

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Nové cytogenetické markery a evoluční dynamika
karyotypů motýlů**

Diplomová práce

Bc. Irena Hladová

Školitel: RNDr. Petr Nguyen Ph.D.

České Budějovice 2015

Hladová (2015) Nové cytogenetické markery a evoluční dynamika karyotypů motýlů [New cytogenetic markers and evolution dynamics of lepidopteran karyotypes. Mgr. Thesis, in Czech] – p. 68, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

This study is focused on testing several gene families as suitable molecular markers for studying the dynamic evolution of karyotypes in the order Lepidoptera. Physical mapping of candidate markers was carried out by fluorescent *in situ* hybridization (FISH) in order to provide insight into karyotype evolution in butterflies and moths.

Finanční podpora:

Práce byla financována granty Grantové agentury České republiky reg. č. 14-22765S a 14-35819P.

Prohlášení:

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to [v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou] 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 dne 14.12.2015

.....

Irena Hladová

Poděkování:

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu naší laboratoře Františkovi Marecovi za příležitost pracovat ve skvělé laboratoři, za vždy projevovanou ochotu poradit a pomoci. Velké díky patří Petrovi za skvělé vedení, zajímavé téma, vše co mě naučil a za velikou trpělivost. Zvláštní díky patří Martině a Leo, které mi byly v laboratoři oporou a vždy znaly odpověď na moje otázky. Dále bych ráda poděkovala Marušce za péči o naše chovy a celému kolektivu naší laboratoře, především Aničce, Magdě, Jindře, Malé a Velké Mirce za vytvoření příjemné atmosféry. Dále bych chtěla poděkovat Honzíkovi za to, že mi vždy věřil a stál při mně, mým přátelům Ivet, Hrubajsovi, Verunce, Pájíkovi, Lence a Martinovi za to, že mě dokázali rozptýlit, utěšit a rozesmát. Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině za bezmeznou důvěru, finanční i psychickou podporu poskytovanou během mého studia. Ještě jednou Vám moc děkuji!

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Karyotyp motýlů	1
1.2. Pohlavní chromosomy motýlů	2
1.3. Metody studia evoluce karyotypů motýlů	2
1.3.1. Fluorescenční metody	3
1.3.2. Molekulární markery pro studium karyotypů	5
2. Cíle práce	10
3. Metody	11
3.1. Pokusný hmyz	11
3.2. Příprava chromosomálních preparátů	13
3.3. Příprava hybridizačních sond	13
3.3.1. Klonování	13
3.3.2. Značení pomocí nick translace	15
3.3.3. Značení pomocí PCR	15
3.4. Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH) s 18S rDNA sondou	15
3.5. FISH s tyramidovou amplifikací signálu (TSA-FISH)	16
3.6. Pozorování preparátů	17
3.7. Kvantitativní PCR	17
3.8. Southernova hybridizace	19
3.8.1. Příprava a štěpení genomové DNA	19
3.8.2. Southernova hybridizace	19
4. Výsledky	21
4.1. Mapování genů pro 18S rRNA a histon H3	21
4.1.1. Trichoptera a basální druhy motýlů	21
4.1.2. Cossoidea	24
4.1.3. Papilionoidea	24
4.1.4. Gelechioidea	25
4.1.5. Pyraloidea	26
4.1.6. Geometroidea	26
4.1.7. Noctuoidea	26
4.1.8. Bombycoidea	27
4.2. Distribuce genů pro 5S rRNA a U1 a U2 snRNA	28
4.3. Kvantitativní PCR	28
4.4. Southernova hybridizace	29

5. Diskuse	31
6. Souhrn	43
7. Literatura.....	45
8. Přílohy	55

1. Úvod

Chromosomální přestavby hrají významnou roli v genomové evoluci a speciaci. Speciace neboli vznik nových druhů, je komplexní proces, který vede ke vzniku bariér zamezujících genovému toku mezi nově vznikajícími druhy. Existuje mnoho faktorů ovlivňujících vznik bariér na různých úrovních. Na chromosomální úrovni jsou to právě chromosomální přestavby autosomů i pohlavních chromosomů. Jedním z efektivních mechanismů je inverze úseku obsahujícího výhodné mutace, která zabrání meiotické rekombinaci v invertovaném úseku a ochrání tak výhodný haplotyp (Faria a Navarro, 2010). Dalším mechanismem jsou chromosomální fúze, které negativně ovlivňují rekombinaci snížením počtu chiasmát během buněčného dělení (Butlin, 2005). Motýli jsou díky druhové bohatosti (téměř 160 000 popsáných druhů; van Nieuwerkerken a kol., 2011) a ekologické rozmanitosti dobrým modelem pro studium speciace a s ní spojených chromosomálních přestaveb i evoluce karyotypů.

1.1. Karyotyp motýlů

Mitotický komplement motýlů je tvořen velkým počtem malých, morfologicky uniformních chromosomů (De Prins a Saitoh, 2003; Mediouni a kol., 2004; Fuková a kol., 2005). Nejběžnější haploidní počet chromosomů je $n=30$ (Robinson, 1971), ale za ancestrální počet chromosomů v haploidním genomu se považuje $n=31$, který odpovídá počtům chromosomů u basálních druhů motýlů (Lukhtanov, 2000; Ahola a kol., 2014). Je však známo mnoho motýlích druhů, které se pyšní neobvyklými počty chromosomů. Například *Agathymus aryxna* (Hesperiidae) a *Hypothyris thea* (Nymphalidae) jsou zástupci s nejnižším počtem chromosomů $n=5$, za který jsou zodpovědné pravděpodobně chromosomální fúze (De Prins a Saitoh, 2003; Brown a kol., 2004). Na druhou stranu, *Polyommatus atlantica* (Lycaneidae) je zástupce řádu Lepidoptera s nejvyšším počtem chromosomů mezi živočichy ($n=224-226$) vzniklými chromosomálními rozpady (Lukhtanov, 2015).

Motýli a jejich sesterská skupina chrostíci mají holokinetický typ chromosomů vyznačující se absencí primární konstrikce, tj. centromery (Wolf a kol., 1997). Za správný rozchod sesterských chromatid paralelní disjunkcí během buněčného dělení zodpovídá kinetochor, který pokrývá téměř celou délku chromosomů (Murakami a Imai, 1974). Mikrotubuly dělicího vřetenka se napojí na kinetochor pokrývající část chromosomů a to zajistí, že v případě chromosomálních zlomů nedojde ke ztrátě genetického materiálu (Carpenter a kol., 2005).

1.2. Pohlavní chromosomy motýlů

Motýli mají chromosomální určení pohlaví typu *Abraxas* pojmenovaný podle píďalky angreštové, *Abraxas grossulariata* (Geometridae), u které byl tento typ dědičnosti vázané na pohlaví poprvé pozorován. Samci motýlů mají homogametické určení pohlavních chromosomů ZZ, zatímco konstituce pohlavních chromosomů samice je určena heterogameticky, tj. WZ nebo Z0. Bazální skupiny motýlů a jejich sesterská skupina chrostíci (Trichoptera) mají konstituci Z0 (Traut a Marec, 1997; Marec a Novák, 1998; Lukhtanov, 2000). Chromosom W se tak patrně vyvinul až u společného předka skupin Tischeriina a Ditrysia, zahrnující 98% všech žijících druhů. Přítomnost pohlavního chromosomu W u basálních druhů motýlů byla však zpravidla určena pouze detekcí pohlavně specifického heterochromatinu (tzv. „sex-chromatinu“ nebo též „W-body“), který je v interfázních jádrech polyploidních buněk tvořen mnoha kopiemi chromosomu W (Traut a Marec, 1996; Lukhtanov, 2000). Tato metoda je však pouze orientační, protože absence pohlavně specifického heterochromatinu v jádrech polyploidních buněk nemusí nutně znamenat i absenci chromosomu W (Šíchová a kol., 2015a). V současné době existují dvě hypotézy vzniku chromosomu W (Traut a kol., 2007; Sahara a kol., 2012). První hypotéza vysvětluje jeho vznik fúzí původního pohlavního chromosomu Z s autosomem, přičemž homolog tohoto autosomu se stal chromosomem W (Traut a Marec, 1997). Toto tvrzení podporuje krátký homologní úsek mezi chromosomy W a Z detekovaný u obaleče jablečného, *Cydia pomonella* (Tortricidae), pomocí metody BAC-FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace se sondou z umělého bakteriálního chromosomu) (Dalíková, 2009). Podle druhé teorie vznikl chromosom W z nadbytečného chromosomu B, který se následně začal párovat s chromosomem Z (Lukhtanov, 2000). Chromosom Z se svým složením více podobá autosomům, je tvořen euchromatinem a nese mnoho genů, zatímco chromosom W je tvořen převážně heterochromatinem a obsahuje mnoho repetitivních sekvencí (Fuková a kol., 2007; Vítková a kol., 2007; Traut a kol., 2013). I přes velkou morfologickou rozdílnost a značnou nehomologii se chromosomy W a Z během meiotické profáze nenáhodně párují a po počátečním vyrovnání se po celé délce vytvoří synaptonemální komplex a zajistí úplné spárování (Marec a Traut 1994; Van't Hof a kol., 2013).

1.3. Metody studia evoluce karyotypů motýlů

Jak již bylo řečeno, mitotické chromosomy motýlů jsou morfologicky velmi uniformní a nemají centromeru. Postrádají také charakteristické chromatinové vzory a je tedy těžké jednotlivé elementy identifikovat (Mediouni a kol., 2004; Fuková a kol., 2005). Vhodnějším

stádiem pro cytogenetické studium chromosomů je proto pachytene, která je součástí profáze I meiotického dělení pohlavních buněk. V tomto stádiu se homologní chromosomy párují a tvoří bivalenty, které jsou delší než mitotické chromosomy a mají patrné chromomerové vzory (Traut, 1976). Přesto zůstává identifikace individuálních chromosomů značně obtížná. Z těchto důvodů byl dlouhou dobu cytogenetický výzkum omezen na pouhé počítání chromosomů. Mezi klasické metody studia chromosomů motýlů patří například tradiční barvení Giemsovým činidlem nebo orceinem. Tyto techniky se využívají především pro zviditelnění chromosomů, případně chromomerových vzorů (Goodpasture, 1976; De Prins a kol., 2002) a detekci chromosomu W (Traut a Marec, 1997; Vítková a kol., 2007; Sadhotra, 2009). Další klasickou metodou je barvení stříbrem, kterým lze u pachytenních bivalentů detekovat transkripčně aktivní jadérko (Bigger, 1975; Bedo, 1984; Fuková a kol., 2005).

1.3.1. Fluorescenční metody

Opravdový zlom pro cytogenetický výzkum nastal až po zavedení fluorescenčních hybridizačních technik, přesněji fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a jejích modifikovaných verzí.

Klasická metoda FISH s telomerickou sondou (TTAGG)_n našla významné uplatnění pro detekci telomerických repetitivních sekvencí motýlů, ale i dalších hmyzích řádů, přispěla k objasnění evolučního původu telomer hmyzu (Sahara a kol., 1999; Vítková a kol., 2005) a je také velmi užitečná při přesném určení počtu chromosomů (Šíchová a kol., 2015; 2016; Vershinina a kol., 2015). Metoda FISH s telomerickou sondou a tyramidovou amplifikací signálu též umožnila detekci intersticiálních telomerických sekvencí motýlů jako pozůstatek chromosomálních fúzí (Rego a Marec, 2003).

Dvě varianty FISH, genomová *in situ* hybridizace (GISH) a komparativní genomová hybridizace (CGH), se osvědčily při studiu pohlavních chromosomů motýlů a identifikaci chromosomu W (Fuková a kol., 2005; Yoshido a kol., 2005a; Vítková a kol., 2007). V případě GISH se využívá značená celogenomová samičí sonda, která soupeří s nadbytkem neznačené samčí genomové DNA o cílové sekvence na chromosomech. Výsledkem je zvýraznění specifických samičích sekvencí, tj. chromosomu W (Sahara a kol., 2003b; Fuková a kol., 2005; Šíchová a kol., 2015). Telomerická FISH v kombinaci s metodou GISH pak umožnila studium mnohočetných pohlavních chromosomů motýlů (Yoshido a kol., 2005a; Šíchová a kol., 2016). Princip metody CGH spočívá v soupeření odlišně značených celogenomových sond o cílové sekvence v genomu. U motýlů se často používá pro analýzu sekvencí složení pohlavních chromosomů, kdy spolu soupeří samčí a samičí DNA (Mediouni a kol., 2004; Fuková a kol.,

2005; Vítková a kol., 2007). Např. Vítková a kol. (2007) pomocí CGH srovnali podobnost chromosomu W u několika zástupců z čeledi Pyralidae a odhalili 2 typy repetitivních sekvencí na chromosomu W, W-specifické sekvence a sekvence nacházející se i jinde v genomu, avšak akumulované na chromosomu W. Distribuce a poměr těchto sekvencí je druhově specifický (Traut a kol., 1999; Vítková a kol., 2007). Další možností detekce chromosomu W je FISH s W-specifickou sondou připravenou laserovou mikrodisekcí sex chromatinu z polyploidních interfázních jader (Fuková a kol., 2007; Vítková a kol., 2007).

Významným mezníkem ve výzkumu chromosomů motýlů bylo zveřejnění sekvence genomu bource morušového, *Bombyx mori* (Bombycidae) (Mita a kol., 2004; Xia a kol., 2004). Wu a kol. (1999) zkonstruovali dvě knihovny bakteriálních umělých chromosomů (BAC) bource a screeningovou metodou identifikovali známé geny v jednotlivých klonech. Tyto BAC-klony využili Yoshido a kol. (2005b) jako sondy a metodou BAC-FISH je mapovali jako markerové geny jednotlivých chromosomů bource. Následně bylo do vazebné mapy ukotveno 523 BAC-kontigů nesoucích 342 známých genů a 85 sekvencí EST („Expressed Sequence Tag“) (Yasukochi a kol., 2006). Yamamoto a kol. (2008) ještě navýšili rozlišení mapy genomu *B. mori* integrováním vazebné mapy obsahující 1775 markerů SNP („single nucleotide polymorphism“) a pokryli tak 76% obsahu genomu pomocí BAC klonů. Kvalitní referenční genom *B. mori* a zkonstruovaná vazebná mapa odstartovaly řadu srovnávacích studií zaměřených na evoluci karyotypů nemodelových druhů motýlů.

Komparativní analýzy genomických dat s referenčním genomem *B. mori* a využití BAC-FISH prokázaly vysoce zachovanou syntentii genů na chromosomech několika druhů motýlů včetně pořadí genů. Zachovaná syntenie genů byla zjištěna jak u druhů z nadčeledi Bombycoidea, čili příbuzných s *B. mori* (Yasukochi a kol., 2009; Yoshido a kol., 2011), tak u druhů z evolučně vzdálených skupin, například Papilionoidea (Jiggins a kol., 2005; Pringle a kol., 2007; Beldade a kol., 2009), Yponomeutoidea (Baxter a kol., 2011), Noctuoidea (Sahara a kol., 2013a) a Geometroidea (Van't Hof a kol., 2013) (Obr. 2). Nejčastěji detekované typy chromosomálních přestaveb byly inverze a translokace nebo chromosomální fúze a rozpady (Yoshido a kol., 2011; Van't Hof a kol., 2013).

BAC-FISH se osvědčila jako spolehlivá a robustní metoda pro fyzické mapování genů a studium syntenie. Věrohodnost signálů je zapříčiněna dlouhým insertem (100-200 kb) použitým jako sonda (Yasukochi a kol., 2009). Dalším způsobem mapování chromosomů nemodelových organismů je FISH s amplifikací signálu pomocí tyramidu (TSA-FISH), která se vyznačuje velikou citlivostí detekce a nevyžaduje dostupnost nákladné BAC-knihovny.

Carabajal a kol. (2014) využili TSA-FISH k detekci tzv. „single-copy“ genů. Dokázali tak detekovat unikátní sekvence o velikosti 1300 bp na chromosomu Z obaleče jablečného, *Cydia pomonella* (Tortricidae). TSA-FISH tedy představuje nadějnou metodu pro mapování unikátních míst, malých repetit a krátkých úseků v genomu.

1.3.2. Molekulární markery pro studium karyotypů

Rozeznávání chromosomů je problematické nejenom u motýlů, ale i u dalších živočišných a rostlinných druhů. A jelikož je konstrukce BAC-knihoven velmi finančně i technologicky náročná, jsou k dispozici jen pro omezený počet druhů. Proto jsou stále častěji při studiu karyotypové evoluce využívány genové rodiny a specifické repetice. Jejich výhoda spočívá v universálním a širokém použití a nižším nákladům. Při výběru vhodných markerů musí být bráno v úvahu, že universalita různých markerů se může lišit. Například ribosomální rDNA je velmi konzervovaná na nukleotidové úrovni, ale nukleotidové sekvence histonových genů mohou být druhově variabilní. Využití různých genových rodin jako cytogenetických markerů pro FISH umožňuje identifikaci některých specializovaných chromosomů. Mapováním těchto chromosomů u evolučně blízkých i vzdálených druhů je pak možné identifikovat např. změny v organizaci genomu, které mohou hrát klíčovou roli v mnoha evolučních procesech. V dnešní době se využívá celá řada molekulárních markerů různých typů a velikostí (Nguyen a kol., 2010; Cabral-de-Mello a kol., 2010; Bueno a kol., 2013; Šíchová a kol., 2015).

1.3.2.1. Ribosomální DNA (rDNA)

Nejvyužívanějším molekulárním markerem pro studium karyotypové evoluce jsou pravděpodobně geny pro hlavní ribosomální RNA (rDNA). Ribosomální DNA je přepisována do rRNA, která spolu s proteiny tvoří ribosomy, na kterých probíhá translace mRNA v aminokyselinovou sekvenci. Geny pro hlavní ribosomální rDNA tvoří transkripční jednotku skládající se z 18S, 5,8S a 28S genů, která se vyskytuje v genomu v desítkách až stovkách tandemově uspořádaných kopií. Díky konzervované nukleotidové sekvenci a celkové velikosti klastru je rDNA vhodným a spolehlivým markerem. FISH experimenty s použitím 18S rDNA sondy (případně 18S-28S) úspěšně identifikovaly chromosomy u rostlin (Schmidt a kol., 1994; Krishnan a kol., 2000; Cai a kol., 2006; Dhar a kol., 2006) a živočichů (např. Vitturi a kol., 2000; Libertini a kol., 2006; Grozeva a kol., 2011; Palacios-Gimenes a kol., 2013; Chirino a Bressa, 2014) včetně motýlů (Nguyen a kol., 2010; Šíchová a kol., 2013, 2015, 2016; Vershinina a kol., 2015). Nguyen a kol. (2010) provedli rozsáhlou studii distribuce rDNA genů u 18 druhů motýlů pomocí FISH s 18S rDNA sondou. V rámci řádu Lepidoptera byla odhalena dynamická evoluce rDNA genů s výjimkou nadčeledi Noctuoidea, která vykazovala

neobyčejnou uniformitu v distribuci rDNA. Nejčastěji tvořila rDNA jeden intersticiální nebo dva terminální klastry (Nguyen a kol., 2010). Jelikož ve studii nebyly zahrnuti zástupci basálních skupin motýlů, nebylo možné určit ancestrální stav distribuce ribosomálních genů. Šíchová a kol. (2013) použila rDNA jako marker při studiu karyotypové evoluce u blízce příbuzných druhů obalečů basální čeledi Tortricidae. V haploidním genomu všech zkoumaných druhů byl zaznamenán jediný rDNA lokus, který se však lišil svou polohou na chromosomu. Zajímavou výjimkou byl obalečik jednopásný *Eupoecilia ambiguella* s klastry rDNA na pohlavních chromosomech W a Z. Přítomnost klastru rDNA na pohlavních chromosomech W a Z je velmi vzácná a prozatím byla detekována pouze u jediného dalšího druhu, okáče *Bicyclus anynana* (Nymphalidae) (Van't Hof a kol., 2008). Unikátní výjimkou v této čeledi je též obaleč jablečný, *C. pomonella*, u něhož byly již dříve lokalizovány 2 klastry rDNA na opačných koncích stejného autosomu (Fuková a kol., 2005).

Dále byla rDNA využita jako indikátor chromosomálních změn u bělásků rodu *Leptidea*, kteří jsou známí četnými chromosomálními přestavbami. Výsledky mapování ribosomálních genů u čtyř zástupců tohoto rodu ukázaly nekonzistentnost v počtu a umístění klastrů mezi jednotlivými druhy a v případě *Leptidea sinapis* dokonce mezi potomky jediné samice, což jen potvrzuje dynamickou karyotypovou evoluci, která může hrát roli ve speciaci těchto motýlů (Šíchová a kol., 2015; 2016). Vershinina a kol. (2015) provedli cytogenetickou studii u 7 druhů modrásků rodu *Polyommatus* s velmi odlišnými haploidními počty chromosomů od $n=10$ až po $n=108$. V haploidním genomu studovaných modrásků byl pozorován jeden nebo dva lokusy. Jelikož v práci byly použity pouze mitotické komplementy, nebylo možné určit přesné pozice signálů rDNA genů. Všechny tyto práce potvrzují rychlou evoluci klastrů rDNA a vyplývá z nich, že změny v počtu klastrů rDNA zřejmě nesouvisí se změnou počtu chromosomů, ale spíše s jinými mechanismy jako například genovou konverzí (Eickbush a Eickbush, 2007) nebo ektopickou rekombinací (Nguyen a kol., 2010), která může být podporována rDNA specifickými transmobilitymi elementy (Eagle a Crease, 2012; LeRiche a kol., 2014). Schubert (1984) se zabýval mobilitou klastrů rDNA u česneku, kde pozoroval variabilitu v počtu, velikosti a umístění klastrů rDNA mezi dvěma druhy a jejich hybridy. Pozorovanou nestabilitu přímo vysvětlil aktivitou mobilních elementů v genomu (Schubert, 1984; Schubert a Wobus, 1985). Mobilní elementy byly prokázány jako příčina relokace a šíření genů hlavní rDNA i u dalších rostlinných a živočišných druhů (Eickbush and Eickbush, 2003; Penton and Crease, 2004; Kojima a kol., 2006; Roa a Guerra, 2012).

