

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



**Aberantní výskyt heterochromatinu u zavíječe
moučného, *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera)**

Bakalářská práce

Anna Voleníková

Školitel: prof. RNDr. František Marec, CSc.
Školitel specialista: Mgr. Martina Dalíková

České Budějovice 2012

Voleníková, A., 2012: Aberantní výskyt heterochromatinu u zavíječe moučného *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). [The occurrence of an aberrant heterochromatine in the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). Bc. Thesis, in Czech.] – 43 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

In the present study, the occurrence of B-chromosomes in wild strain of the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* is reported. The origin and composition of these chromosomes were studied by means of fluorescence *in situ* hybridization (FISH), genomic *in situ* hybridization (GISH), molecular cloning and other methods of molecular cytogenetics. A comparative analysis was performed to study the effect of supernumerary chromosomes on the reproductive capacity of *E. kuehniella*.

Finanční podpora:

Práce byla financována z grantu Grantové agentury AV ČR (GAAV) reg.č. IAA 600960925.

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, 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, 14.12.2012.

.....
Anna Voleníková

Poděkování:

Touto cestou bych ráda v první řadě poděkovala svému školiteli Františku Marecovi za přijetí do laboratoře a zadání zajímavého tématu, na kterém jsem se mnohé naučila. Dále své školitelce specialistece Martině Dalíkové za nekonečnou trpělivost, vlídný přístup i v dobách nelehkých a především za to, že mi byla po celou dobu mé práce velkým pracovním i osobním vzorem. Mé poděkování dále patří Marušce Korchové za náročnou péči o chov zavíječů, Svatavě Kubíčkové za pomoc s laserovou mikrodisekcí, celému kolektivu naší laboratoře za cenné rady a přátelskou atmosféru, mým přátelům Páje, Aničce, Marušce, Ivet, Jitce, Janičce, Paule, Martinovi, Danovi a mnohým dalším za rozptýlení a odreagování, Ondrovi za to že mi byl a stále je oporou a v neposlední řadě také mé rodině, za podporu duševní i finanční a nezlomnou důvěru v mé schopnosti.

OBSAH:

1. Úvod	1
1.1 Evoluce a původ B-chromosomů	1
1.2 Schopnost “drive”	2
1.3 „Životní” cyklus B-chromosomů	3
1.4 Vliv na hostitele a jeho genom	5
1.5 Obrana hostitelského genomu.....	6
1.6 Frekvence, struktura a obsah B-chromosomů	7
1.7 Nadbytečné chromosomy u řádu Lepidoptera	8
2. Cíle práce	11
3. Materiál a metody	12
3.1 Použitý hmyz	12
3.2 Založení a udržení jednopárových linií s výskytem B-chromosomů	12
3.3 Příprava preparátů	13
3.3.1 Příprava preparátů z Malpighiho trubic	13
3.3.2 Příprava preparátů pro <i>in situ</i> hybridizaci	13
3.3.3 Příprava preparátů pro laserovou mikrodisekci	14
3.4 Laserová mikrodisekce	14
3.5 Amplifikace vyřezané DNA	14
3.6 Příprava sond pro fluorescenční <i>in situ</i> hybridizaci (FISH)	15
3.6.1 Příprava B-specifické sondy	15
3.6.2 Příprava telomerické sondy	15
3.6.3 Příprava W-specifické sondy	15
3.6.4 Příprava sondy pro genomovou <i>in situ</i> hybridizaci (GISH)	16
3.6.5 Příprava nepřímo značené rDNA sondy	16
3.7 Hybridizace <i>in situ</i>	16
3.7.1 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace s přímo značenými sondami	16
3.7.2 Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace s nepřímo značenými sondami	18
3.7.3 Genomová <i>in situ</i> hybridizace (GISH)	20
3.8 Southern blot	20
3.9 Získání B-specifických sekvencí	20
3.9.1 Klonování	20
3.9.2 Ověření původu insertů	21

3.9.3 Sekvenování	23
3.10 Srovnání reprodukčních schopností zavíječů linie WT-C02-B a kmene WT-C..	23
4. Výsledky	24
4.1 Jednopárové linie a jejich udržení	24
4.2 Charakterizace a původ B-chromosomů	24
4.3 Získání B-specifických sekvencí	26
4.4 Analýza možných fyziologických důsledků přítomnosti B-chromosomů	26
5. Diskuze	28
5.1 Stanovení přítomnosti a počtu B-chromosomů	28
5.2 Pátrání po původu B-chromosomů	28
5.3 Molekulární složení B-chromosomů	31
5.4 Vliv přítomnosti B-chromosomů na reprodukční schopnosti linie WT-C02-B	31
6. Souhrn	32
7. Literatura	33
8. Přílohy	39

1. Úvod

1.1 Evoluce a původ B-chromosomů

Nadbytečné neboli B-chromosomy jsou chromosomy, které nepatří do standardního karyotypu, ale jsou přesto přítomné v mnoha genomech eukaryotních organismů. Pojem B-chromosomy označuje velmi různorodou skupinu chromosomů, ať už se na ně díváme z jakéhokoliv pohledu, některé vlastnosti jsou pro ně však charakteristické (Jones 1991, Camacho a kol. 2000, Hurst a Werren 2001, Camacho 2005):

- (1) Nejsou esenciální pro funkci hostitelského organismu, jejich výskyt je specifický pro konkrétní populace, jedince i tkáň. V rámci jedince, stejně jako v rámci populace, mají sklony k akumulaci.
- (2) Pochází z chromosomů původního genomu, ale jsou od nich morfologicky i strukturálně odlišné a nedochází mezi nimi ke vzájemné rekombinaci.
- (3) Nepodléhají Mendelovým zákonům dědičnosti. Jsou samostatné a uplatňují se pro ně vlastní pravidla, ovlivněná především mechanismy tzv. “evolutionary drive” (evoluční upřednostnění) a jejich mitotickou a meiotickou nestabilitou - často bývají označovány jako tzv. “selfish” (sobecké) genetické elementy.

Jak bylo řečeno výše, původní teorie vzniku nadbytečných chromosomů uvádí B-chromosomy jako deriváty chromosomů základní sádky genomu (tzv. A-chromosomů), z nichž došlo ke genezi nadbytečných chromosomů různými způsoby. Nejjednodušším vysvětlením je vznik B-chromosomů jako vedlejších produktů evoluce základního karyotypu (Camacho a kol. 2000). Zdrojem potenciálních nadbytečných chromosomů může být například aneuploidie, kdy se vzniklá extra kopie některého chromosomu může později stát B-chromosomem; případně chromosomální aberace typu Robertsonovské translokace, kdy fúzí dvou akrocentrických chromosomů v jeden metacentrický dochází ke vzniku malých centrických fragmentů s potenciálem stát se B-chromosomy, a další. Takové fragmenty, které získají schopnost evolučního “drive”, jsou obecně nazývány jako tzv. neo-Bs, neboť aby se staly skutečnými B-chromosomy, musí nejprve podstoupit rapidní strukturní modifikace. Mechanismem jejich vzniku je dána sekvenční shodnost a strukturní homologie s A-chromosomy, která vede k tendencím k párování a rekombinaci s A-chromosomy. B-chromosomy jsou však charakteristické svou nezávislostí na genomu nositele, neo-Bs tedy musí nejprve projít procesem diferenciací, který je od A-chromosomů definitivně izoluje. Během tohoto procesu se uplatňují především evoluční mechanismy jako je hromadění

mutací procesem Mullerovy rohatky, akumulace repetitivních sekvencí a mobilních elementů a následná rychlá heterochromatinizace chromosomu (Camacho a kol. 2000, Camacho 2005). Způsob, jakým se neo-Bs stávají B-chromosomy, je zatím jednou z nejméně objasněných kapitol výzkumu nadbytečných chromosomů.

V některých případech může být vznik B-chromosomů svázán s určitými specifickými oblastmi na A-chromosomech, jako jsou například centromerické a paracentromerické oblasti (např. Alfenito a Birchler 1993, Mc Quade a kol. 1994, Matsubara a kol. 2008), oblasti telomer (např. Silva a Yonenaga-Yassuda 1998, Qi a kol. 2002) nebo rDNA lokusů (např. Dhar a kol. 2002, Szcerbal a Switonski 2003), není ale jednoznačně spojován s konkrétními chromosomy. Vznik B-chromosomů je obecně velmi individuální záležitostí, která vykazuje jen málo generalizovatelných rysů. Speciální a diskutovanou kapitolou je však původ B-chromosomů z pohlavních chromosomů a jejich vzájemný vztah. Nápadná je totiž jejich podobnost, ať už z hlediska meiotického chování, morfologie nebo struktury. V obou případech též působí stejné molekulárně evoluční procesy, jako jsou degenerace a inaktivace chromosomů (Green 1990). Pravděpodobný vznik B-chromosomů z pohlavních chromosomů byl pozorován u různých typů určení pohlaví. Známa je geneze různorodými způsoby z chromosomu X (např. López-León a kol. 1994), z chromosomu Y (např. Amos a Dover 1981) i z chromosomu W (např. Sharbel 1998).

Pozdější cytologické a molekulární studie ale prokázaly, že ne vždy B-chromosomy pocházejí z genomu hostitelského organismu – mohou mít i cizorodý původ. K jejich spontánnímu vzniku dochází například při mezidruhovém křížení, kdy se mísí dva odlišné genetické materiály. Ačkoliv se může jednat o druhy velmi blízce příbuzné, díky potenciálním drobným rozdílům například ve stabilitě genetického materiálu v buněčném prostředí jiného druhu může docházet k častějším fragmentacím, a tedy i ke vzniku nadbytečných chromosomů (Perfectti a Werren 2001).

1.2 Schopnost “drive”

Nejvýznamnější silou, která pomáhá nadbytečným chromosomům udržet se v genomu hostitele je bezpochyby jejich schopnost evolučního “drive”, tedy segregace ve vlastní prospěch, nepodléhající Mendelovým zákonům dědičnosti. Mechanismů této schopnosti, kterou B-chromosomy využívají je několik typů, které lze obecně rozlišit podle toho, v jaké fázi vývoje k jejímu uplatnění dojde.

Drive můžeme pozorovat už v průběhu embryogeneze, kdy během mitózy dochází díky nondisjunkci k hromadění B-chromosomů v buňkách zárodečné linie, jako je tomu

například u zástupce řádu Orthoptera, saranče *Locusta migratoria* (Kayano 1971). Nadbytečné chromosomy se tedy v pohlavních buňkách akumulují ještě před meiózou, což má za následek zvýšení jejich počtu plošně ve všech vytvořených gametách.

Druhým typem je tzv. meiotický drive, kdy během meiózy, do níž se všechny buňky dostaly s nezměněným počtem B-chromosomů, dojde při dělení k přednostnímu přechodu B-chromosomů do těch buněk, které se skutečně stanou gametami. Tento typ drive je typický zejména pro samičí pohlaví, kdy meiózou dochází ke vzniku dvou až tří pólových buněk, které zanikají a pouze jediného oocytu. B-chromosomy v tomto případě dokáží využít asymetrie během dělení buňky a cíleně se dostat do té části buňky, z níž pólová buňka nevzniká. Tento jev byl podrobněji studován například u dalšího zástupce řádu Orthoptera, druhu *Myrmeleotettix maculatus*, kdy distribuce B-chromosomů závisela na asymetrii dělicího vřeténka v primárních oocytech (Hewitt 1976). Meiotický drive se však dá pozorovat i u samčího pohlaví – nejznámějším případem jsou jedinci červce druhu *Pseudococcus affinis* (Hemiptera), u nichž byl tento jev pozorován u obou pohlaví. Během meiózy ve spermatogoniích *P. affinis* dochází po crossing-overu k heterochromatinizaci a následně ztrátě celé paternální sádky chromosomů. Nadbytečné chromosomy, které jsou ze své podstaty heterochromatinové, v tomto případě dokáží dekonenzovat a stát se po omezenou dobu dokonce ještě méně kondenzovanými než chromosomy maternální sádky tvořené euchromatinem, což jim umožní s nimi přejít do gamet (Nur 1962). Speciálním případem drive, který také probíhá během meiózy, je drive centromerický. Teorie toho typu drive poukazuje na existenci rozdílné schopnosti pólů buňky vázat centromery, což má pro genom důležitý význam například při segregaci struktur, vzniklých chromosomálními aberacemi. Pokud ten pól buňky, ze kterého vznikne později oocyt, má schopnost vázat více centromer než pól opačný, dostávají se B-chromosomy přednostně do vaječné buňky (De Villena a Sapienza 2001).

Posledním typem drive, určeným fází vývoje v níž probíhá, je drive postmeiotický. Dochází k němu v průběhu mitózy, následující bezprostředně po meiotickém dělení a je typický pro rostliny. Odehrává se v pylových zrnech, v momentě dělení jádra na vegetativní a generativní. Nadbytečné chromosomy dokáží v tomto případě cíleně přecházet do generativního jádra, které je předurčeno k oplození (Jones 1991).

1.3 „Životní“ cyklus B-chromosomů

Intenzivní schopnost drive je typická především pro prvotní fázi invaze B-chromosomů do genomu hostitele a těsně poté. Toto období trvá většinou pouze desítky

generací a je charakteristické rapidním nárůstem počtu B-chromosomů, které může vést až k efektům škodlivým pro hostitele. V této fázi většinou nastává odezva hostitelského genomu, která například prostřednictvím suprese drive vede ke snížení a stabilizaci počtu B-chromosomů, přičemž frekvence jejich přenosu postupně klesá až k hodnotám blízkým běžné Mendelovské dědičnosti. Nadbytečné chromosomy, které ztratily schopnost drive, bývají označovány jako neutralizované. V následujícím období, trvajícím řádově desítky až stovky generací se B-chromosomy stávají výrazně závislé na genetickém driftu, díky němuž může v horizontu tisíců generací dojít i k jejich vymizení z genomu hostitele (Camacho a kol. 1997, Camacho 2005) .

Vytracení z genomu však není jediným osudem, který může nadbytečné chromosomy potkat. Díky vysoké frekvenci mutací, které na nich probíhají, mohou například již neutralizované B-chromosomy znovu získat schopnost drive a opětovně přejít do fáze intenzivní invaze, což je označováno jako regenerace. Původní neutralizované B-chromosomy jsou novou formou schopnou drive postupně vytlačeny a spontánně zanikají, jak bylo pozorováno například u saranče *Eyprepocnemis plorans* (Orthoptera), kde byl tento jev dokonce pozorován opakovaně v divokých populacích (Henriques-Gil a Arana 1990, Zurita a kol. 1998). Mutacemi mohou nadbytečné chromosomy ale tuto schopnost i ztrácet.

