome of *Manduca sexta* shown by five-color BAC-FISH. *Genome* 50: 1061-1065.
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L a kol. (2003) The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423: 825-837.
- Steinemann M, Steinemann S (2005) Y chromosomes: born to be destroyed. *BioEssays* 27: 1076-1083.
- Suomalainen E (1969a) Chromosome evolution in the Lepidoptera. In: Darlington CD, Lewis KR (eds) *Chromosomes Today* 2: 132-138. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Suomalainen E (1969b) On the sex chromosome trivalent in some Lepidoptera females. *Chromosoma* 28: 298–308.
- Sýkorová M (2011) Izolace a chromosomální lokalizace genů pro acetylcholinesterázu u obaleče jablečného (*Cydia pomonella*). Magisterská práce, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Česká republika.
- Tanaka Y (1916) Genetic studies in the silkworm. *J Coll Agr Sapporo* 7:129–255.
- Tazima Y (1965) The Genetics of the Silkworm. *Academic Press*, London.
- Tobler A, Kapan D, Flanagan NS, Gonzalez C, Peterson E a kol. (2005) First-generation linkage map of the warningly colored butterfly *Heliconius erato*. *Heredity* 94: 408-417.
- Traut W (1976) Pachytene mapping in the 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, Clarke CA (1997) Karyotype evolution by chromosome fusion in the moth genus *Orgyia*. *Hereditas* 126: 77–84.
- 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, Marec F (2008) Sex Chromosomes and Sex Determination in Lepidoptera. *Sex Dev* 1: 332–346.

- Traut W, Sahara K, Otto TD, Marec F (1999) Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma* 108: 173-180.
- Vítková M, Fuková I, Kubíčková S, Marec F (2007) Molecular divergence of the W chromosomes in pyralid moths (Lepidoptera). *Chromosome Res.* 15: 917-930.
- 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.
- Yasukochi Y, Ashakumary AL, Baba K, Yoshido A, Sahara K (2006) A second-generation integrated map of the silkworm reveals synteny and conserved gene order between lepidopteran insects. *Genetics* 173: 1319–1328.
- Yoshido A, Marec F, Sahara K (2005) Resolution of sex chromosome constitution by genomic *in situ* hybridization and fluorescence *in situ* hybridization with (TTAGG)_n telomeric probe in some species of Lepidoptera. *Chromosoma* 114:193–202.
- Yu Q, Lu C, Li W, Xiang Z, Zhang Z (2009) Annotation and expression of carboxylesterases in the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics* 10:553.