5S rDNA kóduje další ribosomální RNA, která je oproti 18S a 28S výrazně kratší, obvykle do 200 bp. Její distribuce v genomech je velmi variabilní a zpravidla nazávislá na hlavní rDNA. Tato genová rodina se nejčastěji vyskytuje v tandemových repeticích obsahující desítky až tisíce kopií (Vierna a kol., 2013). Geny mohou tvořit jeden či několik klastrů (Cabral-de-Mello a kol., 2010; Palacios-Gimenez a kol., 2013), nebo jsou rozptýleny po genomu (Vierna a kol., 2013). Také byly popsány případy, kdy byla 5S rDNA ve vazbě s jinými genovými rodinami, například s snRNA (malé jaderné RNA) (Manchado a kol., 2006; Vierna kol., 2011; Anjos a kol., 2014) nebo s histony (Eirín-Lopez a kol., 2004; Cabral-de-Mello a kol., 2011a). U motýlů se bohužel žádná studie doposud nezabývala mapováním a evolucí 5S rDNA, přestože se tato genová rodina osvědčila jako dobrý marker pro studium evoluce karyotypů díky své dynamické povaze u různých skupin hmyzu, např. rovnokřídlých (Bueno a kol., 2013; Palacios-Gimenez a kol., 2013), brouků (Cabral-de-Mello a kol., 2010; Cabral-de-Mello a kol., 2011a), mšic (Bizzaro a kol., 2000) a ploštic (Pita a kol., 2013).

1.3.2.2. snRNA

Protein kódující geny vyšších eukaryot obsahují mnoho intronů, které jsou z genu odstraněny procesem sestřihu RNA („RNA splicing“), který probíhá na tzv. spliceosomu. Spliceosom je komplex proteinů a U snRNA, tj. malých jaderných RNA bohatých na uridin („U-rich small nuclear RNA“), jmenovitě U1, U2, U4, U5 a U6. Zatímco počet genů U1 snRNA se mezi organismy může lišit, jejich sekvence je poměrně konzervovaná (Mount a kol., 2007; Gardner a kol., 2015). U některých organismů byly také nalezené rozdílné sekvenční varianty U1 snRNA v různých klastrech (Sierra-Montes a kol., 2003; Mesa a kol., 2008; Cabral-de-Mello a kol., 2012; O'Reilly a kol., 2013). Tato variabilita na úrovni nukleotidové sekvence může být způsobena odlišnou funkcí genu (O'Reilly a kol., 2013) nebo pseudogenizací (Mount a kol., 2007). Doposud byla snRNA (především U1) využita jako cytogenetický marker ke studiu evoluce karyotypů jen u několika málo organismů. U1 snRNA byla mapována na chromosomech rovnokřídlých (Palacios-Gimenez a kol., 2013; Anjos a kol., 2014), stejnonožců (Barzotti a kol., 2003), cichlid (Cabral-de-Mello a kol., 2012) a U2 snRNA u smuhovitých ryb (Merlo a kol., 2013). U motýlů nebyly snRNA jako cytogenetické markery dosud použity. Anjos a kol. (2014) provedli rozsáhlou studii u 70 druhů z 5 čeledí řádu rovnokřídlých a ukázali, že jsou tyto geny uspořádány v tandemových repeticích. Díky této detailní studii distribuce U1 a známým fylogenetickým vztahům autoři dospěli k závěru, že jeden klastr na autosomálním bivalentu představuje patrně ancestrální stav (Anjos a kol., 2014). Anjos a kol. (2014) také navrhuji na základě výsledků z komparativní genomové analýzy dvou druhů, že U1 snRNA vznikají a zanikají tzv. procesem "birth-and-death" (Nei a

Rooney, 2005) a jejich šíření v rámci genomu způsobují mobilními elementy. Podle modelu "birth-and-death", který vysvětluje proces evoluce genových rodin, vznikají nové geny genovou duplikací. Některé duplikované geny mohou v genomu setrvat nebo jiné jsou inaktivovány nebo z genomu odstraněny (Nei a Rooney, 2005).

1.3.2.3. Histonové geny

Histony jsou proteiny s vysokou afinitou k DNA, které se podílí na mnoha důležitých procesech v buňce. Jsou zodpovědné za uspořádání DNA v jádře a regulaci exprese tvorbou nukleosomů. Nukleosom je základní strukturní jednotka chromatinu tvořená oktamerem histonových dimerů H2A, H2B, H3 a H4, okolo kterých se obtáčí vlákno DNA o délce asi 147 bazí (Lohr a kol., 1977; Roehrdanz a kol., 2010). Histon H1 se uplatňuje při organizaci DNA do struktury vyššího řádu, tzv. solenoidu. Histonové geny H2A, H2B, H3, H4 a H1 jsou zpravidla uspořádány v klastrech o čtyřech (bez histonu H1) nebo všech pěti členech (Nagel a kol., 2000; Nagoda a kol., 2005). Tyto klastry jsou uspořádány v tandemu a jsou regulovány a transkribovány jako celek, což je pro organismus z hlediska efektivity nejvýhodnější (Schienman a kol., 1998; Roehrdanz a kol., 2010). Histonové geny mohou být ve vazbě s jinými multigenovými rodinami. Roehrdanz a kol. (2010) objevili u nosatce *Anthonomus grandis* (Coleoptera), že histonové geny se nacházejí v intergenové spacerové oblasti (IGS) mezi ribosomálními geny 18S a 28S. Vazba mezi histonovými geny a geny 5S rDNA byla prokázána také u několika druhů rovnokřídlých (Cabral-de-Mello a kol., 2011b), brouků rodu *Dichotomus* (Cabral-de-Mello a kol., 2011a) a trnobříchých ryb (Silva a kol., 2013). Histonová rodina je ve srovnání s rDNA vysoce konzervativní (Turner a kol., 1988; Eirín-López a kol., 2004; Zhang a kol., 2007; Roehrdanz a kol., 2010; Cabral-de-Mello a kol., 2011b; Neto a kol., 2013; Silva a kol., 2013) a rozdíly v distribuci histonových klastrů tak lépe indikují například chromosomální inverze a translokace nebo genomové duplikace (Zhang a kol., 2007). V rámci řádu Lepidoptera byly doposud histonové geny pro studium karyotypové evoluce použity jen ve třech pracech. Šíchová a kol. (2013) se zabývali studiem karyotypů několika zástupců čeledi Tortricidae a odhalili stabilitu v architektuře genomů, která koreluje s uniformním vzorem distribuce klastru histonových genů. Další dvě studie, Šíchová a kol. (2015, 2016), se zabývaly čtyřmi zástupci rodu *Leptidea*, který je jedinečný značně nestabilním karyotypem i v rámci druhu, mnohočetnými pohlavními chromosomy a celkovou dynamickou evolucí genomu. Tyto závěry vplynuly i z výsledků mapování histonu H3 u jednotlivých druhů, které nevykazovaly stabilní vzor, nýbrž se druhově lišily pozicí, počtem i velikostí klastrů. Z výsledků obou prací vyplývá, že histonové geny jsou dobrým ukazatelem dynamiky karyotypové evoluce neboť míra jejich reorganizace se odráží v konzervovanosti či

dynamických přestavbách genomů. Nicméně pro potvrzení této hypotézy, určení ancestrálního stavu a pochopení evolučních procesů formujících karyotypy motýlů je potřeba provést detailní studie na reprezentativním vzorku motýlů.

2. Cíle práce

Evoluce motýlích chromosomů se těší dlouhodobému zájmu vědecké komunity. Jak již bylo zmíněno, studium karyotypů motýlů bylo vzhledem k jejich velikosti, absenci centromery a selhání proužkovacích technik po dlouhou dobu omezeno na pouhé počítání chromosomů. S nástupem molekulární cytogenetiky a genomiky se otevřela celá řada nových možností studia evoluce chromosomů motýlů. Například využití umělých bakteriálních chromosomů (BAC) a fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) umožňuje srovnávací mapování chromosomů. Porovnáním vazebných a fyzických map s referenčním genomem je možné identifikovat chromosomální přestavby a evoluci karyotypů mezi různými druhy (Yoshido a kol., 2005b; Yasukochi a kol., 2009). Architekturu genomu je možné v dnešní době také studovat čistě *in silico* s využitím osekvenových genomů (Mita a kol., 2004; Xia a kol., 2004; Zhan a kol., 2011; Dasmahapatra a kol., 2012; Ahola a kol., 2014).

Jelikož je sekvenování genomů a příprava knihoven BAC finančně i technologicky velmi náročné a jejich použití je omezeno jen na daný zkoumaný druh, nachází stále využití i FISH s různými typy univerzálních sond jakými jsou například geny pro hlavní ribosomální RNA (Symonová a kol., 2013; Chirino a Bressa, 2014; Sember a kol., 2015; Vershinina a kol., 2015). S rozmachem molekulární cytogenetiky roste i počet genových rodin používaných pro studium karyotypové evoluce u různých skupin hmyzu, jmenovitě histony, 5S rDNA a malé jaderné RNA (snRNA) U1 a U2 (např. Cabral de Mello a kol. 2011b, Palacios-Gimenez a kol. 2013, Anjos a kol. 2014). Cílem této práce bylo ověřit použitelnost těchto genových rodin coby indikátoru evoluční dynamiky motýlích karyotypů a zmapovat jejich distribuci u vybraných zástupců bazálních i odvozených motýlích taxonů. Dílčí úkoly zahrnovaly (i) mapování vybraných genů pomocí FISH u reprezentativního vzorku druhů, (ii) vyhodnocení výpovědní hodnoty studovaných markerů a (iii) zjištění pravděpodobného ancestrálního stavu jejich distribuce a trendů v jejich evoluci.

3. Metody

3.1. Pokusný hmyz

Zkoumané druhy byly odchyceny v přírodě nebo získány z laboratorních chovů. Všechny druhy byly chovány na hostitelské rostlině či umělé dietě. Housenky nalezené v přírodě byly umístěny do plastových krabiček a chovány s normálním nočním a denním režimem. U několika druhů byly odchyceny oplozené samice, které byly následně umístěny na hostitelskou rostlinu k vykladení. Druhy z laboratorních chovů byly drženy za specifických podmínek. Detailní popis všech druhů, jejich původu a potravy je uveden v **Tab. 1**.

Tab. 1: Seznam zkoumaných druhů.

Nadčeleď	Druh	Původ	Podmínky chovu, potrava
Limnephiloidea	<i>Glyphotaelius pellucidus</i>	Znojmo, ČR	Vodovodní voda, 15°C, bukové listy <i>Fagus</i> sp.
Hepialoidea	<i>Hepialus humuli</i> <i>Phymatopus californicus</i>	Bochov, ČR Mořská rezervace Bodega, Kalifornie, USA	Venkovní truhlík s <i>Daucus carota</i> 15°C, <i>Daucus carota</i>
Tineoidea	<i>Tineola bisselliella</i>	České Budějovice, ČR	25°C, režim světlo : tma 16 : 8 hodin, vlna
Tischeridea	<i>Tischeria ekebladella*</i>	České Budějovice, ČR	-
Yponomeutoidea	<i>Plutella xylostella</i> <i>Teinoptila gutella*</i> <i>Yponomeuta plumbella</i> <i>Yponomeuta evonymella</i> <i>Yponomeuta cagnagella</i>	Laboratorní kmen Okinawa, Japonsko Meijendel, Nizozemí Amsterdam, Nizozemí Amsterdam, Nizozemí	25°C, režim světlo : tma 16 : 8 hodin, umělá dieta - pokojové podmínky, <i>Euonymus europaeus</i> pokojové podmínky, <i>Prunus padus</i> pokojové podmínky, <i>Euonymus europaeus</i>
Gelechioidea	<i>Depresaria daucella*</i> <i>Tuta absoluta</i> <i>Limnaecia phragmitella*</i> <i>Sitotroga cerealella</i>	Tábor, ČR Laboratorní kmen, Buenos Aires, Argentina České Budějovice, ČR Laboratorní kmen, Buenos Aires, Argentina	- 25°C, režim světlo : tma 16 : 8 hodin, <i>Solanum lycopersicum</i> - 25°C, režim světlo : tma 16 : 8 hodin
Pyraloidea	<i>Ephestia kuehnuella</i>	Laboratorní kmen WT-C	Detaily v Marec (1990)
Bombycoidea	<i>Bombyx mori</i> <i>Euthrix potatoria</i> <i>Hyalophora cecropia</i>	Laboratorní kmen p50, Japan Sedlec (u Mikulova), ČR Connecticut, USA	pokojové podmínky, <i>Morus alba</i> pokojové podmínky, <i>Poaceae</i> sp. pokojové podmínky, <i>Acer platanoides</i>
Gracillaroidea	<i>Cameraria ohridella*</i>	České Budějovice, ČR	-
Cossoidea	<i>Cossus cossus*</i>	České Budějovice, ČR	-
Papilionoidea	<i>Aglais urticae</i> <i>Inachis io</i> <i>Gonepteryx rhamni*</i> <i>Pieris brassicae</i> <i>Pieris rapae</i>	Vrábče, ČR Levín, ČR Levín a České Budějovice, ČR Levín, ČR Levín, ČR	pokojové podmínky, <i>Urtica dioica</i> pokojové podmínky, <i>Urtica dioica</i> - pokojové podmínky, <i>Brassica napus</i> pokojové podmínky, <i>Brassica oleracea</i>
Noctuoidea	<i>Cerura vinula</i> <i>Phalera bucephala*</i> <i>Spodoptera frugiperda</i>	Chrudim, ČR České Budějovice, ČR Laboratorní kmen R (FLR), D. Heckel, Jena, Německo	pokojové podmínky, <i>Salix alba</i> - 25°C, režim světlo : tma 16 : 8 hodin, umělá dieta
Geometroidea	<i>Abraxas glosulariata</i> <i>Biston betularia</i>	Zlív, ČR I. Saccheri, Liverpool, VB	Pokojové podmínky, <i>Ribes rubrum</i> pokojové podmínky, <i>Betula</i> sp.

*U těchto druhů byly larvy sbírané v terénu ihned použity.

3.2. Příprava chromosomálních preparátů

Meiotické a mitotické chromosomy byly získány ze samčích nebo samičích gonád larev 4-5. instaru. Výjimkou byl pouze žluťásek řešetlákový *Gonepteryx rhamni*, u kterého byly chromosomální preparáty připraveny z dospělců. Detailní postup je popsán v Mediouni a kol. (2004). Stručně, pohlavní orgány byly pitvány ve fyziologickém roztoku (Lockwood, 1961), následně hypotonizovány 10 minut v hypotonizačním roztoku (0,075M KCl) a 15 minut fixovány ve fixáži etanol-chloroform-kyselina octová v poměru 6:3:1. Materiál byl poté rozptýlen po sklíčku v kapce 60% kyseliny octové pomocí wolframových jehel za použití plotýnky vyhřáté na 45°C. Takto připravené chromosomální preparáty byly odvodněny v etanolové řadě (70%, 80% a 100% etanol, 30-60 s každý) a uchovány v -20°C nebo -80°C pro další použití.

3.3. Příprava hybridizačních sond

3.3.1 Klonování

Částečné sekvence genů 18S a 28S rDNA byly amplifikovány pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) z genomové DNA obaleče jablečného, *C. pomonella*, s použitím specifických primerů (**Tab. 2**). Druhově specifické sekvence histonu H3 byly získány pomocí PCR s párem degenerovaných primerů (**Tab. 2**) a druhově specifickou genomovou DNA jako templátem, pokud byl k dispozici materiál. V případě *P. californicus* nebyl k dispozici materiál na izolaci gDNA, a tak byla použita sonda z *H. humuli*. Podobný případ nastal u *P. rapae* a *P. brassicae*, kde byla použita sonda připravená z blízkce příbuzného druhu *P. napi*, a u zástupců čeledi Yponomeutidae, kde byla sonda z *Y. evonymella* použita u *Y. cagnagella*.

Geny pro 5S rRNA a U1 a U2 snRNA byly amplifikovány u obaleče jablečného a bource morušového pomocí specifických nebo degenerovaných primerů (**Tab. 2**) a samčí gDNA sloužící jako templát. Genomová DNA všech druhů byla extrahována standardní fenol-chloroformovou metodou (Dalíková, 2009) nebo kitem NucleoSpin Tissue XS (Macherey-Nagel, GmbH & Co KG, Düren, Germany).

Tab. 2: Přehled primerů použitých pro amplifikaci a značení fragmentů.

Gen	T _A	Forward primer	Reverse primer	Původ
<i>18S</i>	58°C	CGATACCGCGAATGGCTCAATA	ACAAAGGGCAGGGACGTAATCAAC	Fuková a kol., 2005
<i>28S</i>	58°C	GCAGATCTTGGTGGTAGTAGCA	GATGTACCGCCCCAGTCAAA	Tato práce*
<i>U1</i>	58°C	CAAAAATTACGCGTCCGAG	CGTAGGGGACACCGTGAT	Tato práce
<i>U2</i>	58°C	AGATCAAAGTGTAGTATCTGTTC	CTGCAATGCCGGGCCAC	Tato práce
<i>5S</i>	58°C	GCCAACGTCCATACCAAYGYTGA	AAGCCAACGNCACGYGGT	Tato práce
<i>H3</i>	62°C	ATGGCNCGTACNAARCARAC	TANGCACGYTCNCGGAT	Šichová a kol., 2013

*L.Z. Carabajal Paladino, nepublikováno

PCR reakce o celkovém objemu 20 μ l obsahovala 1x TaKaRa *ExTaq* pufr, 1 μ M primery, 0,2 mM směs nukleotidů, 100 ng templátové gDNA a 0,5 U TaKaRa *ExTaq* DNA polymerázy (TaKaRa, Otsu, Japonsko). Reakce proběhly v termocykléru T professional TRIO (Biometra, Göttingen, Německo). Teplotní profil reakce sestával z počáteční denaturace při teplotě 94°C 3 min, následovalo 30 cyklů sestávajících z denaturace při 94°C 30 s, nasedání oligonukleotidů při 58°C (62°C) 30 s a syntézy při 72°C po 90 (40) s. Závěrečná syntéza při 72°C trvala 3 min. Produkty PCR byly separovány na 1,5% agarózovém gelu v 1x TAE pufru. Produkty o očekávaných velikostech byly z gelu vyříznuty a přečištěny pomocí soupravy Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison WI, USA) dle návodu výrobce. Takto získané fragmenty byly ligovány do vektoru Promega pGem T-Easy Vector (Promega, Madison, USA) dle návodu výrobce. Ligační směsi o objemu 10 μ l obsahovaly 100 ng produktu PCR, 50 ng vektoru, 3 U T4 DNA ligázy a 1x ligační pufr. Ligační reakce byly inkubovány při teplotě 4°C přes noc. Druhý den byla provedena transformace vektoru do chemicky kompetentních buněk *E. coli* kmene DH5 α teplotním šokem dle doporučení výrobce. Transformované buňky byly kultivovány na Petriho miskách s 1,5% LB agarem obsahujícím 143 mM sodné soli ampicillinu, 0,5mM IPTG (isopropyl β -D-thiogalactosid) a 122 mM X- Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid). Kolonie nesoucí insert, které byly identifikované na principu modrobílé selekce, byly přeočkovány na čistou Petriho misku. Délky zaklonovaných insertů byly ověřeny pomocí PCR s univerzálními primery M13. Vybrané kolonie byly následně inokulovány do 3 ml tekutého LB média s 143 mM ampicilinem a kultury byly inkubovány při teplotě 37 °C za stálého třepání přibližně 14 h. Izolace plasmidů z bakterií byla provedena kitem NucleoSpinPlasmid (Macherey – Nagel, Düren, Německo) podle návodu výrobce. Koncentrace vzorků byly změřeny na spektrofotometru Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) a inserty byly osekvenovány Sangerovou metodou firmou SEQme s.r.o. (Dobříš, ČR).

3.3.2. Značení pomocí nick translace

Sekvence 18S a 28S rDNA byly následně z plasmidu amplifikovány metodou PCR za výše uvedených podmínek pomocí specifických primerů a 1-10 ng plasmidové DNA jako templátu. Reamplifikovaná 18S a 28S rDNA byly přečištěny pomocí soupravy Wizard® SV Gelard PCR Clean-Up System (Promega, Madison, USA) dle doporučení výrobce. Značení takto získané DNA bylo provedeno pomocí značícího systému Nick Translation Kit (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA). Reakce o finálním objemu 25 µl obsahovala 500 ng DNA, 40 µM dATP, 40 µM dCTP, 40 µM dGTP, 14,4 µM dTTP a 25,6 µM biotin-16-dUTP pro 18S nebo digoxigenin-11-dUTP pro 28S (Roche Diagnostics, Basilej, Švýcarsko), 1x nick translační pufr a 5 µl enzymatické směsi. Značící reakce probíhala při teplotě 15°C 105 min a následně byly inaktivovány při 70°C 10 min.

3.3.3. Značení pomocí PCR

Značení pomocí PCR bylo provedeno v případě genů pro histon H3, 5S rRNA, U1 a U2 snRNA pro TSA-FISH a Southernovu hybridizaci. Značící reakce pro TSA-FISH o finálním objemu 25 µl obsahovala 1x *ExTaq* pufr, 1-10 ng plasmidové DNA, degenerovaných primerů, 40 µM dATP, 40 µM dCTP, 40 µM dGTP, 14,4 µM dTTP, 25,6 µM značených nukleotidů Fluorescein-12-dUTP (PerkinElmer and Analytical Sciences, Boston, MA, USA) pro TSA-FISH nebo digoxigenin-11-dUTP (Roche Diagnostics) pro Southernovu hybridizaci a 0,25 U TaKaRa *ExTaq* DNA polymerázy (TaKaRa, Otsu, Japan). PCR reakce proběhla za podmínek uvedených výše. Amplifikované sondy byly dále přečištěny pomocí gelové filtrace na sefadexu G-50 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

3.4. Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) s 18S rDNA sondou

FISH experimenty s 18S rDNA sondou byly provedeny dle Fuková a kol. (2005) a Nguyen a kol., (2010). Stručně, chromosomální preparáty byly vyjmuty z mrazáku a odvodněny v ethanolové sérii (70%, 80%, a 100%, 30-60 s každý). Pro odstranění nadměrného množství RNA byly preparáty ošetřeny roztokem RNázy A (100 µg/ml) a inkubovány v 5x Denhardtovo reagens (0,1% polyvinylpyrolidol, 0,1% BSA, 0,1% Ficoll 400) při 37°C 30 min za mírného třepání ve vodní lázni. Následná denaturace preparátů probíhala 3,5 min při 68°C v 70% formamidu v 2x SSC. Preparáty byly po denaturaci opět odvodněny v ethanolové řadě. Hybridizační směs obsahovala v 10 µl 30 ng 18S rDNA sondy, 25 µg sonikované DNA lososích spermii v 50% deionizovaném formamidu a 10% dextran sulfátu. Denaturace hybridizační směsi byla provedena ve vodní lázni o teplotě 90°C 5 min a po zchlazení na ledu aplikována na připravené preparáty. Hybridizace probíhala ve vlhké komůrce při 37°C přes

noc. Druhý den byl k detekci signálů použit streptavidin konjugovaný s Cy3 (cyanin 3) (ředění s blokovacím roztokem 2,5% BSA v 4x SSC, 1:1000) (Jackson ImmunoRes. Labs. Inc, West Grove, PA, USA), který byl s preparáty inkubován 30 min při pokojové teplotě. Pro zesílení hybridizačních signálů byl použit antistreptavidin (ředění s blokovacím roztokem, 1:25) (Vector Labs. Inc, Burlingame, CA, USA). Inkubace probíhala 20 min při 37°C. Druhá detekce signálů se streptavidinem konjugovaným se Cy3 (ředění s blokovacím roztokem, 1:1000) byla provedena stejným způsobem jako předešlá. Chromosomy byly nakonec nabarveny směsí DAPI (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) v DABCO (Sigma-Aldrich) o koncentraci 0,5 µg/ml a překryty krycím sklíčkem. Hrany sklíčka byly následně zatřeny lakem na nehty a preparáty skladovány ve tmě při teplotě 4°C.