Dalším možným osudem B-chromosomů je jejich integrace do genomu hostitele, nadbytečné chromosomy nebo jejich části se tak mohou stát jeho nedílnou součástí. Tento jev je možný několika mechanismy. Jedním z nich je translokace části B-chromosomu na chromosom základní sádky genomu, a to kupříkladu prostřednictvím transpozonů nebo pomocí tzv. “A-B interchanges”, které byly podrobně popsány v práci Bakkali a kol. (2003). Nadbytečné chromosomy mohou persistovat v genomu i získáním schopnosti běžné segregace, kdy sice ztratí drive, ale stávají se stabilní součástí základních chromosomů, jak bylo pozorováno například u zástupce řádu Hymenoptera, druhu *Trypoxylon albitarse* (Araújo a kol. 2001, Rocha-Sanchez a Pompolo 2004), kde došlo k trvalému snížení počtu B-chromosomů na jeden v haploidním genomu. Posledním, ale neméně významným způsobem, který dovoluje nadbytečným chromosomům integraci do hostitelského genomu, je nabytí mitotické a meiotické stability získáním partnera, se kterým se dokáží během buněčného dělení párovat. V tomto případě je ideálním kandidátem například soliterní chromosom X u organismů s určením pohlaví XX/X0 a podobných. Zásadním příkladem tohoto procesu je původ chromosomu Y u samců rodu *Drosophila* (Diptera), který se ukázal jako pravděpodobně pocházející z B-chromosomu (např. Carvalho a kol. 2009).

1.4 Vliv na hostitele a jeho genom

Je obecně známým faktem, že přítomnost B-chromosomů ve vysokých počtech má často na hostitele negativní účinky (Jones 1995), a to zejména v podobě snížení fertility, které bylo popsáno v mnoha případech rostlin i živočichů (např. Cebria a kol. 1994, Kumar a Singh 2004, Bakkali a kol. 2010). Výsledná fertilita bývá snížena individuálně v různých částech reprodukčního cyklu a často klesá úměrně se zvyšujícím se počtem nesených nadbytečných chromosomů. Kromě snížené plodnosti mohou B-chromosomy ovlivňovat například i délku vývojového cyklu, jak bylo pozorováno mimo jiné i u zástupce řádu Homoptera, červce *Pseudococcus obscurus* (Nur 1966). Vývojový cyklus bývá zpomalen zejména v případech, kdy nadbytečné chromosomy představují výrazné zvětšení genetického materiálu v buňce, což vede k prodloužení doby replikace. Negativních efektů B-chromosomů na svého hostitele bylo popsáno velké množství, stejně jako většina aspektů s nimi spojených jsou však velmi individuální záležitostí a je těžké pro ně najít rysy, které by bylo možné zobecnit.

Vliv B-chromosomů na svého hostitele však není pouze jednoznačně negativní - byly popsány i případy, kdy přítomnost nadbytečných chromosomů dokonce fitness jedince přímo zvyšovala. Ačkoliv jsou ve většině případů B-chromosomy tvořeny převážně heterochromatinem, stále jsou genetickým elementem schopným nést vlohy, které mohou být i výhodné. Tak je tomu například u houby *Nectria haematococca* (Hypocreales) a ovsa *Avena sativa* (Poales), u nichž jsou nadbytečné chromosomy nositeli odlišných druhů resistencí. U česneku *Allium schoenoprasum* (Asparagales) přítomnost B-chromosomů vede ke zvýšení životaschopnosti v raných fázích vývoje (Dherawattana a Sadanaga 1973, Miao a kol. 1991, Plowman a Bougourd 1994). Přítomnost výhodné vlohy na nadbytečném chromosomu navíc zásadně snižuje selekční tlak, který je na něj vyvíjen. Jako další z pozitivních efektů B-chromosomů lze označit i fakt, že jako rozsáhlé heterochromatinové oblasti jsou upřednostňovány transpozony (např. Dimitri a kol. 2005), což vede k přímému snížení transpozic na A-chromosomy, kde by mohlo tímto způsobem dojít k poškození důležitého genu. V případě nadbytečných chromosomů vzniklých mezidruhovým křížením představují B-chromosomy také možnost zvýšení variability v genomu, neboť vnášejí nový genetický materiál.

Dalším fenoménem, taktéž asociovaným s přítomností nadbytečných chromosomů je modifikovaná frekvence chiasmát v hostitelském genomu. Ačkoliv byla pozorována i snížená nebo nezměněná četnost crossing-overů, v drtivé většině případů se však jednalo o frekvenci zvýšenou, což bývá nejčastěji vysvětlováno jako adaptivní odpověď na biotický

stres, který je přítomností B-chromosomů vyvolán (Bell a Burt 1990). Zvýšením frekvence rekombinace genom zvyšuje svou variabilitu a tím i schopnost adaptace. Bylo prokázáno, že čím větší schopnost drive mají nadbytečné chromosomy, tím častěji ke vzniku chiasmat dochází (Camacho a kol. 2002). Na základě teorie tzv. “odd-even effect”, je mimo jiné také rozhodující, zda je v buňce nesen sudý nebo lichý počet B-chromosomů. V případě lichých čísel je poté frekvence chiasmat vyšší (Jones 1995).

Jiným významným efektem nadbytečných chromosomů na hostitelský genom je bezesporu ovlivnění exprese genů na A-chromosomech, které bylo popsáno opakovaně. Vliv B-chromosomů na expresi genů byl pozorován u různých druhů živočichů i rostlin a různorodých genů, jako jsou například geny organizátoru jádérka, geny kódující proteiny endospermu, esterázu a další. Vliv B-chromosomů na expresi bývá nejčastěji způsoben translokací části A-chromosomu na nadbytečný chromosom, který tímto způsobem může získat buď gen samotný nebo např. jeho represor, čímž se stane v regulaci podstatným (Oliver 1982, Cabrero a kol. 1987, Plowman a Bougourd 1994).

Pozorovaným, avšak v porovnání s předchozími spíše výjimečným jevem je dále změna vnějšího fenotypu, indukovaná přítomností B-chromosomů. Tento úkaz byl pozorován jak u zástupců rostlinné, tak i živočišné říše. Jako příklady lze uvést změnu barevné struktury listů kukuřice *Zea mays* (Poaceae) (Staub 1987), případně redukci tělní velikosti u jedinců druhu *Metagagrella tenuipes* (Arachnida: Opiliones), u nichž dokonce tato veličina souvisela i s výskytem sudého či lichého počtu B-chromosomů (Gorlov a Tsurusaki 2000).

1.5 Obrana hostitelského genomu

Vzájemné interakce, probíhající mezi nadbytečnými chromosomy a hostitelskými genomy mají dynamickou strukturu, která se neustále mění. Na základní úrovni se jedná v podstatě o boj nadbytečných chromosomů o vlastní přežití a místo v genomu. Zde je zřejmá analogie s klasickými parazity a stejně jako v případě organismu, bránícímu se napadení parazitů, dochází i zde k obranným reakcím genomu.

Hlavní zbraní genomu v tomto případě je schopnost suprimovat drive, čímž je možné invazi B-chromosomů potlačit a neutralizovat je. Schopnost kontrolovat míru přenosu nadbytečných chromosomů byla pozorována opakovaně (např. Bougourd a Plowman 1996, Herrera a kol. 1996, Jimenez a kol. 1997) a je běžným jevem, doprovázejícím výskyt nadbytečných chromosomů. Geny, odpovědné za supresi jsou v drtivé většině případů lokalizovány na chromosomech základní sádky genomu, jako je tomu například v populacích

kukuřice *Zea mays* ssp. *mays* (Chiavarino a kol. 1998) a mnohých dalších; bylo však překvapivě zjištěno, že se mohou vyskytovat i na B-chromosomech samotných, a to kupříkladu u žita *Secale cereale* (Triticae) (Puertas a kol. 1998).

Hostitelské genomy se liší i různou mírou schopnosti nadbytečné chromosomy tolerovat, která se pohybuje na široké škále od totální intolerance, kdy s přítomností a počtem B-chromosomů fitness hostitele úměrně klesá, až po úplnou toleranci, při níž genom není vůbec ovlivněn. Speciálním případem je tzv. “overtolerance”, kdy je přítomností nadbytečných chromosomů hostitelská fitness dokonce zvýšena. Nejčastějším stavem je však neúplná tolerance, kdy při nízkých stavech B-chromosomů k výraznému vlivu na hostitele nedochází a při zvýšení jejich počtu je vliv na fitness negativní (Camacho 2005).

1.6 Frekvence, struktura a obsah B-chromosomů

Jak bylo ukázáno v minulých kapitolách, vlastnosti nadbytečných chromosomů jako takové jsou velmi individuální pro každý jednotlivý případ a je obtížné mezi nimi najít společné rysy, které by byly všeobecně platné pro všechny, nebo alespoň s jistotou pro většinu.

Obecně se předpokládá, že nadbytečné chromosomy jsou v rámci eukaryot široce rozšířené a jejich přítomnost byla dosud prokázána u více než 2000 druhů napříč všemi hlavními taxonomickými skupinami (Camacho 2005). Dostupné informace o rozšíření B-chromosomů jsou však velmi zkreslené různou intenzitou genetického výzkumu u konkrétních druhů nebo skupin, díky čemuž není téměř možné skutečnou frekvenci nadbytečných chromosomů u eukaryot odhadnout.

Četnost výskytu nadbytečných chromosomů u konkrétních skupin organismů je už z důvodu způsobu jejich vzniku velmi různorodá a specifická pro dané populace, jedince i tkáň. I přes to zde však byly pozorovány některé souvislosti mezi výskytem B-chromosomů a dalšími vnitřními i vnějšími faktory. Na základě hypotézy, že větší genom poskytuje více možností pro vznik nadbytečných chromosomů a zároveň zde působí nižší selekční tlak, byla například sledována korelace mezi počtem B-chromosomů a velikostí genomu, nicméně nebyly prokázány žádné jednoznačné výsledky – na různých skupinách organismů byla pozorována jak korelace pozitivní, negativní, tak i žádná. Pozitivní korelace přítomnosti B-chromosomů s velikostí hostitelského genomu byla prokázána například u krytosemenných rostlin, kde byla zároveň prokázána negativní korelace s počtem chromosomů. U savců naopak žádná vzájemná souvislost výskytu a počtu nadbytečných chromosomů s velikostí genomu ani počtem chromosomů prokázána nebyla, ale byla zde pozorována vyšší

pravděpodobnost vzniku B-chromosomů v genomech s větším množstvím akrocentrických chromosomů (Palestis a kol. 2004). Pozitivní vliv na přítomnost a počet nadbytečných chromosomů dále měla také míra příznivosti podmínek prostředí. Tento fenomén byl popsán např. u saranče *Eyprepocnemis plorans* (Orthoptera), kdy byla u těch populací, které žily v příznivém prostředí pozorována vyšší tolerance vůči B-chromosomům (Henriques-Gil a kol. 1984).

Velmi variabilní je nejen výskyt a počet B-chromosomů, ale i jejich vlastní obsah a struktura. Jak bylo řečeno v první kapitole, geneze B-chromosomů může být spojena s určitými konkrétními regiony na chromosomech základní sádky genomu, čemuž následně odpovídá i obsah B-chromosomálních sekvencí. Opakovaně byl na nadbytečných chromosomech pozorován výskyt telomerických repetitivních sekvencí, rDNA klastrů, DNA pocházející z centromerických oblastí, sekvencí shodných s pohlavními chromosomy a dalších (viz kap. 1.1). Fragment, původem z některé ze zmíněných oblastí, může však dále kumulovat repetitivní DNA z A-chromosomů a díky strukturním modifikacím a rychlé heterochromatinizaci se stává vhodným cílovým místem pro mobilní elementy, což prohlubuje nejen stupeň jeho degenerace, ale zároveň na něm také umožňuje výskyt téměř jakýchkoliv sekvencí (Dimitri a kol. 2005).

Většina B-chromosomů je tedy z výše popsaných důvodů heterochromatinové povahy s majoritním obsahem repetitivních sekvencí různého druhu a transkripčně inaktivní. Jsou však známy i případy, kdy mohou obsahovat i euchromatinové oblasti a nést geny, případně v určitých fázích buněčného cyklu z heterochromatinového stavu dekondenzovat. V extrémních případech mohou být i zcela tvořené euchromatinem a být transkripčně aktivní (Nur 1962, Pearse a Ehrlich 1979, Tanić a kol. 2005).

1.7 Nadbytečné chromosomy u řádu Lepidoptera

V rámci řádu Lepidoptera byly B-chromosomy popsány u více než 20 druhů (Camacho 2005). Důležitým evolučním mechanismem, který se v genomech motýlů uplatňuje, je fragmentace chromosomů, čímž může docházet ke vzniku úlomků s potenciálem stát se B-chromosomy. Pro chromosomy motýlů je navíc typické holokinetické uspořádání chromosomů, které zároveň takovým fragmentům dovolí segregovat s ostatními chromosomy genomu (Robinson 1971; Pearse a Ehrlich 1979; White 1973, citováno v Mohanty a Nayak 1983). Ačkoliv se takový genom jeví jako ideální pro vznik B-chromosomů, počet popsaných případů výskytu nadbytečných chromosomů u skupiny Lepidoptera je relativně nízký a i v rámci řádu jsou tyto případy vzájemně nepříliš podobné.

Například u hnědáška *Euphydryas colon* (Nymphalidae) byl popsán výskyt 1-6 B-chromosomů, které byly menší než chromosomy základní sádky genomu a jejich počet se lišil i v rámci buněk jediného jedince. Zároveň bylo zjištěno, že tyto chromosomy jsou tvořené z části heterochromatinem i euchromatinem a pokud se jich v jádře vyskytovalo větší množství, měly sklony fúzovat a vytvářet větší struktury. U jedinců, kteří B-chromosomy nesli, byla také prokázána zvýšená produkce abnormálních spermatid, která byla tím vyšší, čím větší počet B-chromosomů daný jedinec nesl (Pearse a Ehrlich 1979).

Naproti tomu, u martináče *Antheraea roylei* (Saturniidae) byly nadbytečné chromosomy pozorovány pouze v maximálním počtu 1 B-chromosom na jádro, všechny měly téměř stejnou strukturu a žádné negativní efekty na hostitele pozorovány nebyly (Putturaju a Nagaraju 1985).

Větší množství B-chromosomů bylo dále popsáno např. u světloπάsky *Tarache tropica* (Noctuidae), kde bylo v divokých populacích pozorováno u vybraných jedinců 1-7 B-chromosomů na jádro, přičemž jejich počet se opět lišil i v rámci buněk jediného jedince, stejně jako u *Euphydryas colon*. B-chromosomy byly také v tomto případě výrazně menší než A-chromosomy a během meiózy tvořily univalenty. Autoři práce výskyt těchto chromosomů vysvětlují jako důsledek mezidruhových křížení v přírodních populacích, přičemž pozorované univalenty by mohly být nehomologními nespárovanými chromosomy (Mohanty a Nayak 1983).