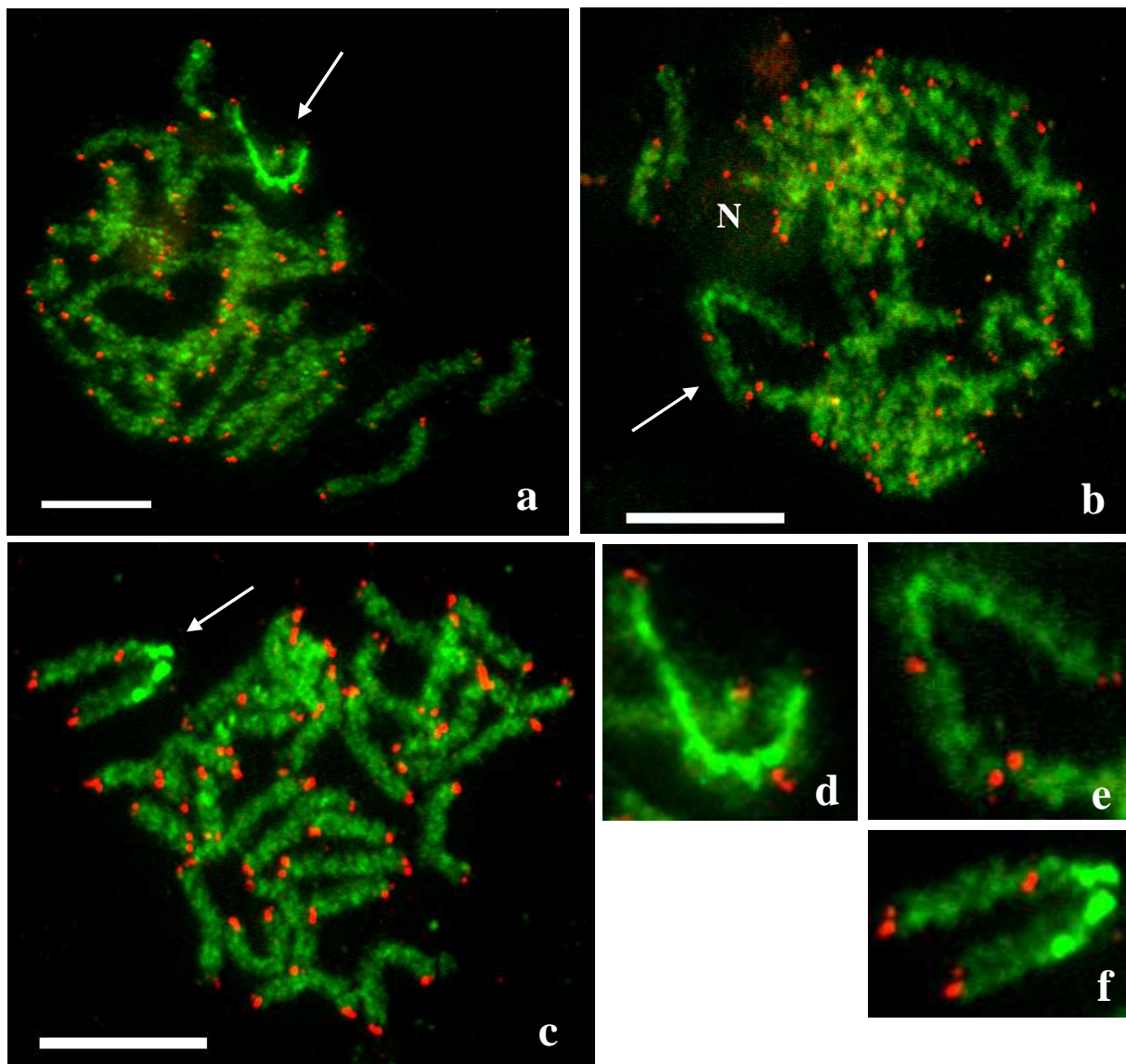
8. Přílohy



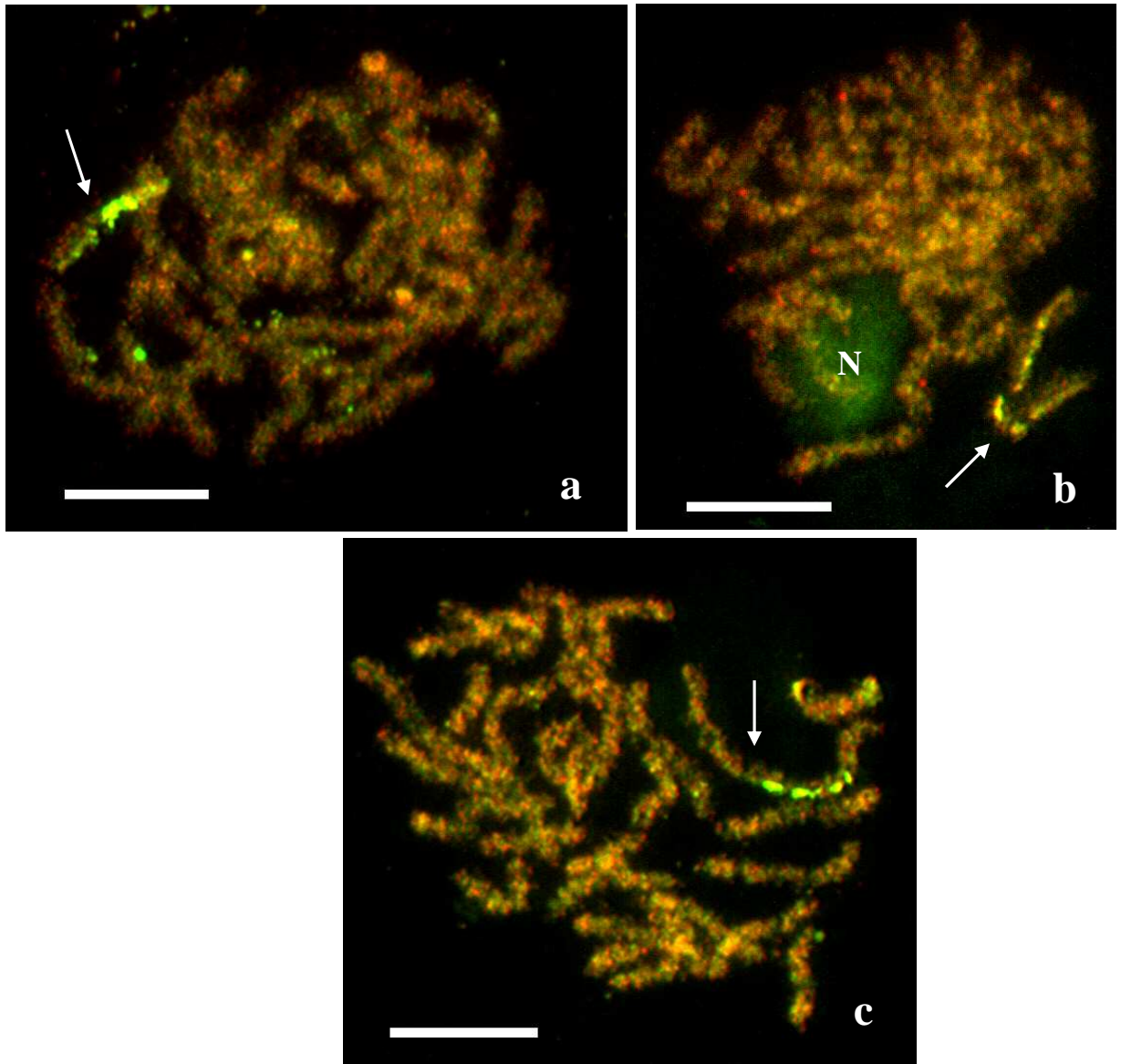
Obrázek 1.: Preparáty mitotických komplementů samic studovaných druhů předivek po barvení DAPI. **a)** Předivka brslenová (*Yponomeuta cagnagellus*), $2n = 61$, měřítko $10 \mu\text{m}$. **b)** Předivka zhoubná (*Y. evonymellus*), $2n = 61$, měřítko $10 \mu\text{m}$. **c)** Předivka ovocná (*Y. padellus*), $2n = 61$, měřítko $20 \mu\text{m}$.