Do hybridizační směsi pro dvojitou FISH bylo přidáno po 30 ng obou sond. Samotný experiment byl proveden stejným způsobem jako pro FISH s 18S rDNA s výjimkou inkubačních podmínek detekce a amplifikace signálů. Pro první detekci signálů obou sond byla připravena směs protilátek streptavidin konjugovaný se Cy3 ředěný 1:1000 s blokovacím roztokem a Anti-DIG1 (mouse anti-digoxigenin, Roche Diagnostics) ředěný 1:100 s blokovacím roztokem. Pro amplifikaci signálů byla připravena další směs protilátek, antistreptavidin ředěný s blokovacím roztokem 1:25 a Anti-DIG2 (sheep anti-mouse Ig konjugovaný s digoxigeninem, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) ředěný s blokovacím roztokem 1:200. Pro druhé kolo detekce signálů byl připraven streptavidin konjugovaný s Cy3 v poměru s blokovacím roztokem 1:1000 a AntiDIG3 (sheep anti-digoxigenin konjugovaný s fluoresceinem, Roche Diagnostics) v poměru s blokovacím roztokem 1:200. Inkubace pro detekci i amplifikaci signálu byly prodlouženy na 1 h při teplotě 37°C.

3.5. FISH s tyramidovou amplifikací signálu (TSA-FISH)

FISH s tyramidovou amplifikací signálu byla provedena podle Carabajal Paladino a kol. (2014) s drobnými úpravami. Prvním krokem bylo odvodnění preparátů v etanolové řadě (70%, 80% a 100%, 30-60 s každý). Připravené preparáty byly ošetřeny roztokem 10 mM HCl 10 min při 37°C pro odstranění cytoplasmy, fixovány v 2% formaldehydu (přípraven čerstvě z paraformaldehydu) 10 min při pokojové teplotě a inkubovány v 1% peroxidu vodíku 30 min při pokojové teplotě. Pro odstranění nadbytečné RNA byla aplikována RNáza A (100 µg/ml), inkubace probíhala ve 37 °C 1 h. Po promytí 2x 5 min v 2x SSC byly preparáty blokovány v 5x Denhardtovo reagens (viz výše) ve vodní lázni o teplotě 37°C po dobu 30 min. Poté na ně byla aplikována hybridizační směs obsahující 10-30 ng značené sondy v 50% deionizovaném formamidu a 10% dextran sulfátu v 2x SSC a denaturace preparátu a sondy

byla provedena najednou na plotýnce o teplotě 70°C po dobu 5 min. Hybridizace probíhala přes noc při 37°C ve vlhké komůrce s 2x SSC. Druhý den byly preparáty promývány 3x 5 min v 50% formamidu v 2x SSC při 42°C ve vodní lázni, 3x 5 min v 2x SSC v pokojové teplotě a 5 min v 1x TNT pufru (0,1 M Tris-Cl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) v pokojové teplotě, vše za mírného třepání. V dalším kroku byla reakce na preparátech blokována pomocí blokovacího pufru TNB (0,1 M TRIS-HCl, 0,15 M NaCl, 0,5% blokovací činidlo) (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) 30 min při pokojové teplotě. Protilátka proti fluoresceinu konjugovaná s křenovou peroxidázou („antifluorescein-HSP“, PerkinElmer) byla naředěna 1:1000 TNB pufrem, přidána na sklíčka a inkubována 1 h při 37°C. Preparáty byly poté promyty 3x 5 min v 1x TNT pufru při pokojové teplotě. Následně byl aplikován roztok tyramidu ředěný 1:50 v 1x amplifikačním rozpouštědle (TSA Plus Fluorescein system, PerkinElmer). Inkubace s tyramidem trvala 5-10 min a poté byly preparáty opět promyty 3x 5 min v 1x TNT pufru. Na závěr byly preparáty opláchnuty ve vodě s 1% Kodak PhotoFlo (Sigma-Aldrich). Chromosomy byly nabarveny směsí DAPI v DABCO o koncentraci 0,5 µg/ml a překryty krycím sklíčkem

3.6. Pozorování preparátů

Výsledky FISH experimentů byly dokumentovány mikroskopem Zeiss Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss Jena, Germany) vybaveným vhodnými filtry. Černobílé fotografie byly pořízeny pomocí kamery Olympus CCD XM10 vybavené softwarem cellSens 1.9 (Olympus Europa Holding, Hamburg, Germany). Fotografie byly pořízeny pro každý fluorochrom zvlášť a poté byly uměle obarveny a upraveny v programu Adobe Photoshop CS4, version 11.0.

3.7. Kvantitativní PCR

Kvantitativní Real-time PCR (qPCR) byla provedena za účelem zjištění počtu kopií genů pro 18S rRNA, histonu H3, 5S rRNA a U1 a U2 snRNA v genomu obaleče jablečného, *C. pomonella* a bource morušového, *B. mori*. Samčí genomová DNA z obou druhů byla použita jako templát pro qPCR experimenty. V případě *C. pomonella* byly izolovány tři nezávislé biologické vzorky pomocí kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen, Hilden, Německo) dle instrukcí výrobce a u *B. mori* standardní fenol-chloroformovou metodou (Dalíková, 2009). Dva autosomální unikátní geny, elongační faktor *1a* (*Ef-1a*) a *Acetylcholinesteráza-1* (*Ace-1*), byly použity jako referenční geny (Nguyen a kol., 2013). Využití dvou (nebo více) referenčních genů umožňuje věrohodnější srovnání a spolehlivější vyhodnocení experimentu (Hellemans a kol, 2007). Sekvence všech genů obaleče jablečného

byly získány v rámci této práce (viz výše) nebo z databáze Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) a sekvence genů bource morušového byly získány z databáze KAIKObase (<http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/>). Primery pro qPCR experimenty (**Tab. 3**) byly navrženy v programu NCBI Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Experimenty byly provedeny v 96-jamkové PCR destičce (semi-skirted FrameStar, Wotton, UK) s krycími fóliemi Adhesive Clear Seal (MuLTI, 4titude, Wotton, UK). Reakce probíhaly v termocykléru C1000 Thermal cycler CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Každá reakce o finálním objemu 25 µl obsahovala 1x SYBR Premix *ExTaq* II (Perfect real Time) (TaKaRa, Otsu, Japonsko), 0,4 µM forward a reverse primery a 150 ng templátové gDNA. Profil reakce se skládal z počáteční denaturace 3 min při 95°C, kterou následovalo 45 cyklů denaturace při 94°C 15 s, nasedání primerů při 58°C 30 s a elongace při 72°C 30 s. Reakce byla zakončena závěrečnou elongací, při které se teplota syntézy postupně zvyšovala z 65°C na 95°C každých 5 sekund o půl stupně. Kalkulace účinností primerů byly provedeny na základě série ředící řady templátové gDNA (1x, 10x, 100x a 1000x). Účinnosti primerů byly zahrnuty do následné analýzy. qPCR experimenty všech genů včetně referencí byly provedeny najednou ve třech opakováních tří nezávislých biologických vzorků. Finální relativní hodnota obou referenčních genů byla získána z aritmetického průměru triplikátů:

$$Std_f = \sqrt{Std_1 \times Std_2}$$

kde Std_1 a Std_2 jsou aritmetické průměry triplikátů referenčních genů 1 a 2. Výsledné počty kopií všech zkoumaných genů byly určeny podle vzorečku:

$$R = \frac{(1 + E_{Ref})^{CtReference}}{(1 + E_{Target})^{CtTarget}}$$

kde R je relativní počet kopií daného genu, E je účinnost primerů a Ct je tzv. Ct hodnota („threshold cycle“; cyklus amplifikace, ve kterém intenzita fluorescence reakce překoná prahovou hodnotu). Analýza získaných dat byla provedena v programu CFX Manager Software (Bio-Rad) a Microsoft Office Excel 2003, kde byly vypočítány relativní počty kopií genů ve vztahu k relativní hodnotě referenčních genů.

Tab. 3: Primery použité pro kvantitativní PCR pro referenční i zkoumané geny.

<i>Druh</i>	<i>Gen</i>	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
<i>Cydia pomonella</i>	<i>Ef-1a</i>	CTGGTTCAAGGGATGGCAGA	ACCAATACCGCCGATTTTGT
	<i>Ace-1</i>	CTGCCACATTCATGCGTTCA	ACCCAAAGCATAACAGCTGC
	<i>U1</i>	CAAAAATTACGCGTCCGAG	CGTAGGGGACACCGTGAT
	<i>U2</i>	AGTG TAGTATCTGTCTTTTCAGC	CCGTGACGGGAGTGGAG
	<i>5S</i>	CCAACGTCCATACCATGCTGAAT	TCACCCATCCAAGTACTGACCT
	<i>18S</i>	ACCGCAACAATTTTAGTATACGC	AATTGGAGGGCAAGTCTGGT
<i>Bombyx mori</i>	<i>Ef-1a</i>	AAATTGCTGAAATATTGGCACTCT	CCTCAGCACTGCATTTTCAC
	<i>Ace-1</i>	GCCTTTGGACGGGAATATTTA	CGTAGACCACGACCAACTGA
	<i>U1</i>	TACTCCATTGCACTGCGGAG	AATTACGCGTCCGAGTTACCC
	<i>U2</i>	CGGCCTTTTGCTAAGATCA	GGAGCGAGCCCCTAACATC
	<i>H3</i>	CGTCTCGTCCGTGAGATAGC	TTCACCTTGATTCTGCGGG
	<i>18S</i>	AACGAGGAACAATTGGAGGG	AAACGTGTCAGTATCACCCG

3.8. Southernova hybridizace

3.8.1. Příprava a štěpení genomové DNA

Southernova hybridizace byla provedena za účelem zjištění distribuce genů pro histon H3, 5S rRNA a U1 a U2 snRNA v genomu obaleče jablečného. Samčí genomová DNA byla izolována z několika kukel fenol-chloroformovou metodou (Dalíková, 2009). Pro každý gen byly navrženy 3 kombinace párů restrikčních enzymů. Kombinace dvou restriktáz s delší rozpoznávací sekvencí zajistí optimální délku fragmentů DNA pro kapilární přenos na membránu. Štěpení gDNA (5 µg/vzorek) probíhalo při teplotě 37°C přibližně 16 hodin. Kombinace restrikčních enzymů a použité pufrů jsou uvedeny v **Tab. 4**. Enzymy byly navrženy tak, aby neštěpily v sekvenci daných genů ani v mezerníkových oblastech v případě genů 5S rDNA, U1 a U2 snRNA (Příloha 3).

Tab. 4: Seznam genů, použitých restrikčních enzymů a pufrů.

<i>Gen</i>	<i>Restrikční enzymy</i>	<i>pufr</i>	<i>Původ pufrů a enzymů</i>
<i>U1, 5S</i>	<i>Not I + Pst I</i>	H+BSA+Triton	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
	<i>BamH I + Sal I</i>	CutSmart	NEB, Ipswich, MA, USA
	<i>Afe I + BamH I</i>	CutSmart	NEB, Ipswich, MA, USA
	<i>BspH + Afe I</i>	CutSmart	NEB, Ipswich, MA, USA
<i>U2, H3</i>	<i>EcoRI + Nsp I</i>	CutSmart	NEB, Ipswich, MA, USA
	<i>Sal I + Afe I</i>	CutSmart	NEB, Ipswich, MA, USA

3.8.2. Southernova hybridizace

Samotná hybridizace byla provedena dle práce Šíchová (2009). Digoxigeninem (DIG) značený velikostní DNA marker („DNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled“; Roche

Diagnostics) a 5 μg naštěpené genomové DNA bylo naneseo do každé jamky v 1% agarozovém gelu v 1x TBE a separováno horizontální elektroforézou po 4 h při intenzitě elektrického pole 5 V/cm vzdálenosti mezi elektrodami. Blotování na pozitivně nabitou nylonovou membránu (GE Healthcare) probíhalo asi 16 h ve 20x SSC. Dalším krokem byla prehybridizace v prehybridizačním roztoku DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics) 1 h při teplotě 42°C. Následná hybridizace s 50 ng sondy v hybridizačním roztoku DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics) byla provedena přes noc při teplotě 42°C. Stringentní odmyvací kroky probíhaly při 68°C. Signály byly amplifikovány pomocí protilátky proti digoxigeninu konjugované s alkalickou fosfatázou („Anti-Digoxigenin-AP“, (Roche Diagnostics) a detekovány inkubací s chemiluminiscenčním substrátem CDP-*Star* ready-to-use (Roche Diagnostics). Výsledná chemiluminiscence na membránách byla zaznamenána pomocí CCD kamery systému Lumi-Imager LAS-3000 (Fujifilm Life Science, Stamford, CT, USA).

4. Výsledky

Částečná sekvence genu pro 18S rRNA, který je součástí transkripční jednotky hlavní rDNA, byla izolována pomocí PCR z genomu obaleče jablečného, *Cydia pomonella*. Díky konzervované nukleotidové sekvenci 18S rDNA mohl být získaný fragment úspěšně použit jako hybridizační sonda pro fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH) u všech 24 zkoumaných druhů motýlů řazených do 13 nadčeledí a jednoho zástupce jejich sesterské skupiny Trichoptera. Jelikož se ukázalo, že nukleotidové sekvence histonu H3 se mezi studovanými druhy podstatně liší, byly částečné sekvence histonu H3 izolovány téměř u všech zkoumaných druhů. Sondy použité pro detekci histonových genů pomocí FISH s tyramidovou amplifikací signálu (TSA-FISH) tak byly v drtivé většině případů druhově specifické. Sekvence genů pro 5S rRNA a U1 a U2 snRNA byly amplifikovány pouze z genomové DNA *C. pomonella* a *B. mori*. Všechny sekvence získané v této práci jsou uvedeny v Příloze II a III.

4.1. Mapování genů pro 18S rRNA a histon H3

4.1.1. Trichoptera a basální druhy motýlů

Jediným zkoumaným zástupcem řádu Trichoptera byl v této práci chrostík *Glyptotaelius pellucidus* (Limnephilidae), který sloužil ve studovaném vzorku jako tzv. vnější skupina („outgroup“). Diploidní počet chromosomů u tohoto druhu byl již dříve stanoven na $2n = \text{♂}60/\text{♀}59$, kde rozdíl v počtu chromosomů mezi pohlavími je dán konstitucí pohlavních chromosomů u samce ZZ a u samice Z0 (Kiauta a Lankhorst, 1969). Počet chromosomů a přítomnost pohlavního univalentu nemohly být ověřeny, neboť nebyla k dispozici vhodná mitotická jádra a pachytenní bivalenty se nepodařilo dostatečně rozvolnit. Barvení pomocí DAPI zvýraznilo silné heterochromatinové bloky na pachytenních chromosomech, které u motýlů nejsou běžné (Příloha I Obr. 1b). Heterochromatinové bloky tvoří jasné chromomerové vzory, které by mohly umožnit identifikaci některých bivalentů. Hybridizace s 18S rDNA sondou odhalila v samičích pachytenních jádrech jeden terminální signál na autosomálním bivalentu (Příloha I Obr. 1a). TSA-FISH se sondou histonu H3 identifikovala tři terminální klastry na třech autosomálních bivalentech v pachytenních komplementech samic (Příloha I Obr. 1b).

V rámci nadčeledi Hepialoidea byly studovány dva druhy, hrotnokřídlec chmelový, *Hepialus humuli* a hrotnokřídlec kalifornský, *Phymatopus californicus*. Diploidní počty chromosomů samců obou druhů byly stanoveny na $2n=64$ (Voleníková, 2015). Pachytenní chromosomy po obarvení DAPI vykazovaly heterochromatinové bloky, které ale nejsou tak výrazné jako u *G. pellucidus*. Hybridizace s 18S rDNA sondou na samčích pachytenních

jádrech *H. humuli* odhalila výrazný signál na jediném bivalentu (Příloha I Obr. 1c). Signál pokrýval přibližně polovinu délky bivalentu, což naznačuje přítomnost velkého počtu rozptýlených kopií. Dvojitá FISH s 18S a 28S sondami ukázala, že se signály jednotlivých sond překrývají a tak potvrdila, že jde o rozptýlené celé transkripční jednotky (Příloha I Obr. 2c,d). Obě sondy hybridizovaly k silnému heterochromatinovému bloku, který také pokrývá asi polovinu chromosomu ve stejné oblasti (Příloha I Obr. 2c,d výřezy). TSA-FISH se sondou k histonu H3 detekovala u *H. humuli* jeden intersticiální histonový lokus. Na samčích pachytenních jádrech *P. californicus* 18S rDNA sonda hybridizovala ke koncům dvou bivalentů, kde odhalila přítomnost dvou různě velkých terminálních signálů (Příloha I Obr. 1e). Podobně jako u *H. humuli* hybridizace sondy pro histon H3 v jádrech *P. californicus* odhalila jediný bivalent nesoucí jeden intersticiální klastr v subtelomerické oblasti (Příloha I Obr. 1f).

Minovníček dubový *Tischeria ekebladella* je zástupce nadčeledi Tischerioidea, sesterské skupiny Ditrysia zahrnující 98 % žijících druhů motýlů. *T. ekebladella* má snížený diploidní počet chromosomů $2n=42$, ZZ/WZ (Lukhtanov, 2000). Analýza komplementů barvených DAPI tento počet potvrzují. Navíc byla odhalena přítomnost několika malých heterochromatinových bloků lokalizovaných většinou v subtelomerických oblastech (Příloha I Obr. 3c,d). FISH s 18S rDNA sondou identifikovala jen klastr právě v místě heterochromatinového bloku (Příloha I Obr. 3c). Histonová sonda detekovala klastr také v terminální pozici jednoho z bivalentů. Signál histonu H3 však s žádným blokem heterochromatinu nekolokalizoval (Příloha I Obr. 3d).

Reprezentantem basální ditrysijské skupiny je mol šatní *Tineola bisselliella* z nadčeledi Tineoidea. Počet chromosomů *T. bisselliella* byl stanoven na základě metafázních a pachytenních jader na $2n=60$. Mitotické chromosomy jsou velmi malé a kulovitého tvaru, na pachytenních chromosech nebyl patrný žádný chromomerový vzor. FISH s rDNA sondou na pachytenních jádrech označila bivalent nesoucí intersticiální rDNA lokus (Příloha I Obr. 3a). TSA-FISH se sondou pro histon H3 také detekovala jeden intersticiální klastr na jediném bivalentu (Příloha I Obr. 3b).

Z nadčeledi Gracillaroidea byla zkoumána klíněnka kaštanová *Cameraria ohridella* ($2n=30$) s konstitucí pohlavních chromosomů ♂ZZ/♀WZ (De Prins a kol., 2002). FISH s 18S rDNA detekovala podobně jako u *H. humuli* rozsáhlý úsek zabírající téměř polovinu jednoho chromosomového páru (Příloha I Obr. 3e). Signály byly však roztroušené a nekolokalizovaly s heterochromatinovým blokem. Dvojitá FISH s 18S a 28S sondami potvrdila rozptýlení

celých jednotek rDNA po chromosomu (Příloha I Obr. 2a). TSA-FISH se sondou pro histon H3 detekovala jeden histonový klastr v intersticiální pozici. V blízkosti hybridizačního signálu byl zvýrazněn menší heterochromatinový blok (Příloha I Obr. 3f).

Z nadčeledi Yponomeutoidea, která je sesterskou skupinou Gracillaroidea, bylo analyzováno celkem 5 druhů. Prvním z nich byl západníček polní, *Plutella xylostella* z čeledi Plutellidae. Sonda pro 18S rDNA odhalila jediný klastr na konci jednoho bivalentu v pachytenním komplementu (Příloha I Obr. 4a). Hybridizace se sondou histonu H3 zvýraznila terminální klastr na jednom z bivalentů, který se navíc překrýval se silným heterochromatinovým blokem (Příloha I Obr. 4b). Druhým zkoumaným druhem z čeledi Yponomeutidae je *Teinoptilla guttella*. Neboť chromosomální počet nebyl znám, byl v rámci této práce předběžně stanoven na $2n=62$. Chromosomy byly spočítány v mitotických metafázních jádrech jediného samce a pro potvrzení tohoto počtu je třeba analyzovat více jedinců. Všechny chromosomy byly uniformního vzhledu a velikosti bez výrazných heterochromatinových bloků. Hybridizace 18S rDNA sondy identifikovala jediný terminální klastr (Příloha I Obr. 4c). Sonda histonu H3 lokalizovala jeden klastr v intersticiální pozici (Příloha I Obr. 4d). Pro dalšího zástupce čeledi Yponomeutidae, předivku zhoubnou *Yponomeuta evonymella* a předivku brslenovou *Yponomeuta cagnagella*, je charakteristická neobvyklá konstituce pohlavních chromosomů $\text{♂}Z_1Z_1Z_2Z_2/\text{♀}WZ_1Z_2$ a s tím spojený odlišný počet chromosomů u samce a samice $2n=\text{♂}62/\text{♀}61$ (Nilsson a kol., 1988). FISH s rDNA a histonovou sondou přinesla u *Y. cagnagella* a *Y. evonymella* stejné výsledky. Sonda pro 18S rDNA identifikovala dva terminální rDNA lokusy na dvou různých bivalentech (Příloha I Obr. 4g,i), zatímco sonda pro histon H3 detekovala jediný terminální klastr histonových genů (Příloha I Obr. 4h,j). U dalšího zástupce čeledi Yponomeutidae, předivky menší, *Yponomeuta plumbella*, byl počet chromosomů určen na $2n=62$ bez identifikace konstituce pohlavních chromosomů (Puplesiene, 1993). Po obarvení samičích pachytenních jader pomocí DAPI bylo možné identifikovat pohlavní bivalent podle zvýrazněného heterochromatinového vlákna chromosomu W (Příloha I Obr. 4e). Sonda k 18S hybridizovala k jednomu klastru umístěnému intersticiálně na jediném autosomálním bivalentu. Signál se nacházel v místě malého heterochromatinového bloku (Příloha I Obr. 4e). U *Y. plumbella* hybridizace histonové sondy odhalila terminální signály na obou koncích jednoho chromosomového páru (Příloha I Obr. 4f). Chromosom nesoucí signály tvořil velmi často kruhovou strukturu spojenou právě skrze histonové lokusy.