Důvod vzniku nadbytečných chromosomů v přírodních populacích byl vysvětlován také jako dopad chemických látek, používaných v zemědělství. Tyto látky mohou vyvolávat metabolické poruchy, které mohou vzniku nadbytečných chromosomů napomáhat (White 1977, citováno v Padhy a Nayak 1982). B-chromosomy však byly pozorovány i v populacích chovaných v laboratorních podmínkách, jako tomu bylo například u dalšího zástupce čeledi Saturniidae, martináče *Philosamia riccini*, kde byly pozorovány B-chromosomy v počtech 1-4 na jádro, přičemž pokud se vyskytovaly v sudém počtu, formovaly během meiózy bivalenty (Padhy a Nayak 1982). Podobně i v laboratorním chovu štetconoše *Orgyia antiqua* byly zjištěny 1-2 B-chromosomy u všech cytogeneticky zkoumaných samic. Tyto B-chromosomy měli na obou koncích zachovanou telomerickou sekvenci (TTAGG)_n (Rego a Marec 2003).

Zajímavým případem přítomnosti B-chromosomů u dvou blízce příbuzných druhů jsou populace bělásků *Pieris rapae* a *Pieris napi* (Pieridae), u nichž byly nadbytečné chromosomy odhaleny náhodně při ověřování počtu chromosomů jejich karyotypu. U druhu *Pieris rapae* se u některých jedinců vyskytoval velký B-chromosom, který byl zpravidla

větší než nejmenší A-chromosomy a zároveň po většinu času i méně kondenzovaný než ony, což je velmi netypické. Tento nadbytečný chromosom se vyskytoval u přibližně 50% zkoumaných jedinců a v meióze tvořil univalent. Naproti tomu, u blízce příbuzného druhu *Pieris napi* byly pozorovány dva zcela odlišné typy B-chromosomů, oba velmi malé a kondenzované stejnou mírou jako ostatní chromosomy, přičemž při meióze tvořily bivalenty a jejich počet a přítomnost se lišily i v rámci buněk jediného jedince (Bigger 1976).

B-chromosomy byly popsány u řádu Lepidoptera i v množství dalších případů, nicméně poslední uvedený příklad dostatečně demonstruje fakt, že v případě tohoto fenoménu závisí primárně na místě a způsobu vzniku konkrétního případu nadbytečných chromosomů a na dalších faktorech (odezva hostitelského genomu, případné transpozice atd.), které se uplatňují přímo u nich a nelze pro ně tedy na základě taxonomické příbuznosti jejich nositelů stanovit žádné obecné vlastnosti.

2. Cíle práce

Nadbytečné chromosomy jsou zajímavým fenoménem, pozorovaným napříč širokým spektrem různých druhů živočichů, rostlin i hub. U motýlů (Lepidoptera) byl výskyt B-chromosomů zaznamenán zatím u více než 20 druhů (Camacho 2005), avšak detailnější informace o jejich původu a vlastnostech zcela chybějí. U zavíječe moučného *Ephestia kuehniella* (Pyralidae) jejich výskyt dosud popsán nebyl.

V chovech naší laboratoře byla přítomnost nadbytečných chromosomů poprvé pozorována náhodně na podzim roku 2010 u samců laboratorního kmene WT-C02 (divoký typ) zavíječe moučného, kdy byly B-chromosomy původně chybně považovány za možný aberantní výskyt sex-chromatinu, který je typický pouze pro samice motýlů (Traut a Marec 1996). Důvodem této hypotézy byl fakt, že na preparátech vysoce polyploidních buněk Malpighiho trubic tvořily B-chromosomy heterochromatinové tělísko, téměř identické se sex-chromatinem, který je tvořen mnohonásobnými kopiemi chromosomu W (Traut a Scholz 1978). Tato hypotéza však byla následně vyvrácena fluorescenční *in situ* hybridizací s W-specifickou malovací (“painting”) sondou, která k nadbytečným chromosomům nehybridizovala. Na základě výsledků těchto předběžných pokusů bylo upřesněno téma mé práce. Hlavním cílem práce bylo charakterizovat B-chromosomy kmene WT-C02 zavíječe moučného pomocí metod molekulární genetiky a na základě zjištěných dat formulovat hypotézu o jejich původu. Pro splnění tohoto cíle byly stanoveny následující dílčí cíle.

1. Založení jednopárových linií zavíječů s B-chromosomy, analýza přítomnosti a počtu B-chromosomů metodou roztlakových preparátů Malpighiho trubic v každé generaci.
2. Získání vzorku DNA B-chromosomů laserovou mikrodisekcí a konstrukce malovací sondy specifické pro B-chromosomy.
3. Na základě dat získaných použitím FISH, GISH a dalších metod molekulární genetiky formulace hypotézy o původu B-chromosomů.
4. Ověření možných fyziologických důsledků přítomnosti B-chromosomů na reprodukční schopnosti zavíječů.

3. Materiál a metody

3.1 Použitý hmyz

Všechny experimenty byly prováděny s laboratorními kmeny WT-C a WT-C02 (divoké typy) zavíječe moučného (*Ephestia kuehniella*). Oba tyto kmeny pocházejí přibližně ze stejné lokality, z budov Zátkových mlýnů v Boršově nad Vltavou u Českých Budějovic. Kmen WT-C byl založen ze vzorku populace odchycené v roce 1984 v mlýnech u vesnice Břeží (Marec 1990). Kmen WT-C02 byl založen v roce 2002 ze vzorku populace odchycené v těstárnách v Boršově. Metoda chovu je detailně popsána v práci Marec (1990). Larvy zavíječe obou kmenů byly chovány na potravě skládající se z pšeničného šrotu a pivovarských kvasnic, v místnosti s teplotou 20-22°C a fotoperiodou 12/12 h (den/noc).

3.2 Založení a udržení jednopárových linií s výskytem B-chromosomů

Pro další práci bylo nezbytné nejprve založit jednopárové linie zavíječů s přítomností nadbytečných chromosomů. Všechny linie s B-chromosomy pocházejí z jednoho páru divokého kmene WT-C02 s konstitucí $0B_{\text{♀}}/2B_{\text{♂}}$, založeného 15.10.2010. Přítomnost B-chromosomů byla vždy ověřena na preparátech vysoce polyploidních jader z Malpighiho trubic podle výskytu odpovídajícího heterochromatinového tělíška či tělísek.

Ke kontrole výskytu B-chromosomů bylo třeba provádět analýzu jedinců v každé generaci. Základem bylo založení nových jednopárových linií z předchozích v každé generaci, přičemž při líhnutí nových imág byly z chovu vždy ráno odstraněni všichni jedinci, kteří se zrovna nepáříli a pářící se páry byly přeneseny do samostatných Petriho misek. Líhnutí zavíječů začíná v pozdně odpoledních až večerních hodinách a k páření dochází časných ranních hodinách, přičemž samice se páří pouze jedenkrát za den (F. Marec, ústní sdělení). Tímto postupem bylo zajištěno, že samice z izolovaného páru nebyla již dříve oplodněna jiným samcem. Po naklazení vajíček, vždy čtvrtý až sedmý den po založení páru, byly z obou rodičů připraveny preparáty z Malpighiho trubic a vyšetřeny na přítomnost B-chromosomů. V každé generaci bylo takto analyzováno 30 náhodně vybraných párů. Do další generace byly ponechány pouze snůšky vajíček od těch párů, u kterých byl spolehlivě prokázán výskyt heterochromatinových tělísek aspoň u jednoho pohlaví, nejlépe u samců, neboť přirozený výskyt pravého sex-chromatinu u samic komplikoval jednoznačné prokázání heterochromatinových tělísek pocházejících z B-chromosomů. Následující generace tedy byla tvořena vždy potomky pozitivně analyzovaných párů. Pro linie s nadbytečnými chromosomy bylo zavedeno označení WT-C02-B.

3.3 Příprava preparátů

3.3.1 Příprava preparátů z Malpighiho trubic

Preparáty polyploidních jader Malpighiho trubic jsem připravovala z dospělých jedinců *E. kuehniella* metodou popsanou v práci Traut a kol. (1986). Malpighiho trubice jsem vypitvala ve fyziologickém roztoku pro *Ephestia* (0,9% NaCl, 0,042% KCl, 0,025% CaCl₂, 0,02% NaHCO₃, příprava podle Glaser 1917, citováno v Lockwood 1961) a přenesla do kapky téhož roztoku na podložním skle očištěném 96% etanolem. Poté jsem kapku s vypitvanými trubicemi převrstvila čerstvě připravenou Carnoy fixází (ethanol – chloroform - kyselina octová v poměru 6:3:1) a nechala fixovat 2 minuty. Po uplynutí stanovené doby jsem přebytečnou fixáž důkladně odstranila pomocí filtračního papíru a na trubice nanasla 10 µl kapku 1,5% lakto-aceto-orceinu (LAO, naředěný ze zásobního 2,5% roztoku: 100 ml kyselina octová, 100 ml kyselina mléčná, 5 g orcein), ve které jsem je nechala barvit 3 minuty. Následně jsem trubice přikryla čistým krycím sklíčkem o velikosti 22 x 22 mm, filtračním papírem odsála přebytečný LAO a pozorovala pod světelným mikroskopem.

3.3.2 Příprava preparátů pro *in situ* hybridizaci

Meiotické chromosomální preparáty pro fluorescenční *in situ* hybridizaci jsem připravila tzv. “spreading” technikou na histologické plotýnce (Traut 1976, též Mediouni a kol. 2004). Pro přípravu preparátů jsem použila samčí a samičí larvy *E. kuehniella* ze založených jednopárových linií WT-C02-B. U každého jedince jsem analýzou polyploidních jader buněk Malpighických trubic zároveň zjistila přítomnost B-chromosomů.

Preparáty jsem připravovala z gonád, které jsem vypitvala ve fyziologickém roztoku pro *Ephestia* (viz výše). Ovaria jsem poté přenesla pomocí síťky pro elektronovou mikroskopii do misky s čerstvě připravenou Carnoy fixází (viz výše) a nechala fixovat 15 minut. Potom jsem je přenesla do kapky 60% kyseliny octové (cca 15 µl) na podložní sklo očištěné v kyselém ethanolu (1% HCl v 96% ethanolu) a tkáň macerovala wolframovými jehlami. Bezprostředně po maceraci jsem sklo umístila na histologickou plotýnku, vyhřátou na 45°C a kapku posouvala wolframovými jehlami rovnoměrně v centrální části skla téměř až do jejího úplného odpaření. V případě testes jsem aplikovala stejný postup, pouze po vypitvání byly nejprve přeneseny na 10 minut do hypotonického roztoku (0,075 M KCl), kde byly zároveň pomocí wolframových jehel zbaveny svých obalů. Hotové preparáty jsem odvodnila alkoholovou řadou (70% - 80% - 100% ethanol, po 30 vteřinách), nechala zcela oschnout a do dalšího použití skladovala v -20°C.

Preparáty mitotických chromosomů jsem připravovala stejným způsobem, jako materiál jsem však použila křídelní disky larev a dobu hypotonizace prodloužila na 20 minut.

3.3.3 Příprava preparátů pro laserovou mikrodisekci

Pro laserovou mikrodisekci byla nezbytná příprava preparátů na skla se speciální tzv. PEN (polyethylen-naftalátovou) membránou. Membránu (tloušťka 0,013 mm; Goodfellow, Huntingdon, Anglie) jsem nejprve nastříhala na obdélníky o velikosti 18 x 35 mm, poté jsem si připravila čisté podložní sklo (velikost 75 x 25 mm, tloušťka 0,17 mm, výroba na zakázku firmou MENZEL-GLASER, Braunschweig, Německo) očištěné 100% ethanolem a nanesla na něj kapku ethanolu o objemu 30 μ l. Na ni jsem ihned umístila PEN membránu a uhladila ji opatrně kouskem papíru tak, aby nedošlo k jejímu poškození. Okraje membrány jsem následně zalepila dvěma vrstvami laku na nehty. Skla připravená tímto způsobem jsem do vlastního použití skladovala při teplotě 4°C, nejdéle však 1 týden. Těsně před použitím jsem sklo s PEN membránou sterilizovala 30 minut pod UV světlem ve vzdálenosti větší než 1 m od zářiče, čímž došlo zároveň k redukci hydrofobních vlastností povrchu membrány.

Na přípravu vlastních preparátů jsem použila Malpighiho trubice larev *E. kuehniella* 5. instaru, samčího pohlaví. Tím jsem vyloučila možnost záměny heterochromatinu tvořeného B-chromosomy se sex-chromatinem samic. Preparáty jsem připravila přesně dle protokolu uvedeného v práci Fuková a kol. (2007).

3.4 Laserová mikrodisekce

Mikrodisekce byla provedena pomocí P.A.L.M MicroLaser System (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Mnichov, Německo) s RNDr. Svatavou Kubíčkovou ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně. Laserovým paprskem byl vyřezán dostatečný počet tělísek pro konstrukci B-specifických sond a další využití. Podrobný popis mikrodisekce je uveden v práci Kubíčková a kol. (2002). Vzorčky byly skladovány při teplotě -20°C.

3.5 Amplifikace vyřezané DNA

DNA vzorků získaných laserovou mikrodisekcí byla amplifikována pomocí soupravy GenomePlex[®] Single Cell Whole Genome Amplification Kit (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA), přičemž byl dodržen přesný postup dle protokolu od výrobce. Amplifikovaná DNA byla poté přečištěna purifikační soupravou Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA) dle postupu uvedeného výrobcem.

3.6 Příprava sond pro fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH)

3.6.1 Příprava B-specifické sondy

Pro výrobu sondy byla použita amplifikovaná DNA z vyřezaných B-chromosomů. Sonda byla značena metodou reamplifikace pomocí reamplifikační soupravy GenomePlex[®] WGA Reamplification Kit (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA), a to v rozsahu 1/2 objemu reakce uvedené v protokolu výrobce. Složení reakce o celkovém objemu 37,5 µl bylo následující: 0,5 µl (5 ng) templátu + 1,5 µl dNTP mix (10 mM dGTP, dCTP, dATP; 8,4 mM dTTP) + 1,5 µl 1 mM konjugovaných nukleotidů + 3,75 µl Amplification Master Mix + 2,5 µl WGA DNA Polymerase. Podmínky reakce uvedené v originálním protokolu byly zachovány. Ke značení byly použity následující typy konjugovaných nukleotidů: Orange-dUTP (Abbott Molecular, Abbott Park, USA), FITC-dUTP (Invitrogen, Carlsbad, USA), nebo Cy3-dUTP (GE Healthcare, Milwaukee, USA) a pro přípravu nepřímo značené sondy digoxigenin-11-dUTP (Roche, Mannheim, Německo).

3.6.2 Příprava telomerické sondy

Sonda pro FISH byla značena metodou “nick-translace”, s využitím Nick Translation Kit (Abbott Molecular, Wiesbaden, Německo). Jako templát byla použita neznačená telomerická sonda (TTAGG)_n, kterou jsem získala od RNDr. Magdy Vítkové, PhD. Složení reakce o celkovém objemu 50 µl bylo následující: 1 µg templátu + 10 µl dNTP Mix (0,1 mM) + 5 µl dTTP (0,1 mM) + 2,5 µl Cy3-dUTP (0,2 mM) + 5 µl Nick Translation Buffer (10x koncentrovaný) + 10 µl Nick Translation Enzyme Mix. Reakci jsem nechala probíhat 75 minut při teplotě 15°C a zastavila ji zahřátím směsi na 70°C po dobu 10 minut.