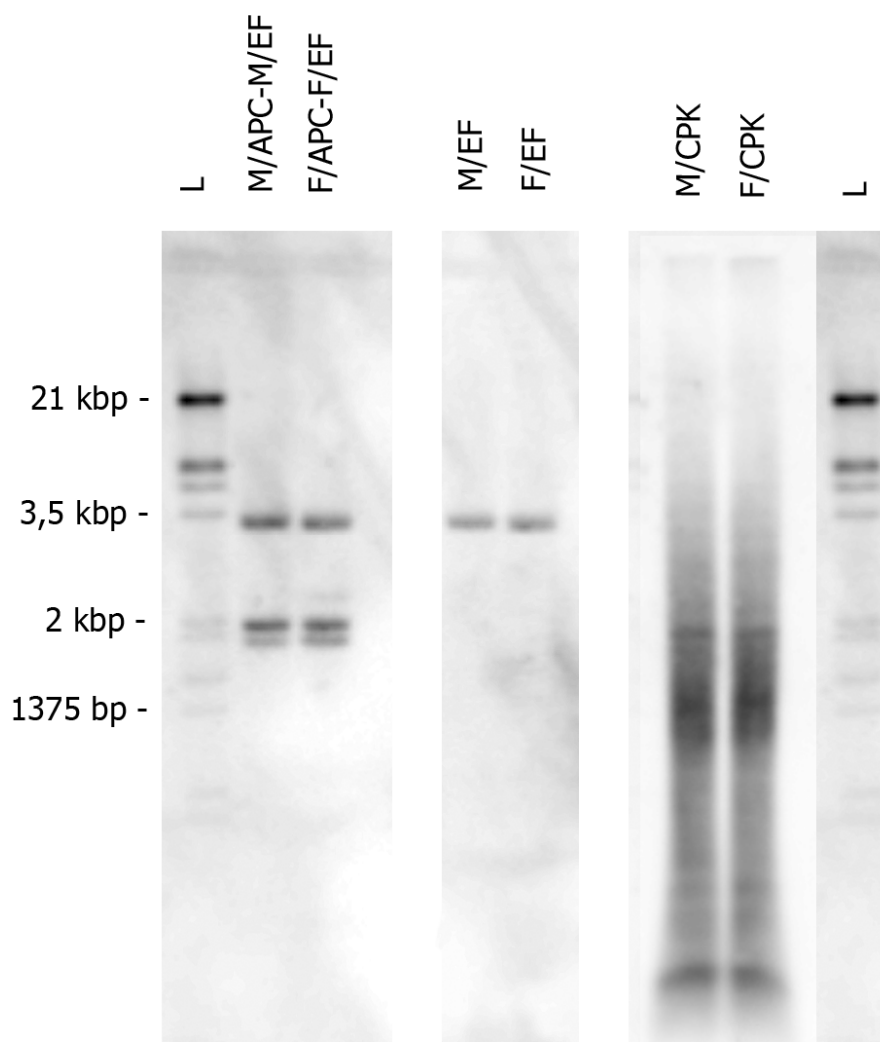
Obrázek 2.: Pachytenní jádra samic předivek po obarvení orceinem. Šipky ukazují na trivalent pohlavních chromosomů, kde je silněji obarvené vlákno chromosomu W. Měřítka 10 μm . **a)** Předivka brslenová (*Y. cagnagellus*). Šipka ukazuje na místo, kde je přerušen heterochromatin na chromosomu W. „N“ označuje jadérko. **b)** Předivka zhoubná (*Y. evonymellus*). **c)** Předivka ovocná (*Y. padellus*).



Obrázek 3.: Preparáty pachytenních chromosomů samic po genomové *in situ* hybridizaci (GISH) kombinované s fluorescenční *in situ* hybridizací s telomerickou sondou (telo-FISH). Celogenomová samičí sonda značená zeleně, hmyzí telomerická sonda značená červeně. Šipky ukazují na pohlavní trivalenty. Měřítka 10 μ m. **a)** Předivka brslenová (*Y. cagnagellus*). **b)** Předivka zhoubná (*Y. evonymellus*). **c)** Předivka ovocná (*Y. padellus*). **d) - f)** Detaily trivalentů z předchozích obrázků (**d = a**; **e = b**; **f = c**).



Obrázek 4.: Preparáty pachytenních chromosomů samic po komparativní genomové hybridizaci (CGH). Samičí celogenomová sonda značená zeleně, samčí celogenomová sonda značená červeně. Šipky ukazují na trivalenty. Měřítka 10 μm . **a)** Předivka brslenová (*Y. cagnagellus*). **b)** Předivka zhoubná (*Y. evonymellus*). „N“ označuje jádérko. **c)** Předivka ovocná (*Y. padellus*).



Obrázek 5.: Membrány po Southernově hybridizaci gDNA předivky zhoubné s genovými sondami. „L“ je velikostní digoxigeninem značený marker. „M/APC-M/EF“ je sonda z genu *APC* (2kbp) a sonda z referenčního genu *EF* (3,5 kbp), které byly současně hybridizovány se štěpenou samčí gDNA. „F/APC-F/EF“ je sonda z genu *APC* (2kbp) a sonda z referenčního genu *EF* (3,5 kbp), které byly současně hybridizovány se štěpenou samičí gDNA. „M/EF“ je sonda z referenčního genu *EF* hybridizovaná se štěpenou samčí gDNA. „F/EF“ je sonda z referenčního genu *EF* hybridizovaná se štěpenou samičí gDNA. „M/CPK“ je sonda z genu *CPK* hybridizovaná se štěpenou samčí gDNA. „F/CPK“ je sonda z genu *CPK* hybridizovaná se štěpenou samičí gDNA. Sondy z genu *CPK* byly hybridizovány na odmyté membráně s původní sondou z genu *APC*.