4.1.2. Cossoidea

Nadčeleď Cossoidea byla v této studii zastoupena jediným druhem, drvoplněm obecným (*Cossus cossus*), u kterého byl stanoven haploidní chromosomální počet na $2n♂=60$. K dispozici byl však pouze jeden jedinec, a proto musí být počet chromosomů ještě potvrzen na větším vzorku. Na chromosomech nebyl patrný žádný heterochromatinový vzor. V pachytenním komplementu byl pomocí FISH na jednom z bivalentů lokalizován intersticiální klastř rDNA. Signál se nacházel přibližně ve dvou třetinách bivalentu (Příloha I Obr. 5a). Histonová sonda identifikovala v pachytenním jádře jeden terminální lokus na delším bivalentu (Příloha I Obr. 5b).

4.1.3. Papilionoidea

Z nadčeledi denních motýlů, Papilionoidea byly studovány druhy ze dvou čeledí, Pieridae a Nymphalidae. Prvním zástupcem z čeledi Pieridae je žluťásek řešetlákový, *Gonepteryx rhamni* s počtem chromosomů $2n=62$ (Robinson, 1971). FISH s rDNA sondou odhalila v samčím pachytenním jádře jeden klastř na konci autosomálního páru (Příloha I Obr. 6c). V místě hybridizačního signálu byl pozorován výrazný heterochromatinový blok (Příloha I Obr. 6c výřez). TSA-FISH s histonovou sondou pak identifikovala jeden terminální klastř histonových genů (Příloha I Obr. 6d).

Dalším zkoumaným druhem byl bělásek řepový, *Pieris rapae* s počtem chromosomů $2n=25$ (Robinson, 1971). Ribosomální DNA byla již u tohoto druhu mapována v práci Nguyen a kol. (2010), kde FISH s 18S rDNA sondou odhalila klastř ribosomálních genů na 2 homologních mitotických chromosomech. Kompaktnost a uniformní velikost mitotických chromosomů však znemožnila určení přesné pozice klastřů. Hybridizace na pachytenních preparátech, provedená v této práci, odhalila terminální signál na jediném chromosomálním páru (Příloha I Obr. 6a). Hybridizace sondy histonu H3 na samčí pachytenní komplement *P. rapae* zvýraznila terminální lokus na jednom z bivalentů (Příloha I Obr. 6b).

Také u bělásky zelného, *Pieris brassicae*, byly již karyotyp ($2n=30$) a distribuce rDNA známé z dřívějších prací (Robinson, 1971; Nguyen a kol. 2010). V rámci této práce tak byla studována pouze distribuce histonových genů. Sonda pro histon H3 odhalila v samičím pachytenním jádře jeden klastř na konci autosomálním bivalentu (Příloha I Obr. 6g). Po obarvení chromosomů pomocí DAPI byly detekovány silné heterochromatinové bloky (Příloha I Obr. 6g). Na samičích preparátech byl také pozorován pohlavní bivalent WZ (Příloha I Obr. 6g), což potvrzuje již dříve identifikovaný systém pohlavních chromosomů $♂ZZ/♀WZ$ (Traut a Marec, 1997).

U babočky kopřivové, *Aglais urticae* z čeledi Nymphalidae s chromosomálním počtem $2n=62$ (Robinson, 1971) byla pozorována neobvyklá distribuce rDNA genů. Hybridizace sondy pro 18S rRNA detekovala celkem sedm klastrů menší velikosti nesených šesti chromosomálními páry, kdy 5 bivalentů neslo po jednom terminálním signálu a jeden bivalent nesl signály na obou koncích (Příloha I Obr. 6e). Kolokalizace 18S a 28S rDNA byla ve všech lokusech prokázána dvojitou FISH, které tak potvrdila, že jde o celé transkripční jednotky hlavní rDNA (Příloha I Obr. 2b). Obdobná distribuce 18S rDNA genů byla pozorována také u blízce příbuzné babočky paví oko, *Inachis io* ($n=31$) (Robinson, 1971), u které bylo detekováno až 11 signálů (Nguyen a kol., 2010). U obou druhů byla také pomocí TSA-FISH analyzována distribuce histonových genů. U obou druhů byl identifikován intersticiální klastr na jednom z bivalentů se silným heterochromatinovým blokem (Příloha I Obr. 6f,h).

4.1.4. Gelechioidea

Z čeledi Gelechioidea byly celkem zkoumány tři druhy, makadlovka kmínová, *Depressaria daucella* ($2n=60$) (Robinson, 1971), zdobníček rákosní, *Limnaecia phragmitella* a makadlovka *Tuta absoluta* ($n=29$) (Carabajal Paladino, nepublikováno). Počet chromosomů *D. daucella* byl v této práci potvrzen na základě metafázních komplementů. Všechny chromosomy byly kulovitého uniformního vzhledu. Na samčích pachytenních chromosomech *D. daucella* byl lokalizován jediný klastr rDNA nacházející se uprostřed chromosomálního bivalentu (Příloha I Obr. 7a). Jeden intersticiální histonový lokus byl také detekován pomocí TSA-FISH se sondou pro histon H3 (Příloha I Obr. 7b).

Chromosomální počet *L. phragmitella* nemohl být řádně stanoven kvůli nedostatku mitotických jader. Dle počtu bivalentů v samčích pachytenních jádrech se však počet pohybuje mezi $n=30-32$. FISH s 18S sondou odhalila přítomnost jediného rDNA klastru lokalizovaného na konci bivalentu v místě výrazného heterochromatinového bloku (Příloha I Obr. 7c). TSA-FISH s histonovou sondou identifikovaly jeden bivalent s intersticiálně umístěným klastrem histonových genů. I v tomto případě signál kolokalizoval s heterochromatinovým blokem (Příloha I Obr. 7d).

Zajímavá distribuce histonových genů byla pozorována u *T. absoluta*, kde sonda hybridizovala k oběma koncům pachytenního bivalentu (Příloha I Obr. 7e). Podobně jako u *Y. plumbella* měl bivalent s histonovými klastry tendenci k formování kruhové struktury spojené prostřednictvím klastrů histonových genů (Příloha I Obr. 7e výřez). V mitotických jádrech však byly na sobě homologní chromosomy nesoucí histony pozičně nezávislé a nebylo patrné, že by chromosomy nesoucí histonové klastry měly tendenci se spojovat.

4.1.5. Pyraloidea

Jediným zkoumaným zástupcem nadčeledi Pyraloidea byl zavíječ moučný *Ephestia kuehniella* s haploidním počtem chromosomů $2n=60$ (Marec a Traut, 1993). U tohoto druhu TSA-FISH odhalila přítomnost intersticiálního klastru na jednom chromosomálním bivalentu. Klastr se nacházel v subterminální oblasti bivalentu v místě DAPI pozitivního bloku heterochromatinu (Příloha I Obr. 7f).

4.1.6. Geometroidea

Z nadčeledi Geometroidea byly studované dva druhy, píďalka angreštová, *Abraxas grossulariata* ($2n=56$) (Robinson, 1971) a drsnokřídlec březový, *Biston betularia* ($2n=62$) (Van't Hof a kol., 2013). Na samčích pachytenních jádrech *B. betularia* sonda detekovala na třech bivalentech tři menší terminální klastry (Příloha I Obr. 8a). Na pachytenních bivalentech nebyl patrný chromomerový vzor. Hybridizace histonové sondy na samičí jádra *B. betularia* odhalila přítomnost jednoho intersticiálního klastru na jediném autosomálním bivalentu (Příloha I Obr. 8b). Barvení chromosomů pomocí DAPI zviditelnilo pohlavní bivalent WZ díky výrazné heterochromatinové struktuře chromosomu W (Příloha I Obr. 8b).

V samčích jádrech *A. grossulariata* FISH s 18S rDNA sondou detekovala dva terminální signály nesené dvěma různými bivalenty (Příloha I Obr. 8c). Sonda pro histon H3 detekovala v pachytenních jádrech jediný klastr v intersticiální pozici (Příloha I Obr. 8d).

4.1.7. Noctuoidea

U nadčeledi Noctuoidea byly studovány zástupci čeledí Notodontidae a Noctuidae. V rámci čeledi Notodontidae, která je na bázi celé nadčeledi byly zkoumány dva druhy, hranostajník vrbový, *Cerura vinula* ($2n=42$) (Robinson, 1971) a vztyčnořitka lipová, *Phalera bucephala* ($2n=60$) (Robinson, 1971). Hybridizace rDNA sondy na samčí pachytenní jádra *C. vinula* odhalila v pachytenních jádrech přítomnost dvou klastrů lokalizovaných na koncích dvou bivalentů (Příloha I Obr. 9a). TSA-FISH se sondou pro histon H3 byla provedena na samičích pachytenních jádrech. Díky tomu mohl být identifikován WZ bivalent s jasně patrným heterochromatinovým vláknem chromosomu W (Příloha I Obr. 9b). Histonové geny byly lokalizovány v intersticiální pozici na jednom autosomálním bivalentu (Příloha I Obr. 9b).

Pro druh *P. bucephala* byly k dispozici pouze samičí preparáty. Karyotypová analýza mitotických chromosomů odhalila přítomnost jednoho chromosomu, který byl výrazně delší než ostatní (neukázáno). Vzhledem k jeho hemizygotnímu stavu je pravděpodobné, že se jedná o neo-pohlavní chromosom vzniklý patrně fúzí pohlavního chromosomu s autosomem. Pro

testování této hypotézy bude třeba dalších analýz. Hybridizace 18S rDNA sondy na samičí pachytenní komplementy *P. bucephala* odhalila přítomnost dvou terminálních klastrů nesených dvěma různými bivalenty (Příloha I Obr. 9c). TSA-FISH s histonovou sondou identifikovala v pachytenních jádrech jeden intersticiální klast (Příloha I Obr. 9d).

Z čeledi Noctuidae byl zkoumán jediný zástupce, konkrétně blýskavka kukuřičná, *Spodoptera frugiperda* s ancestrálním počtem chromosomů $2n=62$ (Monti a kol. 1998). Na samčích meiotických jádrech byl odhalen jeden intersticiální rDNA lokus (Příloha I Obr. 9e). Klast histonových genů byl lokalizován také v intersticiální poloze na jednom z bivalentů (Příloha I Obr. 9f).

4.1.8. Bombycoidea

Z nadčeledi Bombycoidea byly analyzováni zástupci tří hlavních vývojových linií, jmenovitě bourovec trávový, *Euthrix potatoria*, bourec morušový, *Bombyx mori* a martináč cekropiový, *Hyalophora cecropia*. Karyotyp *E. potatoria* z basální čeledi Lasiocampidae, který leží na bázi nadčeledi Bombycoidea, sestává z $2n=62$ chromosomů (Robinson, 1971). U tohoto druhu FISH s 18S rDNA sondou odhalila zcela unikátní distribuci rDNA genů, dva intersticiální klastry lokalizované na jediném pachytenním bivalentu, kolem kterých se formuje viditelná struktura jadérka (Příloha I Obr. 10a). Sonda histonu H3 detekovala v samčích pachytenních jádrech jeden intersticiální klast histonových genů na jediném chromosomovém bivalentu (Příloha I Obr. 10b).

U modelového druhu bourece morušového *B. mori* (Bombycidae) jehož karyotyp obsahuje $2n=56$ elementů, byla pozice jadérka neboli NOR (nucleolus organizer region) definována již v práci Yoshido a kol. (2005). Autoři rDNA lokus lokalizovali do intersticiální oblasti chromosomu 11. V této práci byla intersticiální poloha klastru potvrzena (Příloha I Obr. 10c). Hybridizace s histonovou sondou navíc odhalila přítomnost jednoho intersticiálního klastru na neznámém autosomálním páru (Příloha I Obr. 10d).

Posledním zkoumaným druhem byla *H. cecropia* z čeledi Saturniidae, jež má haploidní počet chromosomů $2n=62$ (Robinson, 1971). V samčích pachytenních jádrech byly detekovány celkem tři lokusy, které byly lokalizovány na koncích třech bivalentů (Příloha I Obr. 10e). Pozoruhodná byla u tohoto druhu distribuce histonových genů v meiotických i mitotických jádrech *H. cecropia*. Sonda pro histon H3 odhalila přítomnost tří histonových klastrů, přičemž dva z nich se nacházely na koncích jediného chromosomálního páru. Třetí klast se nacházel na konci dalšího bivalentu (Příloha I Obr. 10f). Bivalent se dvěma terminálními signály byl, stejně jako *Y. plumbella* a *T. absoluta* (viz výše), stočený do kruhu

(Příloha I Obr. 10f výřez). Jeden z terminálních signálů byl doprovázen silným blokem heterochromatinu (Příloha I Obr. 10f výřez). Druhý bivalent nesoucí jeden terminální signál byl často asociován se ostatními histonovými lokusy prostřednictvím histonových genů. Asociace klastrů histonových genů byla pozorována jak u meiotických, tak u mitotických jader, kde byly homologní i nehomologní chromosomy nesoucí signál orientovány signály k sobě (neukázáno).

4.2. Distribuce genů pro 5S rRNA a U1 a U2 snRNA

Podobně jako v případě histonových genů byla pro mapování krátkých sekvencí 5S rRNA a U1 a U2 snRNA zvolena metoda TSA-FISH, která poskytuje vyšší rozlišovací schopnost a citlivost a umožňuje i detekci unikátních sekvencí kratších než 1300 bazí (Carabajal a kol., 2014). Nicméně opakované TSA-FISH experimenty se sondami pro 5S rRNA a U1 a U2 snRNA hybridizovanými na pachytenní či mitotická jádra *C. pomonella* a *B. mori* neposkytly detekovatelné signály. Získané negativní výsledky naznačily, že jsou tyto geny v genomu *C. pomonella* a *B. mori* zastoupeny v malém počtu opakování a/nebo tvoří tandemová opakování, ale jsou rozptýleny po genomu. Tato hypotéza byla následně testována dalšími metodami (viz níže).

4.3. Kvantitativní PCR

Kvantitativní PCR (qPCR) experimenty byly provedeny za účelem zjištění relativního počtu kopií genů 18S rDNA, histonu H3, 5S rDNA, snRNA U1 a U2 v genomu *C. pomonella* a *B. mori*. Pro každý druh byla vybrána dvojice unikátních („single copy“) genů, které sloužily v experimentu jako vnitřní standard. Pro analýzu *C. pomonella* a *B. mori* byly využity jako referenční geny *Acetylcholinesteráza 1 (Ace-1)* a *Elongační faktor 1 α (EF-1 α)*. Analýzy byly provedeny ve třech biologických replikách, tj. se třemi nezávisle izolovanými vzorky samčí genomové DNA. Pro každý vzorek byla reakce provedena v triplicátu. Relativní počty kopií vzhledem k referenčním genům byly zjištěny pro všechny geny u obou druhů s výjimkou genu 5S rDNA *B. mori*, u kterého nebylo opakovaně docíleno specifity a dostatečné účinnosti navržených primerů. Získané relativní počty kopií všech studovaných genů včetně referencí, účinností primerů a dalších detailů jsou uvedeny v **Tab. 5**. Experimenty odhalily u obou druhů relativně vysoký počet kopií genů pro 18S rRNA a histon H3, tedy genů které se podařilo úspěšně zamapovat u všech studovaných druhů. Na druhou stranu byly v genomu *C. pomonella* a *B. mori* zjištěny velmi nízké počty kopií genů pro 5S rRNA a U1 a U2 snRNA. Vzhledem k délce těchto genů (cca. 100 bazí) se počty jejich kopií v případě tandemového uspořádání pohybují kolem detekčního limitu TSA-FISH.

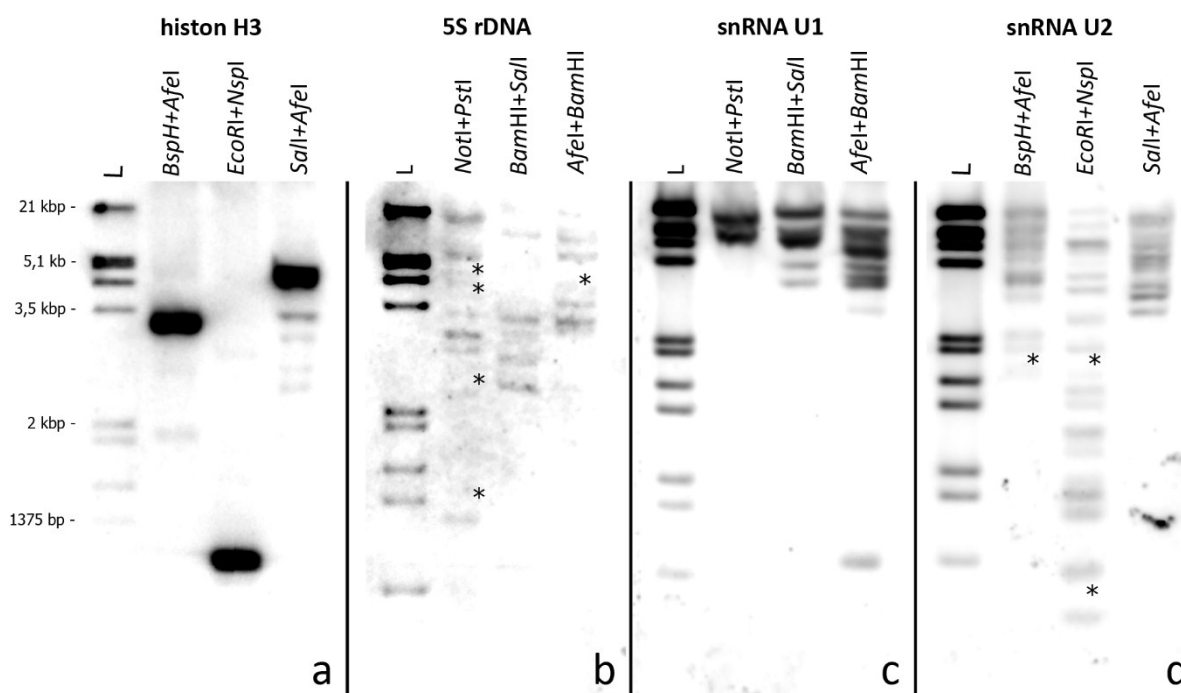
Tab. 5: Výsledné hodnoty a informace získané pomocí kvantitativní PCR.

Druh	Gen	Vzorek I	Vzorek II	Vzorek III	Průměrný	SEM	E _{primerů}
		Počet kopií	Počet kopií	Počet kopií	Počet kopií		
<i>C. pomonella</i>	<i>Efla</i>	0,92	1,07	1,00	0,99	0,04	0,894
	<i>Ace-1</i>	1,09	0,94	0,99	1,01	0,05	0,903
	<i>U1snRNA</i>	8,82	5,88	6,54	7,08	0,89	0,950
	<i>U2snRNA</i>	22,88	20,23	21,89	21,67	0,77	0,843
	<i>5S rRNA</i>	10,37	14,09	15,34	13,27	1,49	0,928
	<i>18S rRNA</i>	42,68	55,18	47,35	47,40	3,92	0,945
	<i>histon H3</i>	49,50	60,30	41,42	50,47	4,94	0,939
<i>B. mori</i>	<i>Efla</i>	1,02	1,00	1,17	1,06	0,05	1,000
	<i>Ace-1</i>	1,17	1,00	0,86	1,01	0,09	1,001
	<i>U1 snRNA</i>	27,19	33,86	32,21	31,08	2,00	0,899
	<i>U2 snRNA</i>	10,69	13,21	11,25	11,71	0,76	1,002
	<i>5S rRNA</i>	-	-	-	-	-	-
	<i>18S rRNA</i>	387,10	404,89	386,69	392,89	5,99	1,035
	<i>histon H3</i>	364,02	218,73	271,07	284,61	42,48	1,015

4.4. Southernova hybridizace

Pro ověření tandemového uspořádání kopií genů pro histon H3, 5S rRNA a U1 a U2 snRNA v genomu *C. pomonella* byla provedena Southernova hybridizace se specifickými sondami. V případě genů pro histon H3 Southernova hybridizace odhalila přítomnost jednoho silného proužku a několika málo slabých (**Obr. 1a**), což naznačuje, že drtivá většina z 50 transkripčních histonových jednotek leží na sekvenčně identickém restričním fragmentu. To je v souladu s hypotézou o tandemovém uspořádání histonových genů v jediném klastru detekovaném TSA-FISH a homogenizací histonových genů genovou konverzí. Několik výrazně slabších proužků může také představovat tzv. orfony, jak se označují osamocení členové genových rodin. Southernovy hybridizace genů pro 5S rDNA a U1 a U2 snRNA identifikovaly větší množství proužků, jejichž počet řádově odpovídá počtu kopií těchto genů stanovených pomocí qPCR (**Obr. 1b, c, d**). Větší množství slabých proužků indikuje, že kopie těchto genů nejsou uspořádané v tandemu ale rozptýlené po genomu. Výjimkou mohou být geny pro U1 snRNA, které tvoří při štěpení enzymy *NotI+PstI* dva diskrétní proužky. Vzhledem k intenzitě proužků je zřejmé, že odpovídající restriční fragmenty nesou několik kopií genu pro U1 snRNA. Ani to však vzhledem k malému počtu kopií nestačí k úspěšné detekci TSA-FISH. Velikost fragmentů a větší počet proužků při hybridizaci se vzorky gDNA

štěpenými jinými kombinacemi restričních enzymů navíc naznačují, že ani v tomto případě nejsou kopie genů uspořádány v těsném tandemu.