Nepřímo značená telomerická sonda byla vyrobena ze stejného templátu za použití biotin-16-dUTP (Roche) pomocí High Prime Labelling Kit (Roche).

3.6.3 Příprava W-specifické sondy

Sonda specifická pro chromosom W zavíječe moučného byla značena stejným způsobem jako B-specifická sonda (viz 3.6.1), pouze použitým fluorochromem byl Green-dUTP (Abbott Molecular, Abbott Park, USA). Templátem pro reakci byla DNA chromosomů W, vyřezaných laserovou mikrodisekcí a amplifikovaných kitem GenomePlex[®] Single Cell Whole Genome Amplification Kit (Sigma-Aldrich), kterou jsem získala od Mgr. Martiny Dalíkové.

3.6.4 Příprava sondy pro genomovou *in situ* hybridizaci (GISH)

Sondu pro GISH jsem značila fluorochromem Cy3-dUTP pomocí Abbott Nick Translation Kit podle modifikovaného protokolu. Jako templát pro značící reakci jsem použila samičí a samčí celogenomovou DNA bez B-chromosomů, izolovanou z dospělců kmene WT-C standardní fenol-chloroform-izoamylalkoholovou extrakcí podle protokolu, uvedeného v práci Dalíková (2006). Značící reakce o celkovém objemu 75 µl měla následující složení: 1500 ng DNA + 7,5 µl směsi nukleotidů (0,25 mM dATP, dCTP, dGTP; 0,09 mM dTTP; 0,026 mM Cy3-dUTP) + 7,5 µl nick-translačního pufru (10x koncentrovaný, dodaný v kitu) + 15 µl nick-translačního enzymu. Reakce probíhala 12 hodin při teplotě 15°C, a poté byla ukončena zahřátím na 70°C po dobu 10 minut.

3.6.5 Příprava nepřímo značené rDNA sondy

rDNA sonda byla značena biotin-16-dUTP metodou “nick-translace“ pomocí Abbott Nick Translation Kit a reakční směs jsem připravila dle protokolu od výrobce. Do reakce byla jako templát použita neznačená sonda pro 18S rDNA obaleče jablečného (*Cydia pomonella*), kterou jsem získala od RNDr. P. Nguyen (Nguyen a kol. 2010). Reakce byla inkubována 1h při 15°C, a poté zastavena zahřátím na 70°C po dobu 10 minut.

3.7 Hybridizace *in situ*

3.7.1 Fluorescenční *in situ* hybridizace s přímo značenými sondami

Vlastní metodu FISH jsem prováděla podle mírně pozměněného protokolu, uvedeného v práci Fuková a kol. (2007). Používala jsem mitotické a meiotické preparáty samic a samců s B-chromosomy i bez nich.

Některé hybridizace byly prováděny za přítomnosti specifického kompetitora, jímž byla DNA samců zavíječe bez B-chromosomů, izolovaná standardní fenol-chloroform-izoamylalkoholovou metodou podle protokolu z práce Dalíková (2006) a naštěpená ultrasonickým homogenizerem Bandelin Sonoplus HD 2070 (Bandelin, Berlín, Německo).

Preparáty, uskladněné v -20°C, jsem ihned po vyjmutí z mrazícího boxu odvodnila standardní alkoholovou řadou (70% - 80% - 100% ethanol, po 30 vteřinách) a poté nechala důkladně oschnout. Mezitím jsem si připravila hybridizační směs, která na jeden preparát obsahovala 300 ng sondy v případě sond chromosomálně specifických nebo 200 ng sondy telomerické, 25 µg sonikované DNA z lososích spermií (Sigma-Aldrich) a ve vybraných případech i 3 µg specifického kompetitora. Ke směsi jsem poté přidala 0,1 x objem octanu

sodného ($c = 3 \text{ M}$) a 2,5 x objem 100% ethanolu, předem vychlazeného na -20°C . Směs jsem promíchala a umístila na 1 hodinu do -80°C , aby došlo k precipitaci sondy. Po uplynutí stanovené doby jsem hybridizační směs centrifugovala (15 000 rpm, 20 min, 4°C , zrychlení a zpomalení 9), supernatant odebrala mikropipetou a pellet doplnila 200 μl ledového 70% ethanolu. Následovala další centrifugace (15 000 rpm, 15 min, 22°C , zrychlení a zpomalení 9) a velmi důkladné odstranění supernatantu, po kterém byl pellet ponechán v otevřené zkumavce při pokojové teplotě, dokud nedošlo k odpaření reziduálního ethanolu. Oschlý pellet byl následně rozpuštěn ve 100% deionizovaném formamidu (5 μl /preparát), vytemperovaném na 37°C . Aby došlo k úplnému rozpuštění, směs byla za mírného třepání inkubována 30 minut při 37°C .

Během této doby jsem provedla denuraci chromosomálních preparátů. Na každý preparát jsem nanasla 100 μl čerstvě připravené denurační směsi (70% deionizovaný formamid v 2xSSC; 2xSSC: 0,3M NaCl, 0,03 M citrát sodný, $\text{pH}=7,0$) a zakryla ho krycím sklíčkem o velikosti 25 x 50 mm. Preparáty jsem denaturovala inkubací při 68°C po dobu 3 minut 30 vteřin a následně ihned zchladila 1 minutu v 70% ethanolu, předchlazeném na teplotu -20°C . Pokračovala jsem v odvodnění preparátů dokončením alkoholové řady (30 vteřin v 80% a 100% ethanolu) a denaturované preparáty nechala oschnout.

Rozpuštěnou hybridizační směs jsem promíchala, doplnila vytemperovaným (37°C) 20% dextran sulfátem v 4xSSC o objemu 5 μl na preparát, znovu promíchala a za mírného třepání nechala 5 minut denaturovat při 90°C . Poté jsem směs rychle zchladila okamžitým vložením do ledové tříště na dobu minimálně 3 minuty. Denaturovanou směs jsem nakonec promíchala a krátce stočila na stolní centrifuze.

Hybridizační směs (10 μl /preparát) jsem nanasla na připravené preparáty a přikryla sklíčkem o velikosti 24 x 32 mm. Okraje krycího sklíčka jsem důkladně utěsnila kaučukovým lepidlem (Fixogum Rubber Cement, Marabu, Německo), aby nedocházelo k odpařování směsi a preparáty nechala 3 dny inkubovat při 37°C v temné komůrce s filtračním papírem navlhčeným 2xSSC.

Po hybridizaci jsem ze všech preparátů nejprve pinzetou odstranila kaučukové lepidlo a poté je namočila do kyvety s čerstvě připraveným roztokem 1% Triton X-100/0,1xSSC o pokojové teplotě, aby došlo k uvolnění krycího sklíčka. Dále jsem preparáty promyla 5 minut za mírného třepání v témže roztoku při 62°C a poté obarvila fluorescenčním barvivem DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Sigma-Aldrich) takto: preparáty jsem při pokojové teplotě a za mírného třepání inkubovala nejprve 5 minut v roztoku 1% Triton X-100/1xPBS (PBS: 0,008% 0,15M NaCl, 0,0023% 0,05M

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0,002% KCl, 0,002% KH_2PO_4), poté 15 minut v 1% Triton X-100/1xPBS s přídavkem DAPI (koncentrace 500 ng/ml), 5 minut v 1% PhotoFlo (Eastman Kodak Company, Rochester, USA)/1xPBS a na závěr 1 min v 1% Kodak PhotoFlo/miliQ H_2O . Po vyjmutí z posledního roztoku jsem preparáty nechala mírně oschnout, na každý nanesla 20 μl tzv. “antifade”, připraveného z DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane; Sigma-Aldrich) a přikryla krycím sklíčkem o velikosti 24 x 40 mm. Přebytek média jsem odstranila pomocí jemného stlačení přes filtrační papír a poté okraje krycího sklíčka uzavřela lakem na nehty.

Preparáty jsem pozorovala ve fluorescenčním mikroskopu Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Jena, Německo) a digitální snímky pořizovala CCD kamerou F-View pomocí programu Analysis Software 3.2 (Soft Imaging System GmbH, Münster, Německo). Pořízené fotografie jsem zpracovala v programu Adobe Photoshop CS5.

3.7.2 Fluorescenční *in situ* hybridizace s nepřímo značenými sondami

FISH s nepřímo značenými sondami byla provedena podle podobného protokolu, uvedeného v minulé kapitole, který se výrazně odlišoval pouze přípravou chromosomálních preparátů a způsobem vizualizace biotinem či digoxigeninem značených sond.

Odvodněné preparáty byly nejprve 4 hodiny zapékány v inkubátoru při 65°C, aby se zabránilo možnému uvolnění materiálu při pozdější inkubaci s proteinázou K. Na preparátech bylo nejprve provedeno předpůsobení roztokem RNázy A, a to tak, že na každý preparát bylo naneseno 100 μl roztoku RNázy A (0,2 mg/ml) ve 2xSSC. Preparát byl přikryt krycím sklem o velikosti 24 x 50 mm a inkubován 1 hodinu při 37°C. Poté bylo krycí sklo odstraněno a preparát dvakrát 5 minut opláchnut ve 2xSSC. Kvůli snížení nespecifických hybridizačních signálů byla částečně odstraněna cytoplasma inkubací v kyvetě s roztokem proteinázy K (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) v PBS pufru po 5 minut při 37°C. Poté byly preparáty opláchnuty 2 x 5 minut v 1x PBS též při 37°C. Dále jsem skla při stejné teplotě za mírného třepání inkubovala 30 minut v předem vytemperované kyvetě s 5xDenhardtovým reagens (0,1% polyvinylpyrolidol, 0,1% BSA, 0,1% Ficoll 400). Preparáty jsem poté denaturovala standardním způsobem, uvedeným v popisu FISH v kapitole 3.7.1 a podle uvedeného protokolu jsem namíchala i hybridizační směs, do níž jsem použila na každý preparát 30 ng B-specifické a 35 ng telomerické sondy, případně 20 ng rDNA sondy, dále 25 μg sonikované DNA ze spermií lososa. Podle výše uvedeného postupu jsem provedla vlastní hybridizaci a preparáty nechala inkubovat 20 hodin v temné komůrce při 37°C.

Po inkubaci s hybridizační směsí jsem nejprve pinzetou odstranila z preparátů kaučukové lepidlo, těsně po vložení do prvního pracího roztoku též krycí sklo a preparáty

promývala za mírného třepání nejprve 3 x 5 minut při 46°C v roztoku 50% formamidu v 2xSSC, poté při stejné teplotě 5 x 2 minuty ve 2xSSC, následně 3 x 5 minut v 0,1xSSC při 62°C a na závěr jsem je nechala 10 minut inkubovat v kyvetě s 4xSSC/0,1% Tween 20 při pokojové teplotě. Po uplynutí této doby jsem preparáty pro zabránění nespecifických reakcí protilátek blokovala 500 µl blokovacího roztoku (2,5% BSA v 4xSSC), přikryla krycím sklem 24 x 50 mm a nechala 20 minut inkubovat v komůrce s papírem navlhčeným 2xSSC při pokojové teplotě. Poté jsem na preparát nanasla 100 µl první směsi protilátek, 0,1 µl streptavidinu konjugovaného s Cy-3 (ředění 1:1000 s blokovacím roztokem, Jackson ImmunoResearch Labs, West Grove, USA) + 4 µl AntiDIG myší protilátky (ředění 1:25 s blokovacím roztokem, Roche) ve 100 µl blokovacího roztoku, před použitím jsem směs promíchala a centrifugovala 2 minuty při 13 000 rpm (stejně jsem postupovala i u dalších směsí protilátek). Preparát jsem přikryla novým krycím sklem a nechala inkubovat 1 hodinu při 37°C v temné komůrce. Preparáty jsem následně za mírného třepání prala 3 x 3 minuty při 37°C v roztoku 4xSSC/0,1% Tween 20. Poté jsem preparáty opět blokovala nanesením 500 µl blokovacího roztoku/preparát (inkubace 10 min při pokojové teplotě). Následovala inkubace 1 hodinu při 37°C s 50 µl druhé směsi protilátek, 2 µl biotinylovaného antistreptavidinu (ředění 1:25 s blokovacím roztokem, Vector, Burlingame, USA) + 4 µl Anti-myší protilátky konjugované s digoxigeninem (ředění 1:12,5 s blokovacím roztokem, Roche) v 50 µl 2,5% blokovacího roztoku. Po inkubaci jsem preparáty prala opět 3 x 3 minuty ve 4xSSC/0,1% Tween 20, za stejných podmínek jako v předchozím kroku. Následovalo další blokování za stejných podmínek jako v předchozím kroku. Posledním detekčním krokem byla inkubace preparátů 20 min při 37°C se 100 µl třetí směsi protilátek, 0,1 µl streptavidinu konjugovaného s Cy3 (ředění 1:1000 s blokovacím roztokem, Jackson ImmunoResearch Labs) + 4 µl Anti-DIG-Fluoresceinu (ředění 1:25 s blokovacím roztokem, Roche) ve 100 µl blokovacího roztoku. Následovalo poslední praní preparátů 3 x 3 minuty v roztoku 4xSSC/0,1% Tween 20 (37°C, třepání) a poté při pokojové teplotě 1 x 1 minutu v 1% Kodak PhotoFlo/MiliQ H₂O, aby došlo k dokonalému opláchnutí solí.

Preparáty jsem barvila směsí DAPI v DABCO (500 ng DAPI/1ml DABCO; 25 µl/preparát), přikryla krycím sklem 24 x 40 mm a filtračním papírem odsála přebytky média. Okraje krycího skla jsem uzavřela lakem na nehty, preparát uložila na minimálně 12 hodin do 4°C a následně jej prohlížela a fotografovala ve fluorescenčním mikroskopu (kap. 3.7.1).

V případě, kdy byla použita pouze sonda značená biotinem, jsem pro detekci sondy používala pouze streptavidin konjugovaný se Cy3 a biotinylovaný antistreptavidin.

3.7.3 Genomová *in situ* hybridizace (GISH)

GISH byla provedena podle protokolu, uvedeného v kapitole 3.7.1, jako sonda však byla použita celogenomová DNA (gDNA). Na přípravu hybridizační směsi jsem použila na každý preparát 250 ng sondy a 3 µg specifického kompetitora. Na preparáty jedinců s B-chromosomy i bez nich byla jako sonda hybridizována značená gDNA stejného pohlaví bez B-chromosomů a jako specifický kompetitor použita sonikovaná gDNA opačného pohlaví také bez B-chromosomů. V obou případech byla gDNA izolována z jedinců kmene WT-C, v němž se B-chromosomy nevyskytují.

3.8 Southern blot

Pro Southernovu hybridizaci jsem použila čerstvý amplifikát DNA B-chromosomů, získaný postupem uvedeným v kapitole 3.7., který jsem po přečištění dále nijak neupravovala. Celogenomovou DNA samců zavíječů bez B-chromosomů jsem získala standardní fenol-chlorofom-izoamylalkoholovou izolací (viz Dalíková 2006) a poté ji štěpila pomocí restrikčních enzymů *DraI* a *XbaI*. Složení štěpící reakce o celkovém objemu 20 µl bylo: 4 µg DNA + 1 µl *DraI* (50 U) + 1 µl *XbaI* (50 U) + 2 µl 10x Tango pufr a doba inkubace 16 hodin při teplotě 37°C.