Obr. 1: Výsledky Southernovy hybridizace samčí gDNA *C. pomonella* a specifických sond. Genomová DNA byla naštěpena třemi páry restričních enzymů, konkrétně *BspH+AfeI*, *EcoRI+NspI*, *SalI+AfeI* pro geny pro histon H3 a U2 snRNA (**a**, **d**) a *NotI+PstI*, *BamHI+SalI*, *AfeI+BamHI* pro geny pro 5S rRNA a U1 snRNA (**b**, **c**). **a** – Hybridizace specifické sondy pro histon H3. **b** – Detekované rozptýlené kopie genu pro 5S rRNA v genomu. **c** – Výsledná hybridizace genu pro U1 snRNA odhalující nízký počet rozptýlených kopií. **d** – Detekce rozptýlených genů snRNA U2 v genomu *C. pomonella*. Hvězdička označuje slabě viditelné proužky. L - DNA molecular weight marker III (Roche).

5. Diskuse

Cílem této práce bylo otestovat, zda jsou geny pro 18S rRNA, histon H3, 5S rRNA a U1 a U2 snRNA vhodné cytogenetické markery pro studium evoluce karyotypů motýlů. Geny byly mapovány na pachytenních jádrech pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) u zástupců 13 nadčeledí motýlů a jednoho chrostíka. Výsledky FISH byly zkombinovány s již známými údaji o distribuci studovaných genových rodin, fylogenetickými vztahy a haploidním počtem chromosomů ve schématických přehledech na **Obr. 3-7**. Počet kopií studovaných genů v genomu *C. pomonella* a *B. mori* byl stanoven pomocí kvantitativní PCR (qPCR) za použití samčí genomové DNA a dvou unikátních genů jako reference. Další nezávislou metodou pro zjištění počtů kopií markerových genů a jejich uspořádání v genomu *C. pomonella* byla Southernova hybridizace.

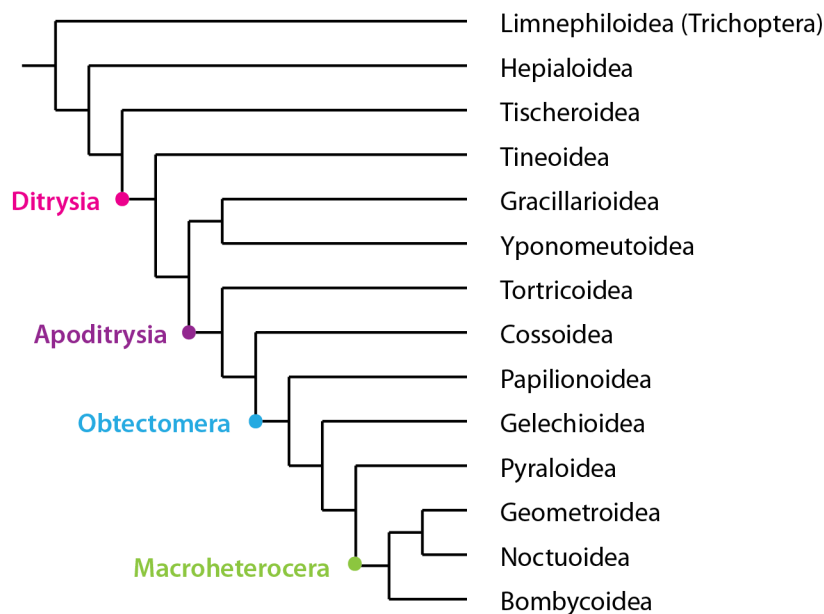
První skupinou testovaných markerů byly geny pro 5S rRNA a U1 a U2 snRNA, jejichž distribuce na chromosomech motýlů nebyla dosud studována. Produkt genu 5S rRNA je krátká ribosomální RNA, která je součástí ribosomů. Geny pro U1 a U2 snRNA kódují malé jaderné RNA, které jsou součástí spliceosomu zodpovědného za vystřihování intronových sekvencí z pre-mRNA. Fragменты těchto genů byly izolovány a amplifikovány pomocí PCR z genomu *C. pomonella* a *B. mori* a následně použity jako sondy pro FISH s tyramidovou amplifikací signálu (TSA-FISH). Nicméně přes opakované pokusy se tyto geny na chromosomech studovaných druhů nepodařilo detekovat. Neúspěšné hybridizační experimenty naznačují, že počty jejich kopií v genomu zřejmě nejsou vysoké a/nebo nejsou v genomu tandemově uspořádané. Pro ověření hypotézy o nízkém počtu kopií 5S rDNA a U1 a U2 snRNA v genomu *C. pomonella* a *B. mori* byla provedena qPCR. Experimenty ukázaly, že v haploidním genomu *C. pomonella* se nachází pouze 13 kopií genu 5S rDNA, 7 kopií genu U1 snRNA a 22 kopií genu U2 snRNA (**Tab. 5**). V genomu *B. mori* se nepodařilo stanovit počet kopií genu 5S rDNA díky nedostatečné specifitě a účinnosti navržených primerů. Ovšem u genů snRNA proběhl experiment úspěšně a počet kopií genu U1 byl stanoven na 32 a U2 na 11 kopií na haploidní genom. Na základě bioinformatických analýz genomu *B. mori* stejného kmene p50T byly zaznamenány ještě nižší počty kopií genů U1 a U2 snRNA. Mesa a kol. (2008) stanovili 9 kopií genu U1 a 5 kopií U2 v genomu *B. mori*. Mount a kol. (2007) uvádí 8 kopií obou genů v genomu *B. mori* a Marz a kol. (2008) 5 kopií U1 a 6 kopií U2. V genomu hnědáška kostkovaného, *Melitaea cinxia* (Nymphalidae), byly počty genů pro U1 a U2 snRNA určeny na 13 a 6 kopií (Aholá a kol., 2014). Všechny tyto výsledky potvrzují, že se geny pro U1 a U2 snRNA v motýlích genomech vyskytují pouze v malém počtu. Počty kopií získané pomocí

qPCR v této práci jsou o něco vyšší než z genomových analýz. Nicméně bylo ukázáno, že *de novo* složené genomy jsou kratší než referenční genomy a větší počet krátkých duplikovaných sekvencí je během jejich skládání ztracen, což má za následek nižší výsledné počty kopií těchto sekvencí (Marz a kol., 2008; Alkan a kol., 2011; Vierna a kol., 2013). Z tohoto důvodu je experimentální stanovení počtu kopií pomocí kvantitativní PCR patrně věrohodnější a přesnější metodou než *in silico* analýzy. Dále byla provedena Southernova hybridizace sond připravených z genů pro 5S rDNA a U1 a U2 snRNA na samčí gDNA *C. pomonella* (Obr. 1). Výsledky podporují závěry qPCR experimentů. Vedle nízkých počtů kopií Southernova hybridizace také poskytla informace o distribuci těchto genů v genomu. Hybridizace ve všech případech ukázala větší počet slabých signálů o různých velikostech, což naznačuje rozptýlení těchto genů po genomu *C. pomonella*.

Dalším zkoumaným markerem byl gen pro histon H3, který je spolu s geny H2a, H2B, H4 a případně i H1 součástí histonové jednotky (Roehrdanz a kol., 2010). Histon H3 byl dosud při analýze karyotypů motýlů použit jen v několika studiích (Šíchová a kol., 2013; 2015; 2016). Histon H3 je součástí specializované skupiny proteinů s vysokou afinitou k DNA. Podílí se na organizaci DNA v jádře a regulaci transkripce. Aminokyselinová sekvence je velmi konzervativní, nicméně identita nukleotidových sekvencí (Příloha II) je vzhledem k degeneraci genetického kódu je velmi nízká. Z tohoto důvodu byly pro mapování histonů pomocí metody TSA-FISH ve většině případů vytvořeny druhově specifické sondy. Pokud nebyl k dispozici materiál pro izolaci gDNA a vytvoření sondy, byla v několika případech použita sonda od nejbližšího příbuzného druhu. Mapování pomocí TSA-FISH bylo úspěšné pro všech 29 zkoumaných druhů ze 12 nadčeledí motýlů a jednoho zástupce sesterské skupiny Trichoptera. Výsledky poskytly solidní přehled o počtu a distribuci histonových genů od chrostíků a basálních motýlů až po odvozené skupiny motýlů. Ve velké většině případů byl detekován jediný klastr histonových genů buď v terminální, nebo intersticiální pozici na chromosomu, což naznačuje překvapivě časté autosomální inverze. Výjimkou jsou pouze *Y. plumbella* a *T. absoluta* se dvěma terminálními klastry na jednom bivalentu a *H. cecropia* a *G. pellucidus* se třemi terminálními klastry (Obr. 3,5,7). Také Šíchová a kol. (2015, 2016) pozorovala zmnožení histonových klastrů u dvou druhů bělásků rodu *Leptidea*. Šíření histonových genů do nových lokusů je tedy zjevně poměrně vzácné a oproti předpokladům nemusí nutně korelovat s viditelnými chromosomálními přestavbami. To společně se značně proměnlivou pozicí histonových klastrů naznačuje překvapivou skrytou variabilitu v karyotypech motýlů. Vzhledem k malému počtu zástupců bazálních linií nebylo možné stanovit acestrální stav distribuce histonových genů. Dále byly stanoveny počty kopií histonu

H3 v genomu *C. pomonella* a *B. mori* pomocí qPCR experimentů. V haploidním genomu *C. pomonella* se nachází 51 kopií a v genomu *B. mori* 285 kopií histonu H3. Tento velký rozdíl v počtu kopií histonu H3 mezi druhy může být vysvětlen domestikací a šlechtěním *B. mori* za účelem intenzivní produkce hedvábí. Hedvábné vlákno je produkováno ve snovacích žlázách během pátého larválního instaru před kuklením. Snovací žlázy v tomto stádiu zabírají až 40% velikosti housenky a jsou tvořeny vysoce polyploidními buňkami (Akai a King, 1984). V jádrech těchto buněk dochází k masivní replikaci DNA a transkripci, při kterých hrají histonové proteiny důležitou roli. Výsledky Southernovy hybridizace se sondou pro histon H3 *C. pomonella* naznačují, že je naprostá většina jeho genů obsažena v sekvenčně identických jednotkách, což podporuje jejich tandemové uspořádání v jediném lokusu (**Obr. 1**).

Posledním testovaným markerem byl gen pro 18S rRNA, který je spolu s geny pro 5,8S a 28S rRNA součástí transkripční jednotky hlavní ribosomální DNA. Tyto geny jsou velmi konzervativní a transkripční jednotky jsou tandemově uspořádané pro usnadnění transkripce a její regulace (Cmarko a kol, 2000; Huang a kol., 2002). Pomocí kvantitativní PCR byl určen relativní počet kopií 18S rDNA v haploidním genomu *C. pomonella* na 47 kopií a *B. mori* na 393 kopií. Také několikanásobně vyšší počet kopií v genomu *B. mori* oproti *C. pomonella* je patrně výsledkem amplifikace genů pro hlavní rRNA v důsledku selekce na vysokou produkci hedvábí. Během 5. larválního stádia se ve snovacích žlázách bource až 15krát zvýší množství mRNA (Akai a King, 1984) a pro zajištění masové translace proteinů hedvábí je v buňkách snovacích žláz třeba také velké množství ribosomů (Akai a King, 1984). Fragment genu 18S rDNA (přibližně 1600 bp) byl získán amplifikací pomocí PCR se samčí gDNA *C. pomonella* jako templátem a specifickými primery poprvé použitými v práci Fuková a kol. (2005). Nepřímá FISH s 18S rDNA sondou z *C. pomonella* byla provedena u 24 druhů z 12 nadčeledí řádu Lepidoptera a vůbec poprvé také u jednoho druhu chrostíka, který sloužil jako výchozí skupina („outgroup“) pro řád motýlů **Obr. 3**. Sonda připravená z 18S rDNA *C. pomonella* úspěšně hybridizovala a lokalizovala klastry rDNA genů u všech zkoumaných druhů.

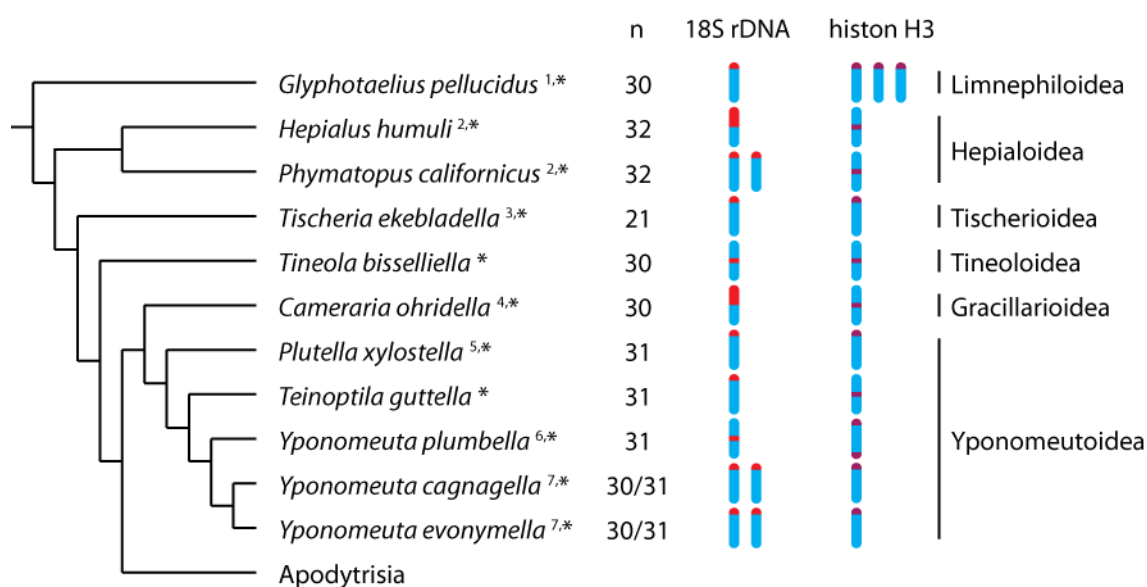


Obr. 2: Fylogenetické vztahy nadčeledí řádů Lepidoptera a Trichoptera studovaných v této práci a detailně zpracovaných v **Obr. 3 - 7** s vyznačením vyšších taxonů. Fylogenetické vztahy jsou převzaty z práce Regier a kol. (2013) a Kawahara a kol. (2014).

Klastry genů pro 18S rDNA představují osvědčený cytogenetický znak (Bueno a kol., 2013; Gornung, 2013; Palacios-Gimenes a kol., 2013;), který byl již použit v několika pracích zabývajících se karyotypovou analýzou motýlů a distribucí jejich rDNA (Nguyen a kol., 2010; Šíchová a kol., 2013; 2015; 2016; Vershinina a kol., 2015). Absence dat u bazálních nadčeledí však neumožnila formulovat hypotézu o počtu a lokalizaci klastrů rDNA v ancestrálním karyotypu motýlů a interpretaci pozorovaných změn v distribuci rDNA u studovaných skupin.

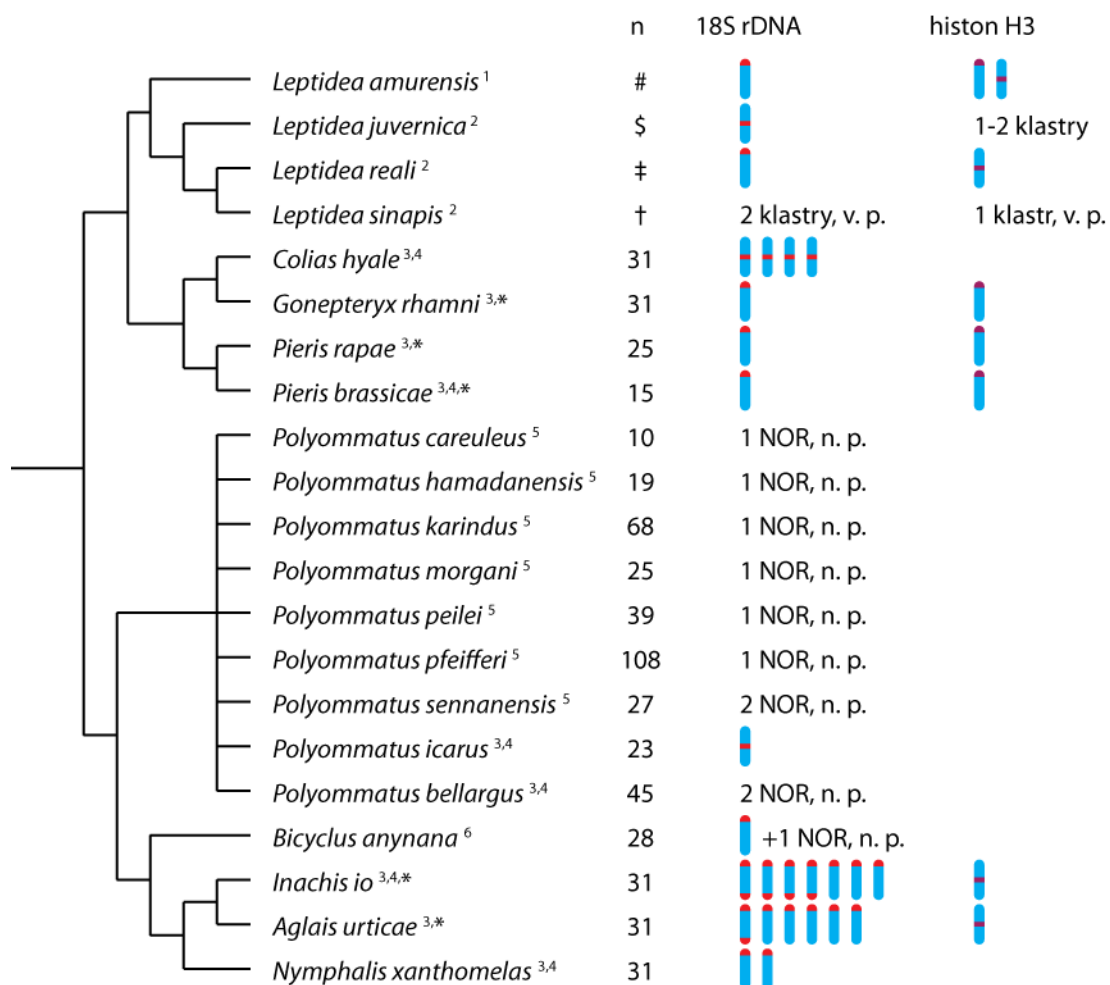
Distribuce rDNA u chrostíka *G. pellucidus* a bazálních skupin motýlů (**Obr. 3**) naznačuje, že jeden terminální klast rDNA detekovaný u většiny zkoumaných bazálních druhů patrně představuje u motýlů ancestrální stav. Výjimkou byly druhy *T. bisselliella* a *Y. plumbella*, u kterých byla rDNA lokalizována intersticiálně a *P. californicus*, *Y. evonymella* a *Y. cagnagella*, u kterých byly detekovány dva terminální klastry.

Zajímavý stav byl pozorován u druhů *H. humuli* a *C. ohridella*, u kterých sonda hybridizovala k téměř polovině délky chromosomálního bivalentu, což naznačuje amplifikaci a šíření genu pro 18S rRNA v rámci jednoho chromosomu. Šíření genů pro rRNA může být teoreticky zprostředkováno mobilními elementy. Možná spojitost mezi aktivitou mobilních elementů byla ukázána v případě dynamické evoluce rDNA u ryb čeledi Nemacheilidae (Symonová a kol., 2013; Sember a kol., 2015). Symonová a kol. (2013) formulovali hypotézu, podle které mobilní elementy u síha *Coregonus fontanae* mobilizovaly část transkripční jednotky rDNA, která se následně rozšířila do centromerických oblastí. Proto byla provedena dvojitá FISH se sondami pro 18S a 28S rDNA, která potvrdila jejich kolokalizaci v celé oblasti a tudíž šíření celé transkripční jednotky (Příloha Obr. 2a,c,d).



Obr. 3: Distribuce rDNA (červená) a histonových lokusů (fialová) u bazálních skupin motýlů a jim sesterského řádu chroštitků (Trichoptera) s uvedením haploidního počtu chromosomů (n) a fylogenetických vztahů převzatých z Sohn a kol. (2013) a Kawahara a kol. (2014). *Informace o poloze a počtu NOR a histonového klastru - tato práce. ¹Informace o karyotypu - Kiauta a Lankhorst, 1969, ♂n=30 (2n=60), ♀2n=59-60. ²Informace o karyotypu - Anna Voleníková, osobní sdělení, n=32, konstituce pohlavních chromosomů neznáma. ³Informace o karyotypu - Lukhtanov a kol. (2000). ⁴Informace o karyotypu - De Prins a kol. (2002). ⁵Informace o karyotypu - Yasukochi a kol. (2010). ⁶informace o karyotypu - Pupliesiene (1993). ⁷Informace o karyotypu - Nilsson a kol. (1988).

Zajímavé výsledky byly získány u zástupců jedné z nejlépe prostudovaných nadčeledí Papilionoidea zahrnující denní motýly. Výsledky karyotypových analýz zástupců čeledí Pieridae, Nymphalidae a Lycaenidae (**Obr. 4**) ukazují značnou variabilitu v počtech chromosomů i distribuci sledovaných rDNA a genů pro histon H3. V případě genů pro histon H3 souvisí zmnožení histonových lokusů pozorované u bělásků r. *Leptidea* patrně s jejich bouřlivou karyotypovou evolucí (Šíchová a kol., 2015, 2016).



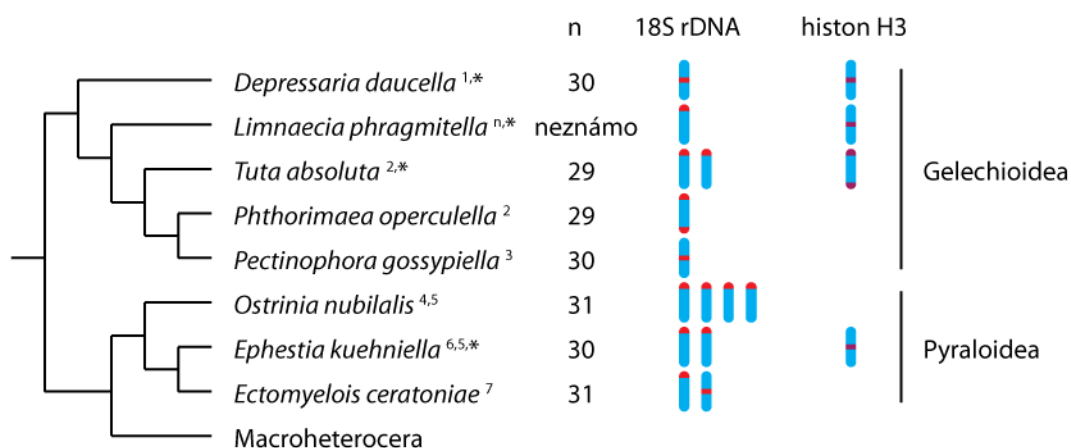
Obr. 4: Distribuce rDNA (červená) a histonových lokusů (fialová) v nadčeledi Papilionoidea (Obtectomera) s uvedením haploidního počtu chromosomů (n) a fylogenetických vztahů založených na pracích Nylin a kol. (2001), Wahlberg a kol. (2003), Dincă a kol. (2011) a Regier a kol. (2013). *Informace o poloze a počtu NOR a histonového klastru - tato práce. ¹Informace o karyotypu, poloze a počtu NOR a histonovém klastru - Šíchová a kol. (2016): # 2n=118-122. ²Informace o karyotypu, poloze NOR a histonovém klastru - Šíchová a kol. (2015): \$ *L. juvernica* 2n=80-91; ‡ *L. reali* 2n=51-55; † *L. sinapis* 2n=56-106. ³Informace o karyotypu – Robinson (1971). ⁴Informace o poloze a počtu NOR - Nguyen a kol. (2010). ⁵Informace o karyotypu a počtu NOR - Vershinina a kol. (2015). ⁶Informace o karyotypu a poloze NOR - Van't Hof a kol. (2008). v. p., variabilní pozice klastru. n. p., neznámá pozice.

Oproti tomu je rDNA u druhů s odvozenými počty chromosomů poměrně stabilní. Paradoxně je však značně variabilní u druhů s ancestrálním počtem chromosomů $n=31$, což poukazuje na skrytou dynamiku zdánlivě konzervovaných karyotypů. Nguyen a kol. (2010) ukázali, že u babočky paví oko, *Inachis io* (Nymphalidae), došlo k výraznému zmnožení rDNA lokusů. Autoři pozorovali až 11 lokusů v subtelomerických oblastech sedmi chromosomů. Také u blízce příbuzné babočky kopřivové, *Aglais urticae*, studované v této práci bylo na šesti chromosomech pozorováno sedm terminálních klastrů rDNA. Tyto výsledky naznačují, že amplifikace rDNA v případě čeledi Nymphalidae možná nepředstavuje výjimku, ale pravidlo. Dvojitá FISH se sondami 18S a 28S zároveň potvrdila, že se skutečně šíří celé ribosomální transkripční jednotky. Z dostupných dat není jasné, zda byla rDNA u studovaných baboček mobilizována nezávisle nebo k ní došlo u společného předka analyzovaných druhů.

Nadčeleď Papilionoidea je druhově bohatá (Robbins, 1982) a z cytogenetického pohledu velmi zajímavá. Právě do této skupiny patří modrásek *Polyommatus atlanticus* (Lycaenidae), který má nejvyšší počet chromosomů ze všech živočichů, v haploidním stavu 224-226 chromosomů (Lukhtanov, 2015) i druhy s nejnižším počtem chromosomů ($n=5$) *Agathymus aryxna* (Hesperiidae) a *Hypothyris thea* (Nymphalidae) (De Prins a Saitoh, 2003; Brown a kol., 2004). Ačkoli srovnávací analýza genomu hnědáka *Melitaea cinxia* potvrdila, že se ancestrální karyotyp nadčeledi Papilionoidea shoduje s předpokládaným ancestrálním karyotypem motýlů, detailní pohled na chromosomální evoluci čeledi Nymphalidae naznačuje, že diverzifikaci denních motýlů provázely četné chromosomální přestavby (Ahola a kol., 2014).

Dalšími studovanými nadčeledmi byly Gelechioidea a Pyraloidea (**Obr. 5**). V rámci nadčeledi Gelechioidea nebylo možné s jistotou stanovit trend v distribuci rDNA a histonových klastrů. I u této skupiny je patrně ancestrálním stavem jediný rDNA lokus pozorovaný u *D. daucella* (Depressaridae) a *L. phragmitella* (Cosmopterigidae), který byl u odvozené čeledi Gelechiidae duplikován buď v cis jako v případě *P. operculella* nebo trans v případě *T. absoluta*. Na první pohled se může zdát, že by stejný evoluční trend mohl platit i pro histonové geny, které jsou u odvozené *T. absoluta* organizovány ve dvou klastrech nesených jediným chromosomem. Nicméně je třeba vzít v potaz vysokou variabilitu v distribuci rDNA a velkou diverzitu nadčeledi Gelechioidea (Sohn a kol., 2015), pro kterou není studovaný vzorek dostatečně reprezentativní. Pro nadčeleď Pyraloidea je na základě dostupných údajů charakteristické zmnožení rDNA klastrů na více chromosomech

v terminálních pozicích při stabilních počtech chromosomů. Podobně jako u denních motýlů (Papilioionioidea) se tak zdá, že šíření rDNA genů v subtelomerických oblastech nemá přímý negativní vliv na stabilitu chromosomů a rDNA může sloužit jako vhodný indikátor skryté karyotypové variability. Histonová organizace byla studována pouze u jediného druhu *E. kuehniella*, u kterého byl detekován jeden intersticiální klastr.

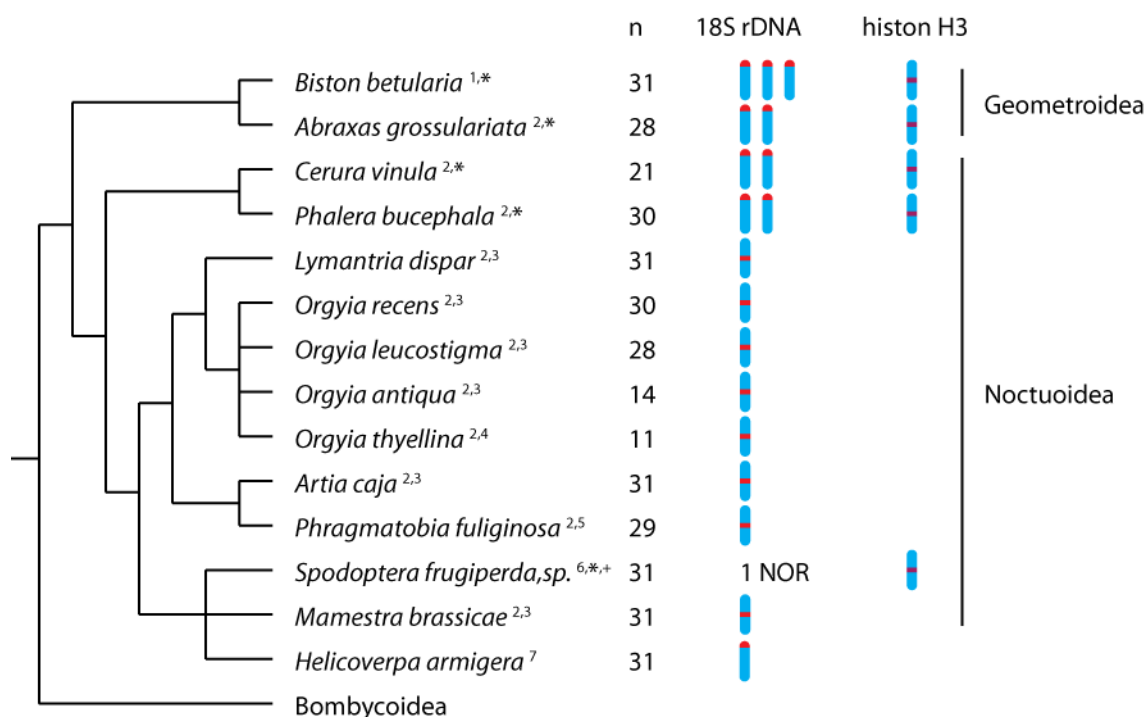


Obr. 5: Distribuce rDNA (červená) a histonových lokusů (fialová) v nadčeledích Gelechioidea a Pyraloidea (Obtectomera) s uvedením haploidního počtu chromosomů (n) a fylogenetických vztahů převzatých z Regier a kol. (2013) a Kawahara a kol. (2014). *Informace o poloze a počtu histonových klastrů - tato práce. ¹Informace o počtu chromosomů - Robinson (1971). ⁿKaryotyp neznámý. ²Informace o karyotypu, poloze a počtu NOR – Leonela Z. Carabajal Paladino, nepublikováno; ³Informace o poloze a počtu NOR - Bartlett a Del Fosse (1991). ⁴Informace o karyotypu - Keil (1990). ⁵Informace o poloze a počtu NOR - Nguyen a kol. (2010). ⁶Informace o karyotypu - Marec a Traut (1993). ⁷Informace o karyotypu, poloze a počtu NOR - Mediouni a kol. (2004).

Tato studie přináší vůbec první informace o distribuci rDNA a histonových genů na chromosomech píd'alek z nadčeledi Geometroidea (**Obr. 6**). Analýza distribuce histonových genů odhalila u obou studovaných píd'alek jeden intersticiální klastr. Ribosomální DNA je u obou studovaných druhů nadčeledi Geometroidea lokalizována na konci dvou až tří chromosomálních bivalentů. Zdá se tedy, že mají rDNA lokusy v rámci nadčeledi Geometroidea tendenci ke zmnožení a šíření do subtelomerických oblastí. Pro ověření této hypotézy je nicméně třeba vyšetřit více druhů.

U dosud studovaných zástupců nadčeledi Noctuoidea (**Obr. 6**) byl jediný klastr rDNA uniformně lokalizován v intersticiální pozici (Nguyen a kol., 2010). V této práci byly dosud studované druhy nadčeledi Noctuoidea doplněny od dva zástupce bazální čeledi Notodontidae, jmenovitě *Cerura vinula* a *Phalera bucephala*. Oproti odvozeným druhům jsou v karyotypech

obou druhů dva chromosomy nesoucí po jednom terminálním klastru rDNA. To zpochybňuje závěry práce Nguyen a kol. (2010), která považuje jeden intersticiální rDNA lokus za synapomorfii nadčeledi Noctuoidea. Fyzické mapování genomu dvou zástupců nadčeledi Noctuoidea, jmenovitě *Helicoverpa armigera* a *Mamestra brassicae*, ukázalo, že jejich karyotyp odpovídá ancestrální organizaci motýlího genomu a identifikovalo chromosom nesoucí rDNA jako chromosom 11 (Sahara a kol., 2013).

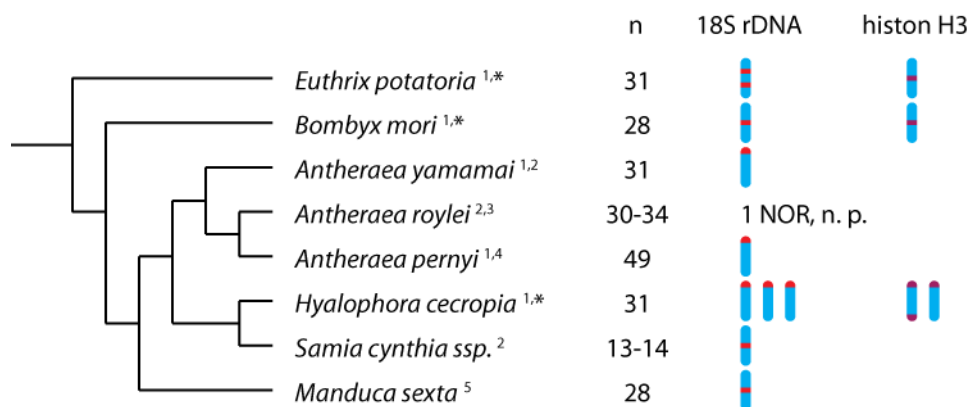


Obr. 6: Distribuce rDNA (červená) a histonových lokusů (fialová) v nadčeledích Geometroidea a Noctuoidea (Macroheterocera) s uvedením haploidního počtu chromosomů (n) a fylogenetických vztahů převzatých ze Zahiri a kol. (2011) a Kawahara a kol. (2014). *Informace o poloze a počtu NOR a histonového klastru - tato práce. ¹Informace o karyotypu - Van't Hof a kol. (2013). ²Informace o karyotypu - Robinson (1971). ³Informace o poloze a počtu NOR - Nguyen a kol. (2010). ⁴Informace o poloze a počtu NOR - Traut a Clarke (1996). ⁵Informace o poloze a počtu NOR - Traut a Marec (1997). ⁶Informace o karyotypu - Monti a kol. (1998); + *Spodoptera sp* –studována v Nguyen a kol. (2010); *Informace o poloze a počtu NOR (intersticiální) a histonového klastru u *Spodoptera frugiperda* - tato práce. ⁷Informace o karyotypu, poloze a počtu NOR - Sahara a kol. (2013).

Srovnání tohoto chromosomu s referenčním genomem bource morušového, *B. mori* (Bombycoidea), ukázalo, že je homeologní k části chromosomu 11 bource, který také nese rDNA (Yoshido a kol. 2005). Nicméně fakt, že chromosom 11 bource vznikl fúzí dvou ancestrálních syntenních bloků (Van't Hof a kol., 2013; Ahola a kol., 2014) a nízký počet genů mapovaných u *H. armigera* a *M. brassicae* (Sahara a kol., 2013) komplikuje posouzení syntenie a kolinearit genů chromosomu 11. Není tedy prozatím možné určit, zda je

ancestrálním znakem skupiny Noctuoidea klastr rDNA lokalizovaný terminálně, jak to vidíme u studovaných zástupců čeledi Notodontidae nebo intersticiálně, jak je tomu u drtivé většiny dosud studovaných mūr z nadčeledi Noctuoidea. Distribuce histonových genů je u všech studovaných druhů č. Noctuoidea stejná, tj. jediný lokus lokalizovaný intersticiálně.

Nadčeleď Bombycoidea byla v této práci zastoupena zástupci všech hlavních skupin, jmenovitě bourovcem trávovým (*Euthrix potatoria*, Lasiocampidae), bourcem morušovým (*B. mori*, Bombycidae) a martináčem *Hyalophora cecropia* (Saturniidae) (**Obr. 7**). Analýza distribuce histonových genů ukázala, že jeden intersticiální klastr je patrně ancestrálním stavem pro celou nadčeleď, neboť byl pozorován u druhu *E. potatoria* i *B. mori*. Získané výsledky spolu s daty dostupnými u zástupců nadčeledí Geometroidea a Noctuoidea (viz výše) naznačují, že může jít o ancestrální stav celé skupiny Macroheterocera. Organizace hlavní rDNA pak vykazuje značnou variabilitu bez jasného trendu. Unikátní situace, dva intersticiální klastry na jednom chromosomu, byla zaznamenána u *E. potatoria*. Toto uspořádání rDNA může být vysvětleno například inverzemi, které mohly translokovat terminální klastry rDNA do intersticiální polohy nebo rozdělit intersticiální rDNA lokus. Tyto hypotézy je však nutné potvrdit dalším výzkumem.



Obr. 7: Distribuce rDNA (červená) a histonových lokusů (fialová) v nadčeledi Bombycoidea (Macroheterocera) s uvedením haploidního počtu chromosomů (n) a fylogenetických vztahů převzatých z Regier a kol. (2008) a Kawahara a kol. (2014). *Informace o pozici a počtu NOR a histonových klastrů - tato práce. ¹Informace o karyotypu - Robinson (1971). ²Informace o pozici a počtu NOR a informace o karyotypu u *A. roylei* - Yoshido a kol. (2005b). ³Informace o pozici a počtu NOR - Kundu a kol. (1993). ⁴Informace o pozici a počtu NOR - Nguyen a kol. (2010). *S. Cynthia ssp.*: ²informace o karyotypu, počtu a pozice NOR - Yoshido a kol. (2005b); počet chromosomů je různý u poddruhů (2n = 25 u *S. c. sp. indet.*; 2n = 26 u *S. c. walkeri*; 2n = 27 u *S. c. ricini*). ⁵Informace o karyotypu, pozici a počtu NOR a histonových klastrů - Sahara a kol. (2007). n.p., neznámá pozice.

Obecně se dá říci, že geny pro hlavní ribosomální RNA podléhají dynamické evoluci a jsou velmi často mobilizovány především pomocí mobilních elementů, které mohou zprostředkovat jejich přímou transpozici nebo přenos ektopickou rekombinací (Schubert, 1984; Nguyen a kol., 2010; Symonová a kol., 2013; LeRiche a kol., 2014; Sember a kol., 2015). Za ancestrální stav se dá u motýlů považovat jeden terminální klastr, který byl zaznamenán u většiny basálních druhů. Evoluční trend v organizaci klastru histonových genů není ze získaných výsledků zcela jasný. Dá se říci, že převažuje přítomnost jediného histonového klastru, který byl pozorován u drtivé většiny studovaných druhů. Neobvyklý stav byl pozorován u druhů *Y. plumbella* (Yponomeutoidea) a *T. absoluta* (Gelechioidea) (Příloha I Obr. 4f, 7e výřez), u kterých byly zaznamenány dva terminální klastry na koncích jednoho bivalentu a u *H. cecropia* (Saturnidae), který má navíc ještě další bivalent s jedním terminálním klastrem (Příloha I Obr. 10f).

Bivalent nesoucí signál na obou koncích tvořil ve většině případů kruhovou strukturu spojenou skrze klastry histonových genů. V případě *H. cecropia* byl s takto „kruhovým“ bivalentem prostřednictvím histonových genů asociován i druhý bivalent s terminálním rDNA lokusem (Příloha Obr. 9f). Volné spojení chromosomů určitými lokusy, tzv. „chromosome kissing“ má usnadňovat prostorovou kontrolu genové exprese a replikace DNA a párování chromosomů (Schneider a Grosschedl, 2007). Nejznámějším příkladem tohoto fenoménu je bez pochyby sdružování rDNA různých chromosomů v jadérku, specializovaném jaderném kompartmentu, ve kterém jsou ribosomální geny hromadně přepisovány a sestřihovány (Raška a kol., 2006). Podobné továrny („factories“) jsou typické pro vysoce transkribované geny. Imunoglobulinové geny, α -globin nebo β -globin jsou dokonce permanentně součástí transkripčních továren (Schneider a Grosschedl, 2007), tj. komplexu RNA polymerázy, transkripčních faktorů a vláken DNA (Cook, 1999).

Histonové geny organizované ve společné transkripční jednotce jsou pod vlivem jednoho promotoru a jsou intenzivně přepisovány pouze v krátkém časovém úseku na začátku S fáze (Rattray a Müller, 2012). Ranná transkripce těchto genů je nezbytná pro vytvoření histonových proteinů, které jsou důležité při organizaci replikované DNA do nukleosomů. Histonové transkripty přitom nejsou v rámci postranskripčních úprav polyadenylované jako většina pre-mRNA. Namísto polyA konce histonová mRNA nese na svém konci vlásenkovou strukturu („hairpin“). K té se připojuje specifický protein HBP („hairpin binding protein“), U7 snRNA a další proteiny, které následně odštěpí koncovou sekvenci (Rattray a Müller, 2012). Právě model továrny analogické k jadérku obsahující specifickou mašinerii sestřihující

transkripty histonových genů by mohl vysvětlit pozorované spojení chromosomů skrze klastry histonů.

Závěrem lze říci, že se geny pro 18S rRNA a histon H3 osvědčily jako markerové geny pro studium změn karyotypů v evoluci motýlů. Geny pro hlavní rRNA vykazují velmi dynamickou evoluci, která však nemusí nutně zahrnovat chromosomální přestavby, ale spíše může být vysvětlena aktivitou mobilních elementů (Eagle a Crease, 2012; LeRiche a kol., 2014). Histonové geny jsou obecně mnohem konzervativnější a nevykazují takovou dynamiku jako rDNA. Změny v distribuci histonových genů tak mohou být dobrým indikátorem chromosomálních inverzí. Proto se histonové geny s rDNA při studiu karyotypové evoluce vhodně doplňují (Šíchová a kol., 2013, 2015, 2016; tato práce). Kombinace genů pro 18S rRNA a histon H3 je tak patrně nejvhodnějším univerzálním ukazatelem evolučních změn karyotypů, který dokáže odhalit i skrytou karyotypovou variabilitu. FISH se sondami zkonstruovanými z těchto univerzálních cytogenetických markerů je levnou a univerzální metodou, která může být aplikována u nemodelových druhů. Použití dalších genových rodin, jmenovitě krátkých genů pro 5S rRNA a U1 a U2 snRNA, v karyotypové analýze může být v případě malého počtu jejich kopií nebo většího počtu lokusů značně problematické i při použití detekčních systémů s vysokým rozlišením.

6. Souhrn

Tato práce měla ověřit použitelnost genů pro 18S rRNA, 5S rRNA, histon H3, U1 a U2 snRNA jako cytogenetických markerů pro studium karyotypové evoluce motýlů. I přes použití vysoce citlivé FISH s tyramidovou amplifikací signálu nebylo možné částečné sekvence genů pro 5S rRNA a U1 a U2 snRNA na chromosomech obaleče jablečného, *C. pomonella*, a bource morušového, *B. mori*, detekovat. Kvantitativní PCR odhalila velmi nízké počty kopií těchto genů v genomu *C. pomonella* a *B. mori*. Výsledky Southernovy hybridizace potvrzují nízký počet kopií těchto genů a navíc naznačují, že jejich kopie nejsou uspořádány v tandemu, ale rozptýleny po genomu. Získané výsledky tak vysvětlují neúspěšné mapování zkoumaných genů metodou TSA-FISH.

Dalším testovaným markerem byl gen pro 18S rRNA, který je součástí transkripční jednotky hlavních ribosomálních RNA. Kvantitativní PCR odhalila přítomnost mnoha kopií 18S rDNA v genomu *C. pomonella* a *B. mori*. Pomocí metody FISH s 18S rDNA sondou získanou na základě sekvence *C. pomonella*, byly zamapovány geny hlavní ribosomální DNA u 24 druhů motýlů a 1 druhu sesterské skupiny chrostíků (Trichoptera). Jako ancestrální stav byl na základě získaných dat určen jeden terminální klastr rDNA genů, který byl zaznamenán téměř u všech bazálních skupin motýlů i studovaného chrostíka. Obecně se dá říci, že evoluce rRNA genů je velmi dynamická a není zřejmě spojená s chromosomálními přestavbami většího rozsahu.