Sondu jsem značila digoxigenin-11-dUTP použitím Abbott Nick Translation Kit. Reakci jsem namíchala přesně dle protokolu od výrobce, ale v polovičním objemu a inkubovala nejprve 1 h při 15°C a poté 10 min při 70°C. Jako templát jsem použila neznačenou telomerickou sondu, kterou jsem získala od Mgr. Miroslavy Sýkorové. Značenou sondu jsem před použitím ještě přečistila purifikační soupravou Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System.

Samotnou hybridizaci jsem provedla přesně podle protokolu, uvedeného v práci Šichová (2009), přičemž na gel jsem nanášela 0,5 µg amplifikátu B-chromosomů a 3 µg štěpené gDNA samců zavíječe a do hybridizačního roztoku jsem použila 75 ng sondy.

3.9 Získání B-specifických sekvencí

3.9.1 Klonování

Pro klonování jsem použila sekvence získané amplifikací DNA laserovou mikrodisekcí získaných B-chromosomů (viz kapitola 3.5), které jsem nechala rozdělit podle délky na agarózovém gelu a následně z něj vyřízla a izolovala (pomocí Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System) fragmenty o délce cca 300-700 bazí. Pro dosyntetizování

adenosinového převisu na 3' konci jsem provedla reakci s *rTaq* polymerázou (Takara Bio, Shiga, Japonsko) za přítomnosti dATP. Reakční směs o celkovém objemu 20 μ l (200 ng DNA + 1,6 μ l 2,5 mM dATP + 5U *rTaq* polymerázy + 1 x *rTaq* pufru) jsem inkubovala 30 minut při 72°C a poté ji přečistila pomocí Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System.

Pro ligaci jsem použila pGEM-T Easy Vector System (Promega), ligační reakci o celkovém objemu 10 μ l jsem namíchala ve složení 50 ng pGEM-T Easy Vector + 1 μ l ligázy + 1 x Rapid Ligation pufru + 8,3 ng insertu a nechala inkubovat 1 hodinu při pokojové teplotě.

Pro transformaci jsem jako kompetentní buňky použila bakterie *E. coli*, kmen DH5 α , do nichž jsem vektor s ligovaným insertem vpravila metodou "heat shock" – 90 vteřin dlouhou inkubací při 42°C. Transformované bakterie o objemu 100 μ l/plotna jsem následně vysela na dvě plotny (LB médium s 2% agarem + 100 μ g/ml ampicilinu + 350 μ M IPTG + 35 mg/ml X-Gal) a po 16 hodin je inkubovala při teplotě 37°C. Po této inkubaci jsem všechny kolonie, které měly bílou barvu (a tedy obsahovaly insert) přeočkovala na čerstvou plotnu (LB médium s 2% agarem + 100 μ g/ml ampicilinu), nechala opět růst 16 hodin při 37°C a poté uložila do teploty 4°C.

Přeočkované kolonie jsem dále testovala na velikost insertu pomocí PCR s univerzálními primery M13-26 (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') a M13-24 (5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3'). Složení každé reakce o celkovém objemu 20 μ l bylo: 2 μ l dNTP Mix (2,5 mM) + 2,5 μ l primeru M13-26 i primeru M13-24 (oba primery 10 μ M; Generi Biotech, Hradec Králové, ČR) + 1 x *rTaq* pufru + 0,2 μ l *rTaq* polymerázy. Jako templát jsem použila přímo vzorky bakteriálních kolonií, získané z párátka po přeočkování. Reakce probíhala za následujících podmínek: počáteční denaturace 5 min při 95°C, poté 30 cyklů s denurací 30 s při 94°C, „annealingem“ 30 s při 57°C, extenzí 1 min při 72°C; závěrečná extenze 5 min při 72°C. Produkty PCR jsem poté analyzovala na 1,5% agarózovém gelu.

Vybrané klony jsem následně množila v tekutém LB médiu s 100 μ g/ml ampicilinu 16 hodin při teplotě 37°C za důkladného třepání. Plasmidovou DNA jsem izolovala pomocí kitu NucleoSpin® Plasmid (NoLid) (Macherey-Nagel, Düren, Německo) podle protokolu výrobce.

3.9.2 Ověření původu insertů

Abych zjistila, zda zaklonované inserty skutečně pocházejí z B-chromosomů, rozhodla jsme se použít metodu Dot-blot, kdy jsem hybridizovala značenou gDNA samic

bez B-chromosomů a s B-chromosomy na membránu s izolovanou plasmidovou DNA všech pozitivních klonů.

Celogenomovou DNA samic bez B-chromosomů jsem izolovala z dospělých samic zavíječů linie WT-C standardní fenol-chloroform-izoamylalkoholovou extrakcí, opět podle protokolu z práce Dalíková (2006). Celogenomovou DNA samic s B-chromosomy, jejichž přítomnost v každém jedinci byla ověřena preparátem z Malpighiho žláz, jsem izolovala pomocí soupravy DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Německo), přesně dle protokolu od výrobce. Obě DNA jsem značila digoxigenin-11-dUTP pomocí High Prime Labelling Kit, přičemž na každou reakci jsem použila 50 ng příslušné gDNA a produkt následně ještě přečistila na kolonce ilustra AutoSeq™ G-50 (GE Healthcare).

Plasmidovou DNA jednotlivých klonů jsem nejprve zdenaturovala inkubací 5 minut při 95°C a poté ji v objemu 6 µl (tj. 180 ng) nanesla na dva kusy kladně nabitě nylonové membrány Amersham Hybond™-N+ (GE Healthcare). Oba kusy jsem následně fixovala pomocí Starlinker UV crosslinkeru (Stratagene, La Jolla, USA) a umístila do hybridizačních válců, kde byly ponechány 1 hodinu v roztoku DIG Easy Hyb (Roche) při 42°C. Mezitím jsem provedla denaturaci obou sond tak, že 500 ng každé sondy jsem naředila ve 40 µl H₂O, nechala denaturovat 5 minut při teplotě 95°C a prudce zchladila v ledové tříšti. Obě denaturované sondy jsem poté doplnila 7 ml hybridizačního roztoku DIG Easy Hyb (Roche) a po odstranění prehybridizačního roztoku přidala k membránám. Hybridizace probíhala přes noc opět při teplotě 42°C.

Druhý den následovalo promývání obou membrán a chemiluminiscenční detekce. Tento postup je shodný s promýváním a detekcí při Southernově hybridizaci a při jeho provádění jsem se přesně a beze změn držela protokolu uvedeného v práci Šichová (2009).

Definitivní potvrzení, že inserty vytipovaných klonů pochází z B-chromosomů jsem provedla pomocí FISH, při níž jsem jako sondu použila získanou plasmidovou DNA jednotlivých klonů. Tuto DNA jsem značila biotin-16-dUTP pomocí PCR s univerzálními primery M13-26 a M13-24 (viz kapitola 3.8.1). Složení reakce o celkovém objemu 15 µl bylo následující: 5 ng templátu + 1,2 µl směsi značených nukleotidů (1 mM dGTP, dCTP, dATP; 0,65 mM dTTP; 0,35 mM biotin-16-dUTP) + 1,5 µl každého primeru (10 µM) + 1 x *rTaq* pufru + 0,12 µl *rTaq* polymerázy (Takara). Reakce probíhala za stejných podmínek jako v kap. 3.8.1., pouze počet cyklů byl zvýšen na 35. Vlastní in situ hybridizaci jsem provedla podle protokolu, uvedeného v kapitole 3.7.2.

3.9.3 Sekvenování

Plasmidovou DNA z kolonií, které se ukázaly jako skutečně pocházející z B-chromosomů, jsem následně nechala osekvenovat na přístroji ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems, Carlsbad, USA) v Laboratoři genomiky na Ústavu molekulární biologie rostlin, BC AV ČR.

3.10 Srovnání reprodukčních schopností zavíječů linie WT-C02-B a kmene WT-C

Pro porovnání zavíječů s a bez B-chromosomů byla provedena srovnávací analýza reprodukčních schopností párů kmene WT-C02 (linie WT-C02-B) a kmene WT-C. V linii WT-C02-B byly založeny sourozenecké páry, jejichž oba rodiče byli nositeli B-chromosomů. Páry byly zakládány stejným způsobem, jako byl popsán v kapitole 3.2.2. Vždy 5. den po založení páru byli jedinci z Petriho misky odebráni, analyzováni na přítomnost a počet B-chromosomů prohlídkou preparátů z Malpighiho trubic (viz kapitola 3.2.1) a zároveň byl spočítán počet nakladených vajíček. Petriho miska s nakladenými vajíčky byla poté umístěna do větší misky s potravou (pšeničný šrot + pivovarské kvasnice). 15. den po založení páru byly na misce zaznamenán počet a typ nevyklíhlých vajíček, tj. zda byla vajíčka bez známek vývoje (taková byla označena jako sterilní) či zda v nich proběhl částečný embryonální vývoj (označena jako letální). Plodnost párů a líhnivost vajíček byly vyhodnoceny jak pro každý pár, tak i průměrně pro všechny analyzované páry linie. Stejný postup byl aplikován i v případě párů kontrolního kmene WT-C, v němž se B-chromosomy neobjevily. Všechna získaná data byla statisticky zpracována a vyhodnocena v programu GraphPad Prism, verze 3.00.

4. Výsledky

4.1 Jednopárové linie a jejich udržení

Analýza přítomnosti a počtu B-chromosomů byla prováděna vyšetřením preparátů z Malpighiho trubic vždy u obou jedinců každého sledovaného páru linie. Pod světelným mikroskopem byla na preparátech heterochromatinová tělíska dobře pozorovatelná a dala se jasně rozlišit od okolního chromatinu. Na některých samičích preparátech bylo pod dostatečným zvětšením dokonce možné i rozlišit sex-chromatin od B-chromosomů, a to především na základě odlišné struktury (Obr.1 a 2). Celkově byly v polyploidních jádrech buněk Malpighiho trubic dospělých jedinců pozorovány různé počty heterochromatinových tělísek (u samic po odečtení sex-chromatinu), pohybující se nejčastěji mezi jedním a třemi. Během sledování přítomnosti B-chromosomů však byly zaznamenány všechny konstituce od nuly až po pět tělísek v jednom jádře, přičemž různé počty pozorovaných tělísek byly pozorovány i v rámci buněk jednoho jedince.

V každé generaci bylo na přítomnost a počet B-chromosomů analyzováno přibližně 30 párů motýlů, úhrnem byly tedy během jedenácti sledovaných generací připraveny preparáty z více než 650 jedinců. Do následující generace bylo vybíráno průměrně 10 párů s různým počtem B-chromosomů.

4.2 Charakterizace a původ B-chromosomů

Pomocí laserové mikrodisekce se povedlo získat celkem 40 heterochromatinových tělísek, rozdělených do 4 vzorků po 10 kusech. Do amplifikační reakce jsem vždy použila celý obsah jednoho vzorku, který po amplifikaci poskytl fragmenty o velikosti přibližně 100 - 850 bp (Obr.3).

Tuto DNA jsem následně využila jako templát při konstrukci B-specifických “painting” sond pro fluorescenční *in situ* hybridizaci. První sondu jsem naznačila fluorochromem Orange-dUTP a hybridizovala ji na pachytenní preparáty samců a samic s B-chromosomy i bez nich. Na polovině preparátů jsem zároveň použila specifického kompetitora ve formě sonikované DNA samců *E. kuehniella* bez B-chromosomů. Sonda poskytla výrazný signál po celé ploše B-chromosomů, takže se dala pozorovat i jejich nestejná morfologie. Ostatní chromosomy zůstaly neznačeny (Obr.4-7). Na preparátech samic a samců bez B-chromosomů nebyl pozorován signál žádný. Přítomnost specifického kompetitora neměla ani v jednom případě žádný pozorovatelný vliv na specifitu nebo intenzitu signálu sondy (Obr. 4 a 6).

B-chromosomy jsem dále testovala na přítomnost telomerických opakovaných sekvencí TTAGG pomocí FISH s fluorochromy značenými sondami. B-specifickou sondu jsem naznačila FITC-dUTP, telomerickou Cy3-dUTP a obě sondy hybridizovala na pachytenní preparáty jedinců pozitivních na přítomnost B-chromosomů. B-specifická sonda opět jasně označila pouze B-chromosomy, telomerická poskytla dle očekávání signály na koncích všech bivalentů (viz Sahara a kol. 1999), k B-chromosomům však nehybridizovala (Obr.8).

Experiment jsem opakovala i se sondami značenými nepřímo, B-specifickou DIG-dUTP a telomerickou biotin-dUTP, a detekovanými protilátkami, jež zaručují vyšší spolehlivost prokázání pozitivní hybridizace. I v tomto případě však telomerická sonda neposkytla na B-chromosomech žádný detekovatelný signál (Obr.9).

Definitivní ověření nepřítomnosti telomerických sekvencí na B-chromosomech jsem provedla Southernovou hybridizací, kdy jsem jako vzorek použila amplifikát DNA B-chromosomů a jako pozitivní kontrolu štěpenou gDNA samců zavíječů bez B-chromosomů. Na membránu s přenesenými vzorky, rozdělenými dle velikosti elektroforetickou separací jsem hybridizovala telomerickou sondu, značenou DIG-dUTP. Sonda poskytla výrazný signál po celé ploše vzorku pozitivní kontroly, k amplifikátu DNA B-chromosomů však žádnou afinitu neprojevila (Obr.10).

Možný původ B-chromosomů jsem se dále pokoušela ověřit FISH s malovací sondou pro chromosom W (Vítková a kol. 2007). B-specifickou sondu jsem v tomto případě značila Cy3-dUTP a W-specifickou Green-dUTP. Sondy jsem hybridizovala na mitotické preparáty samic s B-chromosomy. Ačkoliv obě sondy poskytly silný a výrazný signál, každá značila pouze chromosomy jí příslušné a nedocházelo mezi nimi k žádné vzájemné hybridizaci (Obr.11).

Podobným způsobem jsem testovala také možný původ z rDNA oblastí. 18S rDNA templát jsem naznačila biotin-dUTP a tuto sondu použila pro nepřímou FISH na pachytenních preparátech samic zavíječů s B-chromosomy. Sonda zřetelně označila dva autosomální klastry rDNA genů v souladu s publikovanými údaji (Marec a Traut 1983, Nguyen a kol. 2010), k B-chromosomům však nehybridizovala (Obr.12).

Dalším provedeným experimentem byla GISH, při níž byla za přítomnosti specifického kompetitora hybridizována Cy3-dUTP-značená gDNA samců a samic bez B-chromosomů na pachytenní preparáty připravené z jedinců, kteří B-chromosomy nesli. Sonda úspěšně označila všechny chromosomy základního genomu a zároveň poskytla i

signál srovnatelné intenzity na B-chromosomech. Na chromosomech základní sádky genomu bylo dále pozorováno několik míst silnějšího signálu, a to na koncích chromosomů, heterochromatinovém bločku a na samičích preparátech také na chromosomu W (Obr.13-16).

4.3 Získání B-specifických sekvencí

Kompetentní buňky byly transformovány vektorem s 300-700 bp dlouhými ligovanými fragmenty amplifikované a přečištěné DNA laserovou mikrodisekcí získaných B-chromosomů. Po vyšetí na plotny bylo získáno celkem 16 pozitivních klonů, které obsahovaly vektor s úspěšně ligovaným insertem. Pomocí PCR s univerzálními primery byly po otestování správné délky insertu vyloučeny 4 klony a u zbývajících 12 byl původ insertů předběžně analyzován pomocí dot-blotu. Při dot-blotu byly použity dvě membrány, na nichž byla nanášena DNA všech testovaných klonů a zároveň hybridizována sonda značená DIG-dUTP: v prvním případě gDNA samic s B-chromosomy a ve druhém gDNA samic bez nich. Na základě rozdílů v intenzitě signálu jednotlivých klonů na každé z membrán jsem vytipovala tři klony (K09, K13, K14), u nichž byly rozdíly největší, a tudíž naznačovaly, že fragmenty, které jsou v nich zaklonované, jsou skutečně z B-chromosomů.

Plasmidovou DNA vybraných tří klonů jsem dále naznačila biotin-dUTP a použila jako sondu pro FISH. V případě sond z klonů K09 a K14 nebyly na B-chromosomech pozorovány hybridizační signály, u klonu K13 se však B-chromosomální původ insertu potvrdil, a to dokonce klastrem silných hybridizačních signálů (Obr.17 a 18).

Izolovaná plasmidová DNA klonu K13 byla následně poslána na sekvenaci, která však nebyla úspěšná. Získaná sekvenční data proto nebyla využita pro další analýzu.

4.4 Analýza možných fyziologických důsledků přítomnosti B-chromosomů

Při srovnávací analýze reprodukčních schopností byly získány údaje o 20 párech linie WT-C02-B a 15 párech kmene WT-C. Z celkového počtu párů byly vyřazen 1 pár linie WT-C02-B, protože u rodičů nebyla jednoznačně prokázána přítomnost B-chromosomů. Statisticky bylo tedy zpracováno 19 párů linie WT-C02-B (rozpětí počtu B-chromosomů: ♀ 0-2 B, ♂ 0-3 B, celkem páry 1-5 B) a 15 párů kmene WT-C. Na zpracování dat jsem použila dvouvýběrový *t*-test a získané hodnoty shrnula do tabulky (Tab. 1).

Přehled dat získaných srovnávací analýzou

Linie	Celkový počet párů	Počet hodnocených párů	Nakladená vajíčka (průměr ± SD)	Analýza vajíček			
				Sterilní vajíčka %	Letální vajíčka %	Počet vylíhlých larev	Líhivost %
WT-C02-B	20	19	285,1 ± 61,7	13,8 ± 5,4	4,5 ± 4,4	233,4 ± 47,9	82,5 ± 8,1
WT-C	15	15	245,9 ± 62,4	8,2 ± 4,7	2,8 ± 2,7	218,4 ± 52,3	89,3 ± 6,0

Tab. 1. Průměrná data, získaná při srovnávání reprodukčních schopností linie WT-C02-B a kmene WT-C.

Ačkoliv byl průměrný počet nakladených vajíček vyšší u linie WT-C02-B, rozdíl nebyl signifikantní ($P > 0,05$), průkazné rozdíly se však ukázaly být v případě líhivosti, která byla u linie WT-C02-B významně nižší ($P < 0,01$), a to zejména díky průkazně vyššímu průměrnému počtu sterilních vajíček ($P < 0,005$). Obě linie se však signifikantně nelišily v počtu vylíhnutých housenek ($P > 0,05$), výsledná reprodukční způsobilost (fitness) obou linií tedy zůstala srovnatelná.

5. Diskuze

5.1 Stanovení přítomnosti a počtu B-chromosomů

Příprava preparátů z Malpighiho trubic se ukázala jako spolehlivá metoda ověření přítomnosti heterochromatinových tělísek u larev i dospělců zavíječů. U samců byla tato tělíska jednoznačně B-chromosomy, u samic však byla situace komplikovanější z důvodu možné záměny se sex-chromatinem, který je pro samice motýlů typický a tvoří taktéž heterochromatinové tělísko podobného vzhledu i velikosti (Traut a kol. 2007). Přesné rozlišení mezi B-chromosomy a sex-chromatinem však nebylo pro mou práci nezbytné a počet B-chromosomů pro daného jedince samičího pohlaví byl tedy vypočítán jako počet všech heterochromatinových tělísek v jádře mínus jedna.

U dospělých jedinců bylo stanovení přítomnosti a počtu B-chromosomů dále ztíženo masivním rozpadem původně jednolitého jaderného chromatinu na více částí, který znemožňoval jednoznačné vymezení hranic jednotlivých jader. Fragmentace jader buněk Malpighiho žláz nastává u dospělých motýlů jako důsledek degenerace trávicí a vylučovací soustavy z důvodu nepřijímání potravy, což je pro dospělé řady druhů motýlů obvyklé a nedá se jí tedy při přípravě preparátů vyhnout (F. Marec, ústní sdělení). Aby bylo riziko chybného určení počtu nadbytečných chromosomů na jedno jádro sníženo na minimum, Malpighiho žlázy byly vždy z dospělého vypitvány v maximálním možném objemu a při vyhodnocování preparátu byl analyzován veškerý materiál, zachycený na sklíčku. V naprosté většině případů byly na preparátu nalezeny oblasti s jednoznačnými hranicemi jednotlivých jader. Pokud takové oblasti výjimečně nalezeny nebyly, daný jedinec nebyl použit jako experimentální materiál.

Počty B-chromosomů, pozorované u zavíječů linie WT-C02-B nejsou nijak výjimečné, a to ani v rámci skupiny Lepidoptera. Podobné počty byly popsány např. u světlopásky *Tarache tropica* (Noctuidae) nebo hnědáška *Euphydryas colon* (Nymphalidae) (Mohanty a Nayak 1983, Pearse a Ehrlich 1979).

5.2 Pátrání po původu B-chromosomů

Původ nadbytečných chromosomů v genomu zavíječů linie WT-C02-B jsem zjišťovala především opakovaným použitím fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) s různými sondami. Jako základní sondu k determinaci B-chromosomů jsem používala naznačený amplifikát jejich DNA, kterou jsem získala laserovou mikrodisekcí. B-specifická sonda ve všech případech poskytovala velmi silný signál a zcela jednoznačně B-

chromosomy značila po celé ploše. Nebyl však pozorován žádný další signál na A-chromosomech, což by ukazovalo buď na možný, i když nepravděpodobný cizorodý původ těchto chromosomů, případně by to mohl být následek vysoké míry degenerace B-chromosomů, díky které by místo původu na chromosomech již nebylo pomocí paintingové sondy vůbec detekovatelné.

Nejčastějšími oblastmi původu B-chromosomů jsou dle literatury centromery, telomery a jejich okolí, dále oblasti rDNA genů a pohlavní chromosomy (Camacho 2005). Ve všech případech se tedy jedná o regiony s repetitivními sekvencemi, často též heterochromatinizované (Elgin a Grewal 2003). Hypotéza centromerického původu byla v tomto případě vyloučena již na počátku, neboť chromosomy *Ephestia kuehniella* jsou holocentrické, a tudíž neobsahují žádnou konkrétní oblast repetitivních sekvencí, typických pro centromeru a paracentrické regiony jako je tomu u chromosomů monocentrických (Robinson 1971).

Přítomnost telomerických sekvencí na B-chromosomech jsem testovala nejprve FISH se sondou značenou fluorochromem. Templátem pro sondu byly beztemplátovou PCR získané fragmenty DNA, skládající se z $(TTAGG)_n$ sekvencí, které jsou charakteristické pro zástupce řádu Lepidoptera včetně *E. kuehniella* (Sahara a kol. 1999). Ačkoliv telomerická sonda fungovala výborně a označila konce všech chromosomů základní sádky genomu, na B-chromosomech nebyl žádný signál pozorován. Výsledek experimentu tedy naznačil, že nadbytečné chromosomy telomery buď mají redukované, a to v takovém objemu, že nejsou detekovatelné tímto typem sond, nebo je nemají vůbec. Experiment byl tedy opakován se sondami značenými nepřímo, které umožňují případný signál zesílit protilátkami. I v tomto případě však žádný signál na B-chromosomech pozorován nebyl. Jelikož telomery jsou důležitou součástí každého chromosomu a mají velký význam pro jeho stabilitu (Blackburn 1991), bylo zásadní jejich nepřítomnost potvrdit s konečnou platností, čehož bylo dosaženo úspěšnou Southernovou hybridizací, která přítomnost telomerických sekvencí na B-chromosomech vyvrátila. B-chromosomy jsou obecně velmi nestabilní elementy s mnoha zvláštnostmi, nepřítomnost $(TTAGG)_n$ sekvencí je u nich tedy možná a byla by zároveň i vysvětlením pro pozorovanou nestejnou morfologii nadbytečných chromosomů, jež mohla být dána například fúzemi z důvodu absence telomerických sekvencí.

Další oblastí typickou pro vznik B-chromosomů je ribosomální DNA, která se v genomu objevuje v klastrech (Dhar a kol. 2002, Szczerbal a Switonski 2003). Tuto hypotézu jsme testovali pomocí nepřímo značené sondy pro 18S rDNA. Sonda však na preparátech značila pouze dva autosomální klastry rDNA genů, které jsou pro *E. kuehniella*

typické (Nguyen a kol. 2010) a k nadbytečným chromosomům nehybridizovala. Tím byl původ B-chromosomů z oblasti rDNA genů stanoven jako vysoce nepravděpodobný.

Dřívějším experimentem na pachytenních preparátech bylo zjištěno, že k B-chromosomům nehybridizuje ani W-specifická sonda. Tento experiment jsme opakovali na mitotických preparátech a s přidáním B-specifické sondy. Pohlavní chromosom W se totiž během meiotické profáze na rozdíl od B-chromosomů vyskytuje v rozvolněnějším stavu, což by v případě slabého či roztroušeného signálu při použití pachytenních preparátů mohlo vést k tomu, že by takový signál nebyl kvůli menší kondenzaci chromatinu vůbec detekovatelný. Obě sondy poskytly jednoznačné signály, které vyloučily detekovatelnou přítomnost sekvencí společných pro B-chromosomy a chromosom W.

Možnost vzniku nadbytečných chromosomů z chromosomu Z bohužel testována nebyla, a to z důvodu absence jakékoliv funkční malovací sondy, specifické na chromosom Z motýlů (Šíchová 2009).

Abychom získali další informace, přispívající k objasnění původu B-chromosomů, byla dále provedena genomová *in situ* hybridizace. Sonda, jíž byla značená celogenomová DNA zavíječů kmene WT-C k B-chromosomům hybridizovala a vykazovala relativně silné hybridizační signály ve srovnání s chromosomy základní sádky genomu. Tento výsledek naznačuje původ B-chromosomů ze sekvencí původního genomu, může se však jednat i o sekvence podobné a vysoce opakované, což nelze zcela vyloučit kvůli hybridizačním podmínkám, díky nimž sonda hybridizuje i se sekvencemi, které nejsou zcela homologní (Šíchová 2011). Signály na B-chromosomech mohou také souviset s velkou mírou divergence těchto chromosomů od místa původního vzniku. Značná sekvenční odlišnost by jednak znemožnila místo původu B-chromosomů detekovat B-specifickou malovací sondou, ale především by se díky případné heterochromatinizaci B-chromosomy mohly stát cílovým místem transpozic a akumulovat repetice vyskytující se roztroušeně v hostitelském genomu, které by následně mohly být příčinou hybridizačních signálů při GISH (Dimitri a kol. 2005). Sonda dále poskytla silnější signál na chromosomu W, na heterochromatinovém bločku (tzv. knob, viz Marec a Traut 1993) neidentifikovaného autosomálního bivalentu a na koncích některých A-chromosomů. Výraznější značení chromosomu W bylo v tomto případě očekávané, a to nejen z důvodu toho, že jako specifický kompetitor byla použita samčí DNA a nedocházelo tudíž ke kompetici sondy a specifického kompetitora o vazebná místa, ale také díky struktuře chromosomu W, který je u *E. kuehniella* tvořen akumulovanými repeticemi z celého genomu (Traut a kol. 1999). Silnější signál na koncích některých A-

chromosomů byl pravděpodobně signál telomerických či subtelomerických sekvencí, jež je při genomové *in situ* hybridizaci u motýlů běžný (Sahara a kol. 1999, Yoshido a kol. 2005).

5.3 Molekulární složení B-chromosomů

Protože se nezdařilo určit místo původu B-chromosomů pomocí hybridizačních technik, pokusila jsem se klonovat B-specifické sekvence, amplifikované z laserovou mikrodisekcí získaných vzorků DNA těchto elementů, a pomocí nich původ případně objasnit. Ačkoliv bylo klonování několikrát opakováno s využitím nástrojů a protokolů rutinně zavedených v naší laboratoři, podařilo se mi izolovat pouze jediný pozitivní klon, jehož insert s jistotou pocházel z B-chromosomů. Po jeho sekvenaci se však ukázalo, že se pravděpodobně jedná o směsný vzorek, což by naznačoval i větší počet hybridizačních signálů při testování klonu pomocí FISH, který však ale mohl být způsoben i náhodným klonováním repetice, která se na B-chromosomech vyskytuje na více místech. Neúspěch při klonování si vysvětlují repetitivní povahou sekvencí B-chromosomů, které jsou pro ně velmi typickým znakem, ale zároveň nejsou snadným typem sekvencí pro klonování do bakterií, jak se ukázalo i u stabilního systému BAC klonů (Song a kol. 2001, Camacho 2005). Nelze ani vyloučit negativní vliv adaptorů soupravy WGA4 (Sigma-Aldrich), které byly použity pro PCR amplifikaci vzorků DNA, na úspěšnost klonování.

5.4 Vliv přítomnosti B-chromosomů na reprodukční schopnosti linie WT-C02-B

Nadbytečné chromosomy mohou svého nositele ovlivňovat nejrůznějšími způsoby, mezi nejtypičtější však patří jejich negativní vliv na reprodukci, zejména pokud jsou v genomu přítomné ve větším počtu, což bylo pozorováno i u motýlů (Pearse a Ehrlich 1979).