V případě genu pro histon H3 testovaného v rámci této práce Southernova hybridizace naznačuje u *C. pomonella* přítomnost jediného klastru. Jak u *C. pomonella* tak u *B. mori* potvrdila qPCR vysoký počet kopií tohoto genu. I přes velký počet opakování a tandemové uspořádání bylo třeba pro věrohodnou detekci histonových genů použít vysoce citlivou TSA-FISH s druhově specifickou sondou. Pomocí sondy pro histon H3 byly mapovány histonové lokusy u 29 zástupců řádu Lepidoptera a jednoho chrostíka. Distribuce histonových genů je, na základě získaných výsledků, poměrně konzervativní. Ve velké většině případů byl detekován jediný klastr histonových genů buď v terminální, nebo intersticiální pozici na chromosomu, což naznačuje překvapivě časté autosomální inverze. Šíření histonových genů do nových lokusů je poměrně vzácné a není spojeno se změnou v počtu chromosomů. To společně se značně proměnlivou pozicí histonových klastrů naznačuje překvapivou skrytou variabilitu v karyotypech motýlů. Vzhledem k malému počtu zástupců bazálních linií nebylo možné stanovit ancestrální stav distribuce histonových genů.

Z výsledků vyplývá, že geny 5S rDNA, U1 a U2 snRNA nejsou vhodnými markery pro studium karyotypové evoluce motýlů. Na druhou stranu kombinace genů pro 18S rDNA a histon H3 představuje dobrý indikátor pro evoluční dynamiku motýlích genomů.

7. Literatura

- Ahola V, Lehtonen R, Somervuo P a kol. (2014) The Glanville fritillary genome retains an ancient karyotype and reveals selective chromosomal fusions in Lepidoptera. *Nat Commun* 5, 4737.
- Anjos A, Ruiz-Ruano FJ, Camacho JPM a kol. (2014) U1 snDNA clusters in grasshoppers: chromosomal dynamics and genomic organization. *Heredity* 114, 207-219.
- Akai H a King RC (Eds.) (1984) Insect ultrastructure. Plenum Press, New York.
- Alkan CW, Sajjadian SW a Eichler ES (2011) Limitations of next-generation genome sequence assembly. *Nat Methods* 8, 61-65.
- Bartlett AC a Del Fosse FE (1991) The pachytene karyotype of the pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). *Southwest Entomol* 16, 223–235.
- Baxter SW, Davey JW, Johnston JS a kol. (2011) Linkage mapping and comparative genomics using next-generation RAD sequencing of a non-model organism. *PLoS ONE* 6, e19315.
- Barzotti R, Pelliccia F a Rocchi A (2003) Identification and characterization of U1 small nuclear RNA genes from two crustacean isopod species. *Chromosome Res* 11, 365-373.
- Bedo DG (1984) Karyotypic and chromosome banding studies of the potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller) (Lepidoptera. Gelechiidae). *Can J Genet Cytol* 26, 141-145.
- Beldade P, Saenko SV, Pul N a kol. (2009) A gene-based linkage map for *Bicyclus anynana* butterflies allows for a comprehensive analysis of synteny with the lepidopteran reference genome. *PLoS Genet* 5, e1000366.
- Beshnova DA, Cherstvy AG, Vainshtein Y a kol. (2014) Regulation of the nucleosome repeat length in vivo by the DNA sequence, protein concentrations and long-range interactions. *PLoS Comput Biol* 10, e1003698.
- Bigger TRL (1975) Karyotypes of some Lepidoptera chromosomes and changes in their holokinetic organisation as revealed by new cytological techniques. *Cytologia* 40, 713-726.
- Bizzaro D, Mandrioli M, Zanotti M a kol. (2000) Chromosome analysis and molecular characterization of highly repeated DNAs in the aphid *Acyrtosiphon pisum* (Aphididae, Hemiptera). *Genetica* 108, 197-202.
- Brown KS Jr, von Schoultz B, Suomalainen E (2004) Chromosome evolution in Neotropical Danainae and Ithomiinae (Lepidoptera). *Hereditas* 141, 216-236.
- Bueno D, Palacios-Gimenez OM a Cabral-de-Mello DC (2013) Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the grasshopper *Abracris flavolineata* reveal possible ancestry of the B chromosome and H3 spreading. *PLoS ONE* 8, e66532.
- Butlin R (2005) Recombination and speciation. *Mol Ecol* 14, 2621–2635.

- Cabral-de Mello DC, Moura RC a Martins C (2010) Chromosomal mapping of repetitive DNAs in the beetle *Dichotomius geminates* provides the first evidence for an association of 5S rRNA and histone H3 genes in insects, and repetitive DNA similarity between the B chromosome and A complement. *Heredity* 104, 393–400.
- Cabral-de-Mello DC, Moura RC a Martins C (2011a) Cytogenetic mapping of rRNAs and histone H3 genes in 14 species of *Dichotomius* (Coleoptera, Scarabaeidae, Scarabaeinae) beetles. *Cyto Gen Res* 134, 127–135.
- Cabral-de-Mello DC, Martins C, Souza M a kol. (2011b) Cytogenetic Mapping of 5S and 18S rRNAs and H3 Histone Genes in 4 Ancient Proscopiidae Grasshopper Species: Contribution to Understanding the Evolutionary Dynamics of Multigene Families. *Cyto Gen Res* 132, 89-93.
- Cabral-de-Mello DC, Valente GT, Nakajima RT a kol. (2012) Genomic organization and comparative chromosome mapping of the U1 snRNA gene in cichlid fish, with an emphasis in *Oreochromis niloticus*. *Chromosome Res* 20, 279-292.
- Cai Q, Zhang D, Liu ZL a kol. (2006) Chromosomal Localization of 5S and 18S rDNA in Five Species of Subgenus *Strobilus* and their Implications for Genome Evolution of *Pennisetum*. *Ann Bot* 97, 715-722.
- Carabajal Paladino LZ, Nguyen P, Šíchová J a kol. (2014) Mapping of single-copy genes by TSA-FISH in the codling moth, *Cydia pomonella*. *BMC Genet* 15, S15.
- Carpenter J, Bloem S a Marec F (2005) Inherited sterility in insects. In: Dyck VA, Hendrichs J a Robinson AS (eds.), *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 115-146.
- Cmarko D, Verschure PJ, Rothblum LI a kol. (2000) Ultrastructural analysis of nucleolar transcription in cells microinjected with 5-bromo-UTP. *Histochem Cell Biol* 113, 181-187.
- Cook P (1999) The organization of replication and transcription. *Science* 284, 1790–1795.
- Dalíková M (2009) Využití BAC klonů při studiu pohlavního chromosomu W obaleče jablečného *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). Magisterská práce, v češtině, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Česká republika.
- Dasmahapatra KK, Walters JR, Briscoe AD a kol. (2012) Butterfly genome reveals promiscuous Exchange of mimicry adaptation among species. *Nature* 487, 94-98.
- De Prins J, De Prins W a Dall'Asta U (2002) The karyotype of *Cameraria ohridella* (Lepidoptera: Gracillariidae). *Phegea* 301, 5-10.
- De Prins J a Saitoh K (2003) Karyology and sex determination. In: Kristensen NP (ed.) *Lepidoptera, moths and butterflies 2: morphology, physiology, and development*, pp. 449–468. Walter de Gruyter, Berlin – New York.
- Dhar MK, Friebe B, Kaul S a kol. (2006) Characterization and Physical Mapping of Ribosomal RNA Gene Families in *Plantago*. *Ann Bot* 97, 541-548.

- Dincă V, Lukhtanov V, Talavera G a kol. (2011) Unexpected layers of cryptic diversity in wood white *Leptidea* butterflies. *Nature Comm* 2, 1-8.
- Eagle S a Crease T (2012) Copy number variation of ribosomal DNA and Pokey transposons in natural populations of *Daphnia*. *Mobile DNA* 3, 4.
- Eickbush D a Eickbush TH (2003) Transcription of endogenous and exogenous R2 elements in the rRNA gene locus of *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*. 23, 3825–3836.
- Eickbush T a Eickbush D (2007) Finely orchestrated movements: Evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* 175, 477-485.
- Eichler EE and Sankoff D (2003) Structural Dynamics of Eukaryotic Chromosome Evolution. *Science* 301, 793-797.
- Eirín-López JM, Fernanda Ruiz M, Gonzalez-Tizon AM a kol. (2004) Molecular evolutionary characterization of the mussel *Mytilus* histone multigene family: first record of a tandemly repeated unit of five histone genes containing an H1 subtype with "orphan" features. *J Mol Evol* 58, 131–144.
- Faria R a Navarro A (2010) Chromosomal speciation revisited: Rearranging theory with pieces of evidence. *Trends Ecol Evol* 25, 660–669.
- Fuková I, Nguyen P a Marec F (2005) Codling moth cytogenetics: karyotype, chromosomal location of rDNA, and molecular differentiation of sex chromosomes. *Genome* 48, 1083-1092.
- Fuková I, Traut W, Vitková M a kol. (2007) Probing the W chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin. *Chromosoma* 116, 135-145.
- Gardner PP, Fasold M, Burge SW a kol. (2015) Conservation and Losses of Non-Coding RNAs in Avian Genomes. *PLoS ONE* 10, e0121797.
- Goodpasture C (1976) High-resolution chromosome analysis in Lepidoptera. *Ann Entomol Soc Amer* 4, 764-771.
- Gornung E (2013) Twenty years of physical mapping of major ribosomal RNA genes across the Teleosts: A review of research. *Cyto Gen Res* 141, 90-102.
- Grozeva S, Kuznetsova VG a Anokhin BA (2011) Karyotypes, male meiosis and comparative FISH mapping of 18S ribosomal DNA and telomeric (TTAGG)_n repeat in eight species of true bugs (Hemiptera, Heteroptera). *Comparat Cytogen* 5, 355-374.
- Chirino MG a Bressa MJ (2014) Karyotype evolution in progress: A new diploid number in *Belostoma candidulum* (Heteroptera: Belostomatidae) from Argentina leading to new insight into its ecology and evolution. *Eur J Entomol* 111, 165-174.
- Hellemans J, Mortier G, De Paepe A a kol. (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Gen Biol* 8, R19.

- Huang S (2002) Building an efficient factory where is pre-rRNA synthesized in the nucleolus? *J Cell Biol* 157, 739-741.
- Jiggins CD, Mavarez J, Beltrán M a kol. (2005) A genetic linkage map of the mimetic butterfly *Heliconius melpomene*. *Genetics* 171, 557–570.
- Kawahara AY a Breinholt JV (2014) Phylogenomics provides strong evidence for relationships of butterflies and moths. *Proc Royal Soc London B: Biol Sci.* 281.
- Keil CB, Mason CE a Showers WB (1990) Apyrene spermatogenesis in *Ostrinia nubilalis* (Hübner): obligate and facultative diapausing strains. *J Hered* 81, 72–74
- Kiauta B a Lankhorst (1969) The chromosomes of the caddis-fly, *Glyptotaelius pellucidus* (Retzius, 1783) (Trichoptera: Limnephilidae, limnephilinae). *Genetica* 40, 1-6.
- Kojima KK, Kuma K, Toh H a kol. (2006) Identification of rDNA-Specific Non-LTR Retrotransposons in Cnidaria. *Mol Biol Evol* 23, 1984-1993.
- Krishnan P, Sapra VT, Soliman KM a kol. (2000) FISH mapping of the 5S and 18S-28S rDNA loci in different species of *Glycine*. *J Heredity* 92, 295-300.
- LeRiche K, Eagle SH a Crease TJ (2014) Copy Number of the Transposon, *Pokey*, in rDNA Is Positively Correlated with rDNA Copy Number in *Daphnia obtusa*. *PLoS ONE* 9.
- Libertini A, Vitturi R, Lannino A a kol. (2006) Fish mapping of 18S rDNA and (TTAGGG)_n sequences in two pipefish species (Gasteroisteiformes: Syngnathidae). *J Genetics* 85, 153-156.
- Lockwood APM (1961) “Ringer” solutions and some notes on the physiological basis of their ionic composition. *Comparat Biol Phys* 2, 241-289.
- Lohr D, Tatchell K a Van Holde K (1977) On the occurrence of nucleosome phasing in chromatin. *Cell* 12, 829–836.
- Lukhtanov VA (2000) Sex chromatin and sex chromosome systems in nonditrysian Lepidoptera (Insecta). *J Zoo Sys Evol Res* 38, 73-79.
- Lukhtanov VA, Dinca V, Talavera G a kol. (2011) Unprecedented within-species chromosome number cline in the Wood White butterfly *Leptidea sinapis* and its significance for karyotype evolution and speciation. *BMC Evol Biol* 11, 109-120.
- Lukhtanov VA (2015) The blue butterfly *Polyommatus (Plebicula) atlanticus* (Lepidoptera, Lycaenidae) holds the record of the highest number of chromosomes in the non-polyloid eukaryotic organisms. *Comparat Cytogen* 9, 683–690.
- Manchado M, Zuasti E, Cross I a kol. (2006) Molecular characterization and chromosomal mapping of the 5S rRNA gene in *Solea senegalensis*: a new linkage to the U1, U2, and U5 small nuclear RNA genes. *Genome* 49, 79–86.
- Marec F a Traut W (1994) Sex chromosome pairing and sex chromatin bodies in WZ translocation strains of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). *Genome* 37, 426-435.
- Marec F a Novák K (1998) Absence of sex chromatin corresponds with a sex-chromosome univalent in females of Trichoptera. *Eur J Entomol* 95, 197-209.

- Marz M, Kirsten T a Stadler PF (2008) Evolution of spliceosomal snRNA genes in metazoan animals. *J Mol Evol* 67, 594-607.
- Mediouni J, Fuková I, Frydrychová R a kol. (2004) Karyotype, sex chromatin and sex chromosome differentiation in the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae). *Caryologia* 57, 184-194.
- Mesa A, Somarelli JA a Herrera RJ (2008) Small nuclear RNA variants of three *Bombyx mori* strains. *Entomol Res* 38, 61-68.
- Merlo MA, Cross I, Rodríguez-Rúa A a kol. (2013) First approach to studying the genetics of the mearge (*Argyrosomus regius*, Asso, 1801) using three multigene families. *Aquacul Res* 44, 974-984.
- Mita K, Kasahara M, Sakasi S a kol. (2004) The Genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Res* 11, 27-35.
- Mount SM, Gotea V, Lin CF a kol. (2007) Spliceosomal small nuclear RNA genes in 11 insect genomes. *RNA* 13, 5-14.
- Murakami A a Imai HT (1974) Cytological evidence for holocentric chromosomes of silkworms, *Bombyx mori* and *B. mandarina*, (Bombycidae, Lepidoptera). *Chromosoma* 47, 167-178.
- Nagel S a Grossbach U (2000) Histone H1 genes and histone gene clusters in the genus *Drosophila*. *J Mol Evol* 51, 286-298.
- Nagoda N, Fukuda A, Nakashima Y a kol. (2005) Molecular characterization and evolution of the repeating units of histone genes in *Drosophila americana*: coexistence of quartet and quintet units in a genome. *Ins Mol Biol* 14, 713-717.
- Nei M a Rooney AP (2005) Concerted and Birth-and-Death Evolution of Multigene Families. *Ann Rev Gen* 39, 121-152.
- Neto MSR, Souza MJ a Loreto V (2013) Chromosomal evolution of rDNA and H3 histone genes in representative Romaleidae grasshoppers from northeast Brazil. *Mol Cytogen* 6, 41.
- van Nieuwerkerken EJ, Kaila L, Kitching IJ a kol. (2011) Order Lepidoptera Linnaeus, 1758. In: Zhang ZQ, editor. Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. *Zootaxa* 3148, 212-221.
- Nguyen P, Sahara K, Yoshido A a kol. (2010) Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica* 138, 343-354.
- Nguyen P, Sýkorová M, Šíchová J a kol. (2013) Neo-sex chromosomes and adaptive potential in tortricid pests. *Proc Nat Acad Sci USA* 110, 6931-6936.
- Nylin S, Nyblom K, Ronquist F a kol. (2001) Phylogeny of *Polygona*, *Nymphalis* and related butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae): a total-evidence analysis. *Zoo J Linn Soc* 132, 441-468.

- Nilsson NO, Löfstedt C a Dävring L (1988) Unusual sex chromosome inheritance in six species of small hermine moths (Yponomeuta, Yponomeutidae, Lepidoptera). *Hereditas* 108, 259–265.
- O'Reilly D, Dienstbier M, Cowley SA a kol. (2013) Differentially expressed, variant U1 snRNAs regulate gene expression in human cells. *Gen Res* 23, 281-291.
- Palacios-Gimenes OM, Castillo ER, Martí DA a kol. (2013) Tracking the evolution of sex chromosome system in Melanoplinae grasshoppers through chromosomal mapping of repetitive DNA sequences. *BMC Evol Biol* 13, 167.
- Penton EH a Crease TJ (2004) Evolution of the transposable element Pokey in the ribosomal DNA of species in the subgenus *Daphnia* (Crustacea:Cladocera). *Mol Biol Evol* 21, 1727–1739.
- Pita S, Panzera F, Ferrandis I a kol. (2013) Chromosomal divergence and evolutionary inferences in *Rhodniini* based on the chromosomal location of ribosomal genes. *Mem instit O Cruz* 108, 376-382.
- Pringle EG, Baxter SW, Webster CL a kol. (2007) Synteny and chromosome evolution in the lepidoptera: Evidence from mapping in *Heliconius melpomene*. *Genetics* 177, 417–426.
- Puplesiene J (1993) A brief account of karyotypes of mining Lepidoptera. *Entomol Oboz* 72, 295-303.
- Raška I, Shaw PJ a Cmarko D (2006) Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr Opin Cell Biol* 18, 325–334.
- Ratray AMJ a Muller B (2012) The control of histone gene expression. *Biochem Soc Transac* 4, 880-885.
- Regier JC, Grant MC, Mitter C a kol. (2008) Phylogenetic relationships of wild silkmoths (Lepidoptera: Saturniidae) inferred from four protein-coding nuclear genes. *System Entomol* 33, 219–228.
- Regier JC, Mitter C, Zwick A a kol. (2013) A large-scale, higher-level, molecular phylogenetic study of the insect order Lepidoptera (moths and butterflies). *PLoS One* 8, e58568.
- Rego A 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.
- Roa F a Guerra M (2012) Distribution of 45S rDNA sites in chromosomes of plants: Structural and evolutionary implications. *BMC Evol Biol* 12, 225.
- Robbins R (1982) How many butterfly species? *News Lepidopteran Society*, 40-41.
- Robinson R (1971) *Lepidoptera Genetics*. Pergamon Press, Oxford.
- Roehrdanz R, Heilmann L, Senechal P a kol. (2010) Histone and ribosomal RNA repetitive gene clusters of the boll weevil are linked in a tandem array. *Ins Mol Biol* 19, 463-471.

- Sadhotra M (2009) Molecular divergence of the W chromosomes in pyralid moths (Lepidoptera). *Asian J Biol Sci* 1, 47-52.
- Sahara K, Marec F a Traut W (1999) TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Res* 7, 449-460.
- Sahara K, Yoshido A, Kawamura N a kol. (2003a) W-derived BAC probes as a new tool for identification of the W chromosome and its aberrations in *Bombyx mori*. *Chromosoma* 112, 48-55.
- Sahara K, Marec F, Eickhoff U a kol. (2003b) Moth sex chromatin probed by comparative genomic hybridization (CGH). *Genome* 46, 339-342.
- Sahara K, Yoshido A a Traut W (2012) Sex chromosome evolution in moths and butterflies. *Chromosome Res* 20, 83-94.
- Sahara K, Yoshido A, Shibata F a kol. (2013) FISH identification of *Helicoverpa armigera* and *Mamestra brassicae* chromosomes by BAC and fosmid probes. *Ins Biochem Mol Biol* 43, 644-653.
- Sember A, Bohlen J, Šlechtová V a kol. (2015) Karyotype differentiation in 19 species of river loach fishes (Nemacheilidae, Teleostei): extensive variability associated with rDNA and heterochromatin distribution and its phylogenetic and ecological interpretation. *BMC Evol Biol* 15, 251.
- Sierra-Montes JM, Pereira-Simon S, Freund AV a kol. (2003) A diversity of U1 small nuclear RNAs in the silk work *Bombyx mori*. *Ins Biochem Mol Biol* 33, 29-39.
- Schienman JE, Lozovskaya ER a Strausbaugh LR (1998) *Drosophila virilis* has atypical kinds and arrangements of histone repeats. *Chromosoma* 107, 529-539.
- Schmidt T, Schwarzacher T a Heslop-Harrison JS (1994) Physical mapping of rRNA genes by fluorescent in-situ hybridization and structural analysis of 5S rRNA genes and intergenic spacer sequences in sugar beet (*Beta vulgaris*). *Theor Appl Genetics* 88, 629-636.
- Schneider R a Grosschedl R (2007) Dynamics and interplay of nuclear architecture, genome organization, and gene expression. *Gen Develop* 21, 3027-3043.
- Schubert I (1984) Mobile Nucleolus Organizing Regions (NORs) in *Allium* (Liliaeae s. lat.)? -- Inferences from the Specificity of Silver Staining. *Plant System Evol* 144, 291-305.
- Schubert I a Wobus U (1985) In situ hybridization confirms jumping nucleolus organizing regions in *Allium*. *Chromosoma* 92, 143-148
- Silva DM, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R a kol. (2013) Chromosomal organization of repetitive DNA sequences in *Astyanax bockmanni* (Teleostei, Characiformes): dispersive location, association and co-localization in the genome. *Genetica* 7, 329-336.
- Sohn JC, Labandeira CC a Davis DR (2015) The fossil record and taphonomy of butterflies and moths (Insecta, Lepidoptera): implications for evolutionary diversity and divergence-time estimates. *BMC Evol Biol* 15.