Fyziologická analýza byla provedena srovnáním linie WT-C02-B (kmene WT-C02), která nadbytečné chromosomy obsahuje a kmene WT-C, u kterého přítomny nejsou. Předmětem zkoumání byl počet nakladených vajíček, poměr letálních a sterilních vajíček a počet vylíhlých housenek. Po vyhodnocení dat statistickými metodami se ukázalo, že v případě linie WT-C02-B došlo k prokazatelnému snížení líhnivosti, a to zejména díky signifikantnímu zvýšení procenta sterilních vajíček. Jelikož však jedinci této linie zároveň nakladli větší počet vajíček než jedinci kmene WT-C, výsledná fitness obou linií zůstala po statistickém porovnání srovnatelná a rozdíl mezi nimi nebyl průkazný. V případě linie WT-C02-B se tedy negativní vliv B-chromosomů na reprodukční schopnost svého nositele nepotvrdil, stejně jako například u martináče *Antheraea roylei* (Saturniidae) (Putturaju a Nagaraju 1985).

6. Souhrn

Tato práce se zabývá původem nadbytečných chromosomů divokého kmene zavíječe moučného, *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae), jejich sekvenčním složením a důsledky jejich přítomnosti na hostitele. Původ B-chromosomů byl testován zejména fluorescenční *in situ* hybridizací (FISH) s různými specifickými sondami, včetně nově konstruované malovací sondy na tyto chromosomy. Tato sonda byla připravena značením amplifikátu vzorků jejich DNA, jež jsem získala laserovou mikrodisekcí. Opakovanými hybridizacemi byl vyloučen vznik B-chromosomů z pohlavního chromosomu W, nebyl prokázán ani jejich původ z konkrétního segmentu autosomů či pohlavního chromosomu Z. Hybridizační experimenty vyloučily v B-chromosomech přítomnost telomerických sekvencí (TTAGG)_n i klastrů rDNA genů, tedy sekvencí často se v nadbytečných chromosomech vyskytujících. Přítomnost centromerických repetitiv, též typických pro nadbytečné chromosomy, nemělo smysl testovat vzhledem k holokinetické povaze chromosomů motýlů.

Další informace o původu a složení nadbytečných chromosomů byly získány genomovou *in situ* hybridizací (GISH), která ukázala na výskyt sekvencí, společných pro B-chromosomy a hostitelský genom. Přítomnost sekvencí hostitelského genomu na nadbytečných chromosomech však bohužel není jednoznačným důkazem jejich původu, jelikož se na tyto chromosomy mohly dostat například transpozicemi.

Molekulární složení B-chromosomů s perspektivou osvětlení místa jejich původu jsem se dále pokoušela získat klonováním sekvencí amplifikovaných ze vzorků DNA, získaných laserovou mikrodisekcí. Avšak vzhledem k předpokládané repetitivní povaze sekvencí B-chromosomů a pravděpodobně i přítomnosti adaptorů použitých pro jejich amplifikaci byl získán pouze jediný pozitivní klon s insertem ověřeným dot-blotem a pomocí FISH. Následná sekvenční analýza ale ukázala, že jde o směsný insert, nepoužitelný pro další analýzy.

V této práci byl také testován vliv B-chromosomů na reprodukční schopnosti svých nositelů. Srovnávací analýza plodnosti a líhivosti vajíček linie WT-C02-B zavíječů s B-chromosomy a kmene zavíječů WT-C bez B-chromosomů sice prokázala rozdíly v jednotlivých hodnocených parametrech, avšak bez průkazného vlivu na celkovou fitness.

Výsledky této práce přinášejí detailní charakteristiku prvních B-chromosomů zjištěných u *E. kuehniella*, přispívají k rozšíření znalostí o nadbytečných chromosomech motýlů a zároveň zcela podporují hypotézu výjimečnosti každého případu jejich výskytu s tím, že jejich původ zůstává prozatím neobjasněn.

7. Literatura

- Alfenito MR, Birchler JA (1993) Molecular characterization of a maize B-chromosome centric sequence. *Genetics* **135**: 589-597.
- Amos A, Dover G (1981) The distribution of repetitive DNAs between regular and supernumerary chromosomes in species of *Glossina* (tsetse): a two-step process in the origin of supernumeraries. *Chromosoma* **81**: 673-690.
- Araújo SMSR, Pompolo SG, Perfectti F et al. (2001) Integration of a B-chromosome into the A genome of the wasp. *Proc. R. Soc. Lond.* **268**: 1127-1131.
- Bakkali M, Cabrero J, Camacho JPM (2003) B-A interchanges are unlikely pathway for B-chromosome integration into the standard genome. *Chromosome Res.* **11**: 115-123.
- Bakkali M, Manrique-Poyato MI, López-León MD et al. (2010) Effects of B chromosomes on egg fertility and clutch size in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *J. Orthopt. Res.* **19**: 197-203.
- Bell G, Burt A (1990) B chromosomes: germ-line parasites which induce changes in host recombination. *Parasitology* **100**: S19-S26.
- Bigger TRL (1976): Karyotypes of three species of Lepidoptera including an investigation of B-chromosomes in *Pieris*. *Cytologia* **41**: 261-282.
- Blackburn EH (1991) Structure and function of telomeres. *Nature* **350**: 569-573.
- Bougourd SM, Plowman AB (1996) The inheritance of B chromosomes in *Allium schoenoprasum* L. *Chromosome Res.* **4**: 151-158.
- Cabrero J, Alché JD, Camacho JPM (1987) Effects of B chromosomes of the grasshopper *Eyprepocnemis plorans* on nucleolar organiser regions activity. Activation of a latent NOR on a B chromosome fused to an autosome. *Genome* **29**: 116-121.
- Camacho JPM (2005) B-chromosomes. In: Gregory TR (ed) The evolution of the genome. Elsevier, San Diego, 223-286.
- Camacho JPM, Bakkali M, Corral JM et al. (2002) Host recombination is depend on the degree of parasitism. *Proc. R. Soc. Lond. B* **269**: 2173-2177.
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW (2000) B-chromosome evolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B.* **355**: 163-178.
- Camacho JPM, Shaw MW, López-León MD et al. (1997) Population dynamics of a selfish B-chromosome neutralized by the standard genome in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Am. Nat.* **149**: 1030-1050.

- Carvalho AB, Koerich LB, Clark AB (2009) Origin and evolution of Y chromosomes: *Drosophila* tales. *Trends Genet.* **25**: 270-277.
- Cebria A, Navarro ML, Puertas MJ (1994) Genetic control of B chromosome transmission in *Aegilops speltoides* (Poaceae). *Am. J. Bot.* **81**: 1502-1507.
- Chiavarino AM, Rosato M, Rosi P et al. (1998) Localization of the genes controlling B chromosome transmission rate in maize (*Zea mays* ssp *mays*, Poaceae). *Am. J. Bot.* **85**: 1581-1585.
- Dalíková M (2006) Acetylase histonu H4 na W chromosomu zavíječe moučného, *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice.
- De Villena FPM, Sapienza C (2001) Female Meiosis Drives Karyotypic Evolution in Mammals. *Genetics* **159**: 1179-1189.
- Dhar MK, Friebe B, Koul AK et al. (2002) Origin of an apparent B chromosome by mutation, chromosome fragmentation and specific DNA sequence amplification. *Chromosoma* **111**: 332-340.
- Dherawattana A, Sadanaga K (1973) Cytogenetics of a crown rust-resistant hexaploid oat with 42 + 2 fragment chromosomes. *Crop Sci.* **13**: 591-594.
- Dimitri P, Corradini N, Rossi F et al. (2005) Transposable elements as artisans of the heterochromatic genome in *Drosophila melanogaster*. *Cytogenet. Genome Res.* **110**: 165-172.
- Elgin SC, Grewal SI (2003) Heterochromatin: silence is golden. *Curr. Biol.* **13**: 895-898.
- Fuková I, Traut W, Vítková M et al. (2007) Probing the W chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin. *Chromosoma* **116**: 135-145.
- Green DM (1990) Muller's ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. *Genome* **33**: 818-824.
- Gorlov IP, Tsurusaki N (2000) Analysis of the phenotypic effects of B chromosomes in natural population of *Metagagrella tenuipes* (Arachnida: Opiliones). *Heredity* **84**: 209-217.
- Henriques-Gil N, Arana P (1990) Origin and substitution of B-chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Evolution* **44**: 747-753.
- Henriques-Gil N, Santos JL, Arana P (1984) Evolution of a complex B-chromosome polymorphism in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Chromosoma* **89**: 290-293.

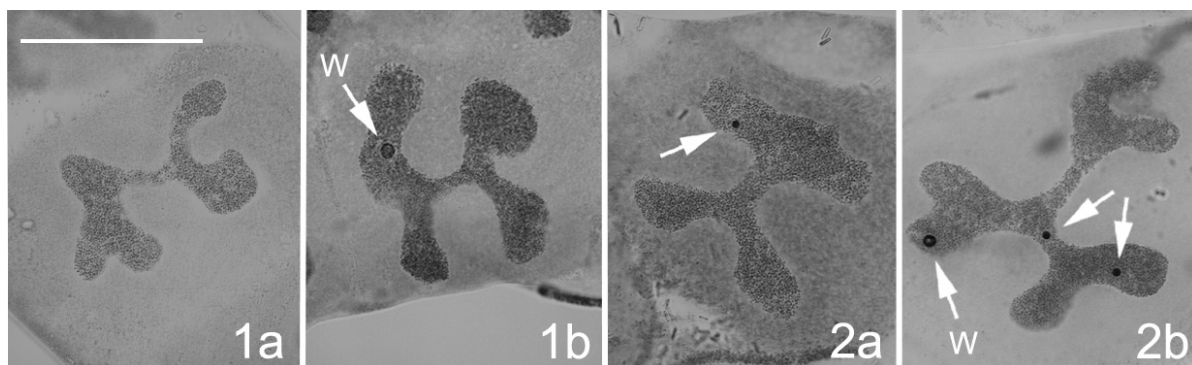
- Herrera JA, López-León MD, Cabrero J et al. (1996) Evidence for B chromosome drive suppression in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Heredity* **76**: 633-639.
- Hewitt GM (1976) Meiotic drive for B-chromosomes in the primary oocytes of *Myrmeleotettix maculatus* (Orthoptera: Acrididae). *Chromosoma* **56**: 381-391.
- Hurst GD, Werren JH (2001) The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution. *Nat. Rev. Genet.* **2**: 597-606.
- Jimenez MM, Romera F, Gonzáles-Sánchez M et al. (1997) Genetic control of the rate of transmission of rye B chromosomes. III. Male meiosis and gametogenesis. *Heredity* **78**: 636-644.
- Jones RN (1991) B-chromosome drive. *Am. Nat.* **137**: 430-442.
- Jones RN (1995) Tansley review no 85: B chromosomes in plants. *New Phytol.* **131**: 411-434.
- Kayano H (1971) Accumulation of B-chromosomes in the germ line of *Locusta migratoria*. *Heredity* **27**: 119-123.
- Kubičková S, Černohorská H, Musilová et al. (2002) The use of laser microdissection for the preparation of chromosome-specific painting probes in farm animals. *Chromosome Res.* **10**: 571-577.
- Kumar G, Singh V (2004) Influence of B-chromosomes on genetic recombination and fertility in pearl millet. *Cytologia* **69**: 431-437.
- Lockwood APM (1961) "Ringer" solutions and some notes on the physiological basis of their ionic composition. *Comp. Biochem. Physiol.* **2**: 241-289.
- López-León MD, Neves N, Schwarzacher T et al. (1994) Possible origin of a B-chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Res.* **2**: 87-92.
- Marec F (1990) Genetic control of pest Lepidoptera: Introduction of sex-linked recessive lethal mutations in *Ephestia kuehniella* (Pyralidae). *Acta Entomol. Bohemos.* **87**: 445-458.
- Marec F, Traut W (1993) Synaptonemal complexes in female and male meiotic prophase of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). *Heredity* **71**: 394-404.
- Matsubara K, Yamada K, Umemoto S et al. (2008) Molecular cloning and characterization of the repetitive sequences that comprise the constitutive heterochromatin of the A and B chromosomes of the Korean field mouse (*Apodemus peninsulae*, Muridae, Rodentia). *Chromosome Res.* **16**: 1013-1026.

- McQuade LR, Hill RJ, Francis D (1994) B-chromosome systems in the greater glider, *Petauroides volans* (Marsupialia, Pseudocheiridae) 2. Investigation of B-chromosome DNA sequences isolated by micromanipulation and PCR. *Cytogenet. Cell Genet.* **66**: 155-161.
- Miao VP, Covert SF, VanEtten HD (1991) A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable ("B") chromosome. *Science* **254**: 1773-1776.
- Mohanty PK, Nayak B (1983) On the supernumerary chromosomes of *Tarache tropica* Guen. (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal Res. Lepidoptera* **20**: 170-173.
- Nguyen P, Sahara K, Yoshido A et al. (2010) Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica* **138**: 343-354.
- Nur U (1962) A supernumerary chromosome with an accumulation mechanism in the lecanoid genetic system. *Chromosoma* **13**: 249-271.
- Nur U (1966) The effect of supernumerary chromosomes on the development of mealy bugs. *Genetics* **54**: 1239-1249.
- Oliver JL, Posse F, Martínéz-Zapater JM et al. (1982) B chromosomes and E-1 isoenzyme activity in mosaic bulbs of *Scilla autumnalis* (Liliaceae). *Chromosoma* **85**: 399-403.
- Padhy KB, Nayak B (1982) Supernumerary chromosomes in the domesticated eri-silkworm, *Philosamia ricini* (Saturniidae: Lepidoptera). *Journal Res. Lepidoptera* **20**: 16-17.
- Palestis BG, Trivers R, Burt A et al. (2004) The distribution of B-chromosomes across species. *Cytogenet. Genome Res.* **106**: 151-158.
- Pearse FK, Ehrlich PR (1979) B chromosome variation in *Euphydryas colon* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Chromosoma* **73**: 263-274.
- Perfectti F, Werren JH (2001) The interspecific origin of B-chromosomes: Experimental Evidence. *Evolution* **55**: 1069-1073.
- Plowman AB, Bougourd SM (1994) Selectively advantageous effects of B chromosomes on germination behaviour in *Allium schoenoprasum* L. *Heredity* **72**: 587-593.
- Puertas MJ, González-Sánchez M, Manzanero S et al. (1998) Genetic control of the rate of transmission of rye B chromosomes. IV. Localization of the genes controlling B transmission rate. *Heredity* **80**: 209-213.
- Putturaju HP, Nagaraju J (1985) Preliminary observations on the occurrence of B chromosome in the silkworm *Antheraea roylei* (Lepidoptera: Saturniidae). *Curr. Sci. India* **54**: 471-473.
- Qi ZX, Zeng H, Li XL et al. (2002) The molecular characterization of maize B-chromosome specific AFLPs. *Cell Res.* **12**: 63-68.

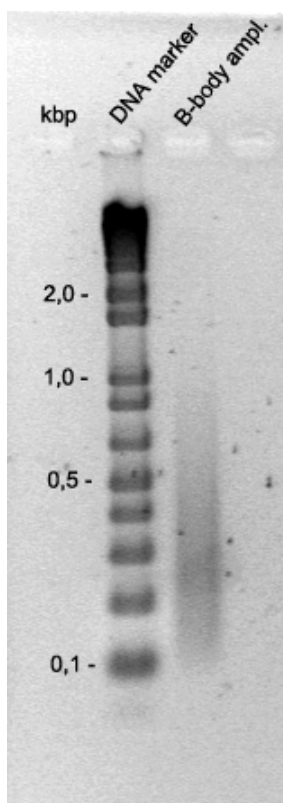
- Rego A, Marec F (2003) Telomeric and interstitial telomeric sequences in holokinetic chromosomes of Lepidoptera: telomeric DNA mediates association between postpachytene bivalents in achiasmatic meiosis of females. *Chromosome Res.* **11**: 681-694.
- Robinson R (1971) Lepidoptera genetics. Pergamon, Oxford, England.
- Rocha-Sanchez SM, Pompolo SG (2004) Imitate to integrate: reviewing the pathway for B-chromosome integration in *Trypoxylon (Trypargilium) albitarse* (Hymenoptera, Sphecidae). *Cytogenet. Genome Res.* **106**: 398-401.
- Sahara K, Marec F, Traut W (1999) TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Res.* **7**: 449-460.
- Sharbel TF, Green DM, Houben A (1998) B-chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. *Genome* **41**: 14-22.
- Silva MJJ, Yonenaga-Yassuda Y (1998). Heterogeneity and meiotic behaviour of B and sex chromosomes, banding patterns and localization of(TTAGGG)(n) sequences by fluorescence in situ hybridization in the neotropical water rat *Nectomys* (Rodentia, Cricetidae). *Chromosome Res.* **6**: 455-462.
- Song J, Dong F, Lilly JW et al. (2001) Instability of bacterial artificial chromosome (BAC) clones containing tandemly repeated DNA sequences. *Genome* **44**: 463-469.
- Staub RW (1987) Leaf striping correlated with the presence of B-chromosomes in maize. *J. Hered.* **78**: 71-74.
- Szczerbal I, Switonski M (2003) B-chromosomes of the Chinese raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides procyonoides* Gray) contain inactive NOR-like sequences. *Caryologia* **56**: 213-216.
- Šichová J (2009) Analýza pohlavního chromosomu Z obaleče jablečného (*Cydia pomonella*) pomocí laserové mikrodisekce. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice.
- Šichová J (2011) Srovnání molekulární divergence pohlavních chromosomů a autosomů u příbuzných druhů obalečů (Tortricidae). Magisterská práce, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity, České Budějovice.
- Tanić N, Vujošević M, Dedović-Tanić N et al. (2005) Differential gene expression in yellow-necked mice *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia) with and without B chromosomes. *Chromosoma* **113**: 418-427.
- Traut W, Marec F (1996) Sex chromatin in Lepidoptera. *Quart. Rev. Biology* **71**: 239-256.

- Traut W, Sahara K, Marec F (2007) Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sex. Dev.* **1**: 332-346.
- Traut W, Sahara K, Otto DT et al. (1999) Molecular differentiation of sex-chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma* **108**: 173-180.
- Traut W, Scholz D (1978) Structure, replication and transcriptional activity of sex-specific heterochromatin in a moth. *Exp. Cell Res.* **113**: 85-94.
- Traut W, Weith A, Traut G (1986) Structural mutants of the W chromosome in *Ephestia* (Insecta: Lepidoptera). *Genetica* **70**: 69-79.
- 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.
- Zurita S, Cabrero J, López-León MD et al. (1998) Polymorphism regeneration for a neutralized selfish B chromosome. *Evolution* **52**: 247-277.

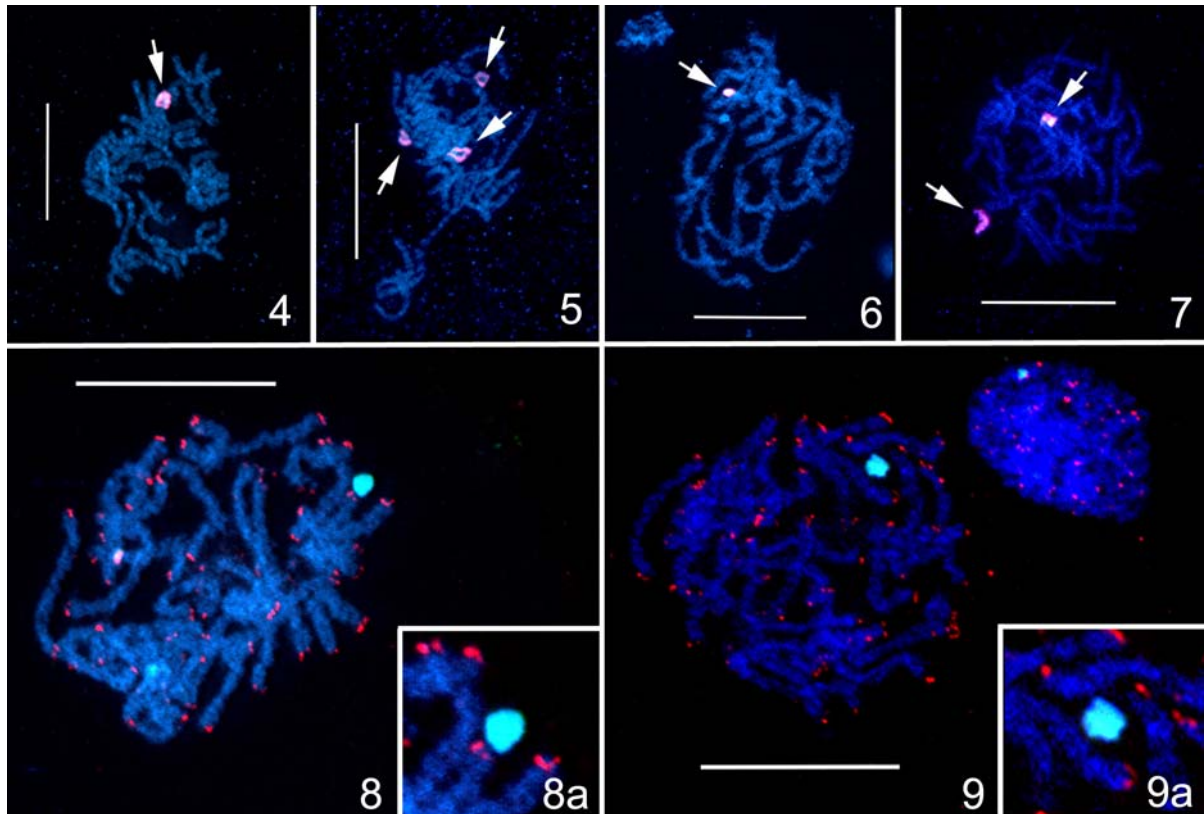
8. Přílohy



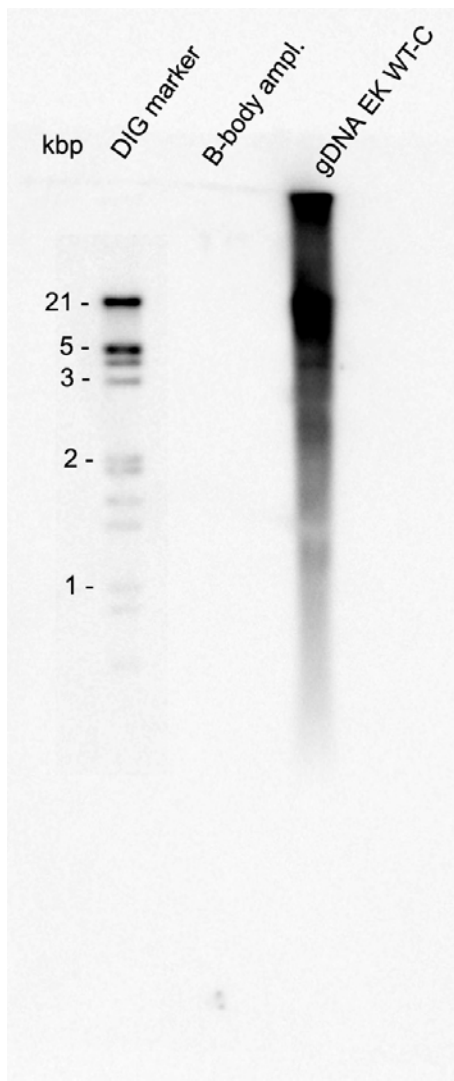
Obr. 1-2. Heterochromatinová tělíška (označená šipkami), pozorovaná na preparátech z Malpighiho trubic *Ephestia kuehniella* kmene WT-C a WT-C02. Měřítko představuje 20 μm . 1a - samec WT-C, 1b - samice WT-C, 2a - samec WT-C02, 2b - samice WT-C02.



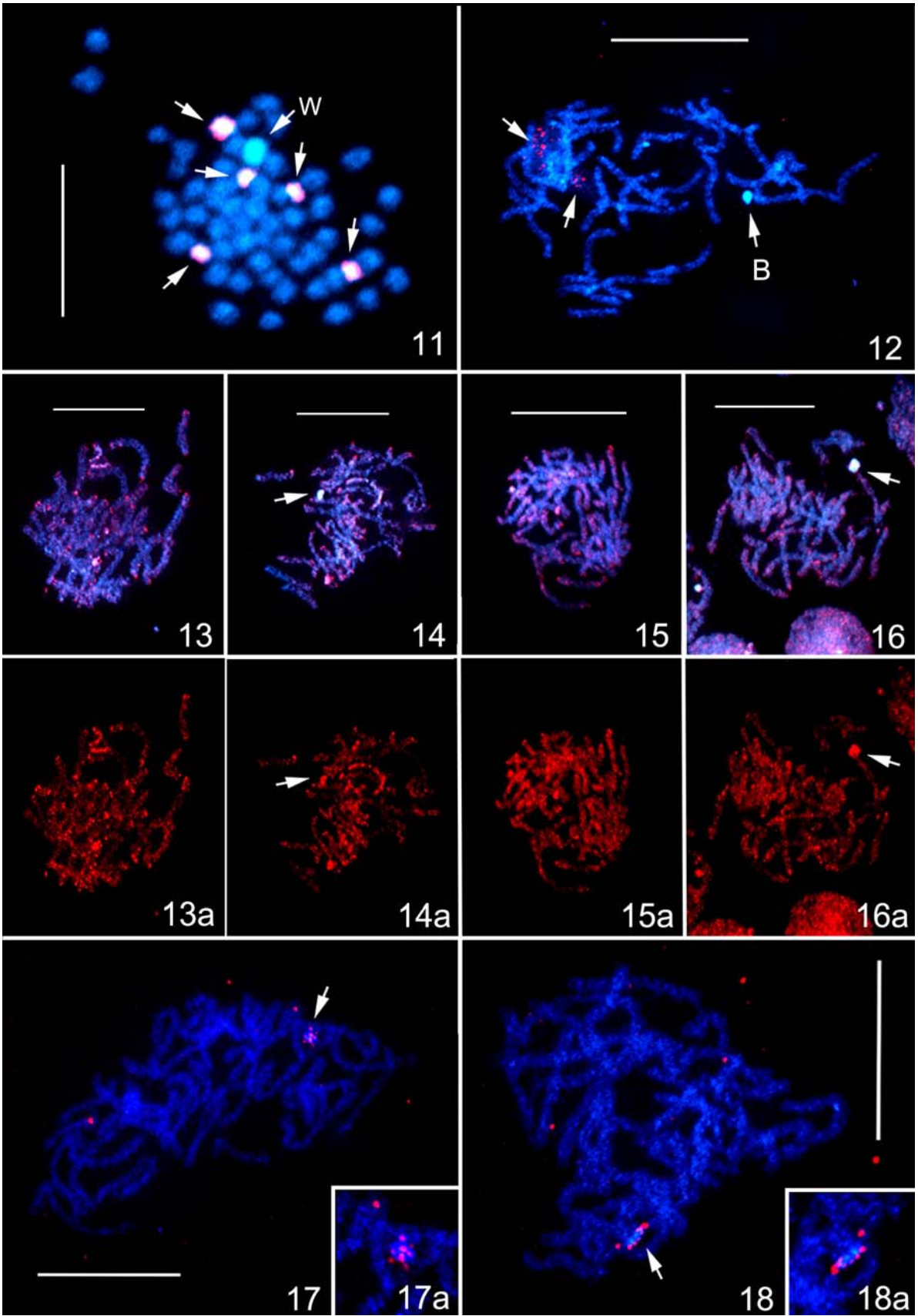
Obr. 3. DNA B-chromosomů vyřezaných laserovou mikrodisekcí po amplifikaci WGA 4 soupravou. Vzorek byl analyzován na 1% agarózovém gelu a jako velikostní marker byl použit 1 kb Plus Ladder (Invitrogen).



Obr. 4-9. Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH). Chromosomy jsou podbarveny DAPI. Měřítko odpovídá 20 μm . **4-7.** Pachytenní jádra jedinců s červeným hybridizačním signálem B-chromosomů (sonda značena fluorochromem SpectrumOrange), šipky značí B-chromosomy. Na obr. 4 a 5 jsou pachytenní chromosomy samic, na obr. 6-7 samců. V případě preparátů na obr. 4 a 6 byl použit specifický kompetitor (gDNA σ kmene WT-C). **8.** Pachytenní jádro s červenými signály přímo značené telomerické sondy (fluorochrom Cy3) a zeleným signálem přímo značené B-specifické sondy (FITC). **9.** Pachytenní jádro s červenými signály nepřímo značené telomerické sondy (biotin) a zeleným signálem nepřímo značené B-specifické sondy (DIG).



Obr. 10. Detekce přítomnosti (TTAGG)_n sekvencí na B-chromosomech pomocí Southernovy hybridizace. Jako pozitivní kontrola byla použita naštěpená gDNA ♂ zavíječů bez B-chromosomů. Jako velikostní marker byl použit DNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled (Roche).



Obr. 11-18. Fluorescenční a genomová *in-situ* hybridizace. Chromosomy jsou podbarveny DAPI. Měřítko představuje 20 μm . **11.** Mitotické jádro s červenými signály B-specifické sondy značené fluorochromem Cy3 a zeleným signálem W-specifické sondy značené fluorochromem SpectrumGreen. Šipky označují B-chromosomy a chromosom W. **12.** Pachytenní jádro s červenými signály nepřímo značené sondy na 18S rDNA motýlů (biotin). **13 - 14.** Pachytenní jádra, červené jsou hybridizační signály sondy gDNA samic zavíječů kmene WT-C (Cy3). **13.** Preparát z jedince samičího pohlaví bez B-chromosomů **14.** Preparát z jedince samičího pohlaví s B-chromosomy (označen šipkou). **15-16.** Pachytenní jádro jedince samčího pohlaví bez B-chromosomů, červené hybridizační signály sondy gDNA samců zavíječů kmene WT-C. (Cy3) **16.** Pachytenní jádro jedince samčího pohlaví s B-chromosomy, červené jsou hybridizační signály sondy gDNA samců zavíječů kmene WT-C (Cy3). B-chromosom označen šipkou. **17-18.** Pachytenní jádro s hybridizovanou sondou, připravenou z klonu K13 (červené signály, značeno biotinem). B-chromosomy s klastry hybridizačních signálů jsou označeny šipkami.