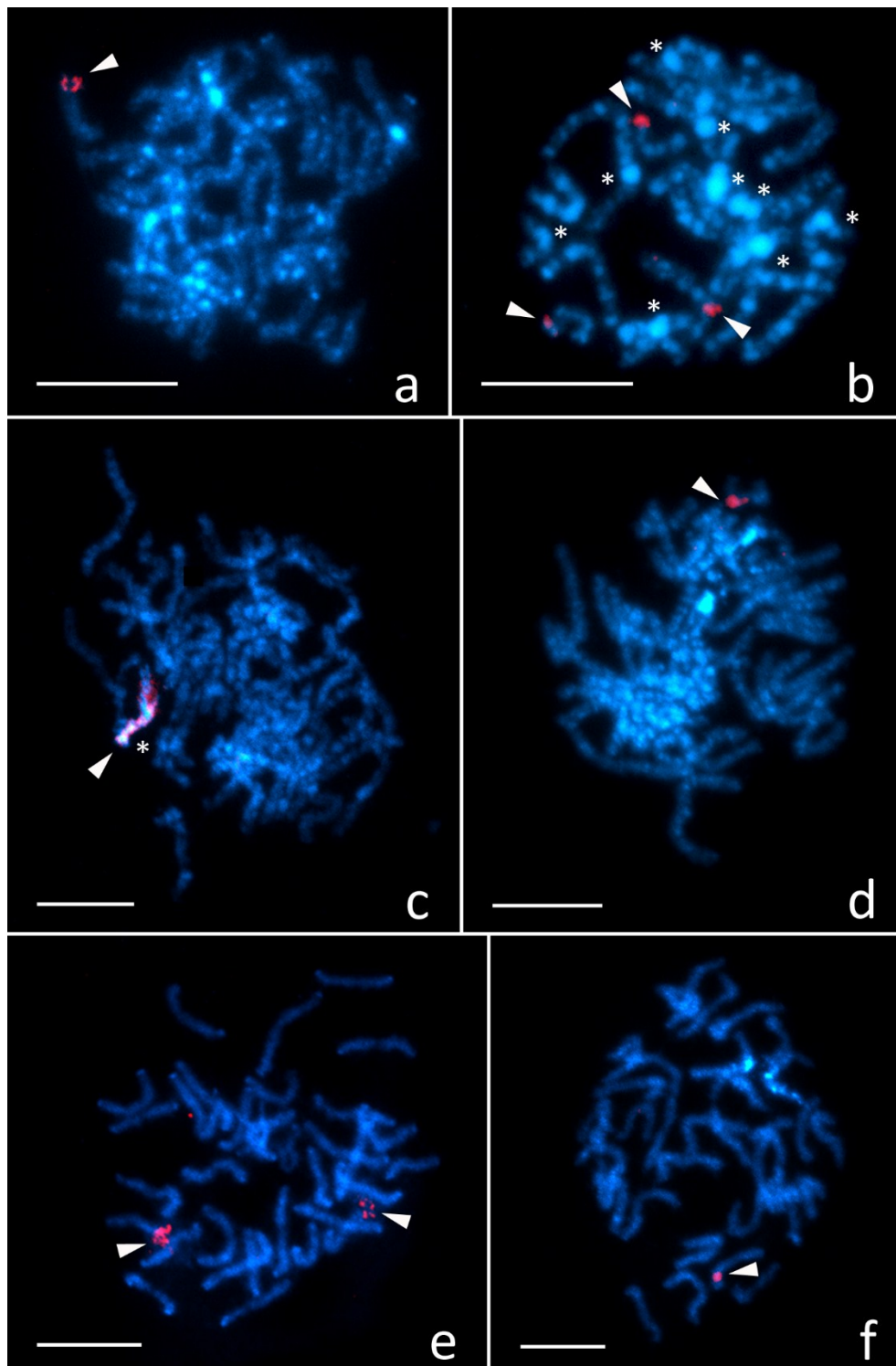
- Symonová R, Majtánová Z, Sember A a kol. (2013) Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. *BMC Evol Biol* 13, 42.
- Šíchová, J, 2011: Srovnání molekulární divergence pohlavních chromosomů a autosomů u příbuzných druhů obalečů (Tortricidae) Magisterská práce, v češtině, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Česká republika.
- Šíchová J, Nguyen P, Dalíková M a kol. (2013) Chromosomal evolution in tortricid moths: conserved karyotypes with diverged features. *PLoS ONE* 8, e64520.
- Šíchová J, Voleníková A, Dincă V a kol. (2015) Dynamic karyotype evolution and unique sex determination systems in *Leptidea* wood white butterflies. *BMC Evol Biol* 15, 89.
- Šíchová J, Ohno M, Dincă V a kol. (2016) Fissions, fusions, and translocations shaped the karyotype and multiple sex chromosome constitution in the northeast-Asian wood white butterfly, *Leptidea amurensis*. *Biol J Lin Soc* (accepted 12 Nov. 2015).
- Traut W (1976) Pachytene mapping in the female silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera). *Chromosoma* 58, 275-284.
- Traut W a Marec F (1996) Sex chromatin in Lepidoptera. *Q Rev Biol* 71, 239-256.
- Traut W a Marec F (1997) Sex chromosome differentiation in some species of Lepidoptera (Insecta). *Chromosome Res* 5, 283-291.
- Traut W, Sahara K, Otto T a kol. (1999) Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma* 108, 173-180.
- Traut W, Sahara K a Marec F (2007) Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sex Develop* 1, 332-346.
- Turner PC, Bagenal EB, Vlad MT a kol. (1988) The organization and expression of histones genes from *Xenopus borealis*. *Nuc Acid Res* 16, 3271-3485.
- van Nieukerken E, Kaila L, Kitching IJ a kol. (1758) Order Lepidoptera Linnaeus. In *Animal Biodiversity: An Outline of Higher-level Classification and Survey of Taxonomic Richness*. Edited by Zhang Z. *Zootaxa* 3148, 212–21.
- Van't Hof AE, Marec F, Saccheri IL a kol. (2008). Cytogenetic characterization and AFLP-based genetic linkage mapping for the butterfly *Bicyclus anynana*, covering all 28 karyotyped chromosomes. *PLoS ONE* 110, e3882.
- Van't Hof AE, Nguyen P, Dalíková M a kol. (2013) Linkage map of the peppered moth, *Biston betularia* (Lepidoptera, Geometridae): a model of industrial melanism. *Heredity* 110, 283-295.
- Vierna J, Jensen KT, Martinez-Lage A a kol. (2011) The linked units of 5S rDNA and U1 snDNA of razor shells (Mollusca: Bivalvia: Pharidae). *Heredity* 107, 127–142.
- Vierna J, Wehner S, Höner zu Siederdisen C a kol. (2013) Systematic analysis and evolution of 5S ribosomal DNA in metazoans. *Heredity* 111, 410-421.

- Vítková M, Král J, Traut W a kol. (2005) The evolutionary origin of insect repeats, (TTAGG)_n. *Chromosome Res* 13, 145-156.
- Vítková M, Fuková I, Kubíčková S a kol. (2007) Molecular divergence of the W chromosomes in pyralid moths (Lepidoptera). *Chromosome Res* 15, 917-930.
- Vitturi R, Colomba MS, Pirrone A a kol. (2000) Physical mapping of rDNA genes, (TTAGGG)_n telomeric sequence and other karyological features in two earthworms of the family Lumbricidae (Annelida: Oligochaeta). *Heredity* 3, 203-207.
- Vershinina AO, Anokhin BA a Lukhtanov VA (2015) Ribosomal DNA clusters and telomeric (TTAGG)_n repeats in blue butterflies (Lepidoptera, Lycaenidae) with low and high chromosome numbers. *Comparat Cytogen* 9, 161-171.
- Wahlberg N, Weingartner E a Nylin S (2003) Towards a better understanding of the higher systematics of Nymphalidae (Lepidoptera: Papilionoidea). *Mol Phylogen Evol* 28, 473-484.
- Wolf K, Novák K a Marec F (1997) Kinetic organization of metaphase I bivalents in spermatogenesis of Lepidoptera and Trichoptera species with small chromosome numbers. *Heredity* 79, 135-143.
- Wu C, Asakawa S, Shimizu N a kol. (1999) Construction and characterization of bacterial artificial chromosome libraries from the silkworm, *Bombyx mori*. *Mol Gen Genom* 261, 698-706.
- Xia Q, Zhou Z, Lu C a kol. (2004) A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science* 306, 1937-1940.
- Yamamoto K, Nohata J, Kadono-Okuda K a kol. (2008) A BAC-based integrated linkage map of the silkworm *Bombyx mori*. *Gen Biol* 9.
- Yasukochi Y, Ashakumary LA, Baba K a kol. (2006) A second-generation integrated map of the silkworm reveals synteny and conserved gene order between lepidopteran insects. *Genetics* 173, 1319-1328.
- Yasukochi Y, Tanaka-Okuyama M, Shibata F a kol. (2009) Extensive conserved synteny of genes between the karyotypes of *Manduca sexta* and *Bombyx mori* revealed by BAC-FISH mapping. *Plos ONE* 4, e7465.
- Yoshido A, Marec F a Sahara K (2005a) 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.
- Yoshido, A, Bando H, Yasukochi Y a kol (2005b) The *Bombyx mori* karyotype and the assignment of linkage groups. *Genetics* 170, 675-685.
- Yoshido A, Yasukochi Y a Sahara K (2011) *Samia cynthia* versus *Bombyx mori*: Comparative gene mapping between a species with a low-number karyotype and the model species of Lepidoptera. *Insect Biochem Mol Biol* 41, 370-377.

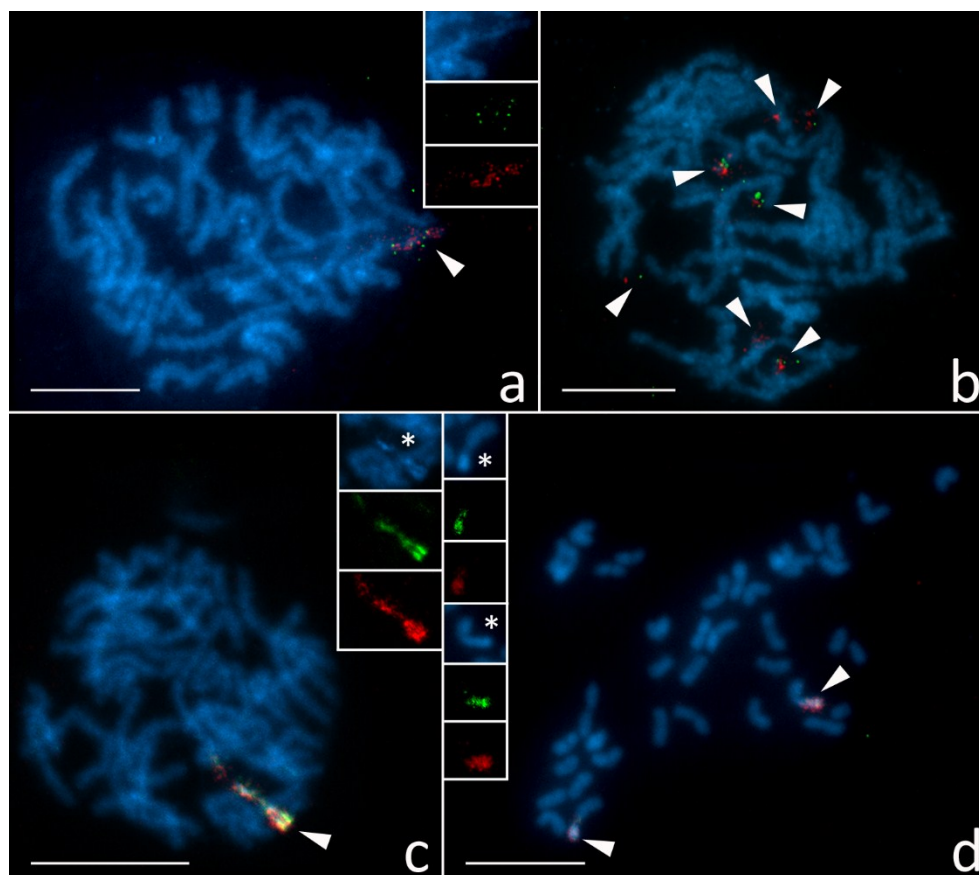
- Zahiri R, Kitching IJ, Lafontaine DJ a kol. (2011) A new molecular phylogeny offers hope for a stable family level classification of the Noctuoidea (Lepidoptera). *Zoo Script* 40, 158-173.
- Zhan S, Merlin C, Boore JL a kol. (2011) The monarch butterfly genome yields insights into long-distance migration. *Cell* 147, 1171–1185.
- Zhang L, Bao Z, Wang A a kol. (2007) Chromosome rearrangements in Pectinidae (Bivalvia: Pteriomorphia) implied based on chromosomal localization of histone H3 gene in four scallops. *Genetica* 130, 193-198.

8. Přílohy

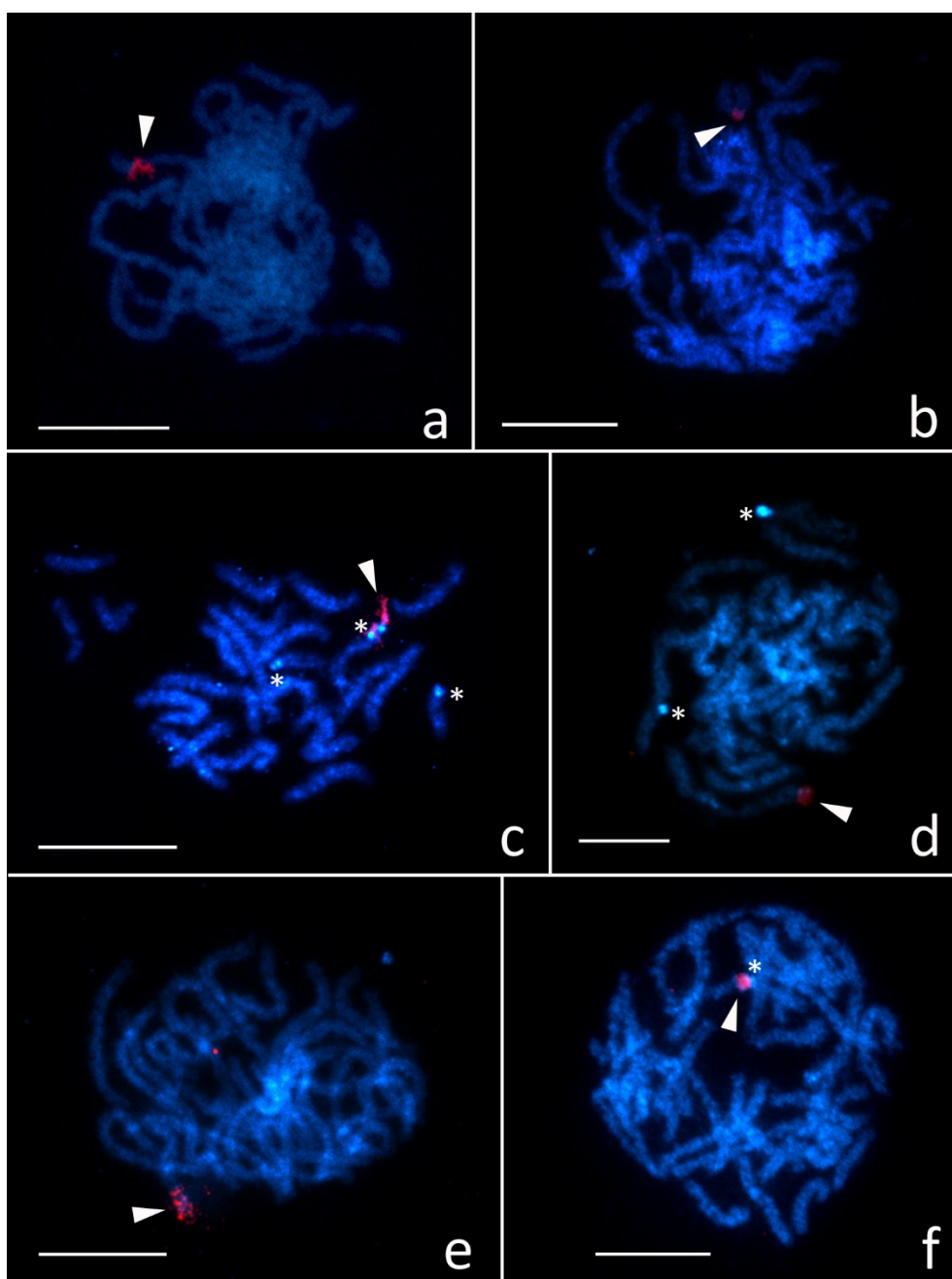
Příloha I Obrazová dokumentace výsledků FISH experimentů.



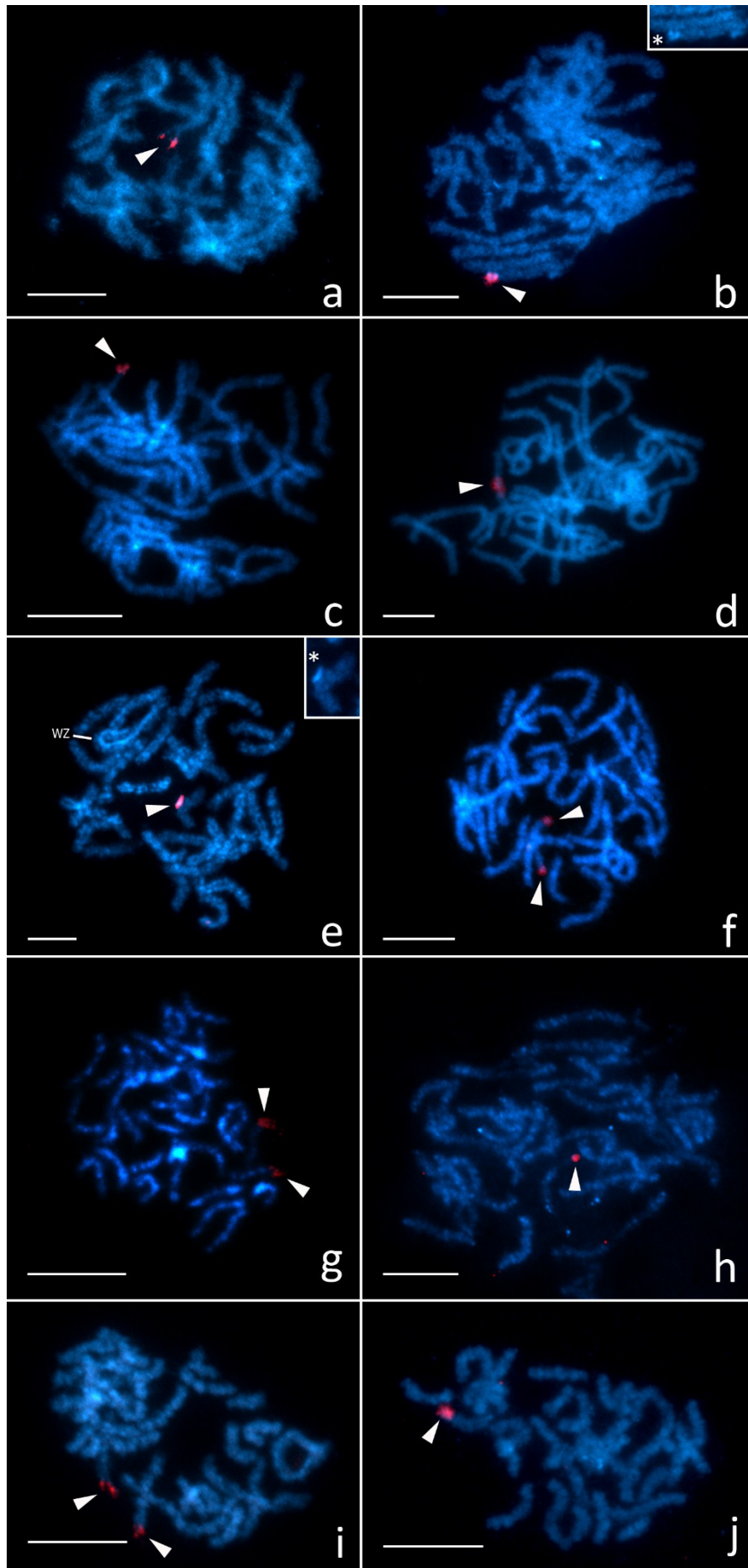
Obr. 1: (předchozí strana) Lokalizace genů pro rDNA a histon H3 detekovaných na chromosomálních preparátech zástupců nadčeledí Limnephiloidea (Trichoptera) (**a, b**) a Hepialoidea (Lepidoptera) (**c-f**) FISH s 18S rDNA sondou (**a, c, e**; červené signály, označeny hroty šipek) a TSA-FISH se sondou pro histon H3 (**b, d, f**; červené signály, označeny hroty šipek). Chromosomy byly podbarveny DAPI (modrá). **a** – samičí pachytenní jádro *G. pellucidus*, **b** - samičí pachytenní jádro *G. pellucidus*, **c** – pachytenní jádro samce *H. humuli*; signál rozptýlený po přibližně polovině chromosomálního páru kolokalizuje s heterochromatinovým blokem, **d** – Samčí jádro *H. humuli*, **e** – samčí pachytenní jádro *P. californicus*. **f** – Pachytenní komplement *P. californicus*. * DAPI pozitivní heterochromatinový blok. Měřítko 10 μm.



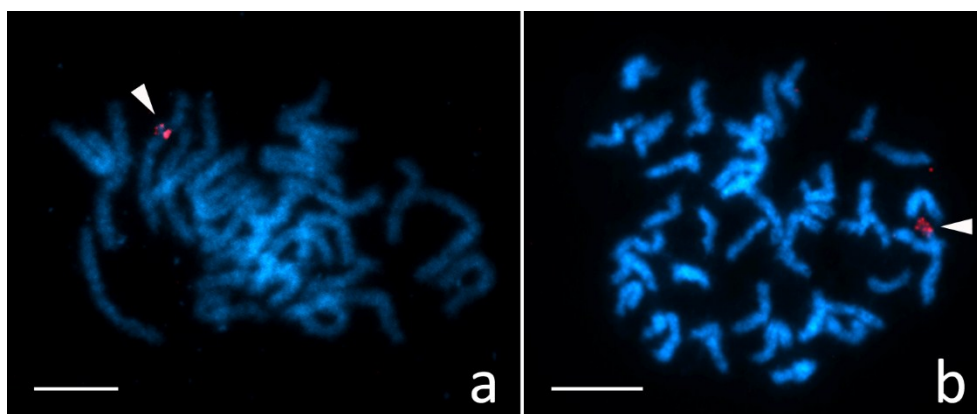
Obr. 2: Lokalizace genů pro rDNA detekovaných na chromosomálních preparátech *C. ohridella* (**a**), *A. urticae* (**b**) a *H. humuli* (**c, d**) dvojitou FISH s 18S rDNA (červená) a 28S rDNA sondou (zelená). Chromosomy byly podbarveny DAPI (modrá). **a** – samčí pachytenní komplement *C.ohridella*, ve výřezu detail chromosomů barvených DAPI a jednotlivých signálů, **b** – meiotické jádro samce *A. urticae*, rDNA lokusy označeny šipkou, **c** – samčí pachytenní jádro *H.humuli*, ve výřezu detail chromosomů barvených DAPI a jednotlivých signálů, **d** – nekompletní samčí mitotické jádro *H.humuli*. * DAPI pozitivní heterochromatinový blok. Měřítko 10 μm.



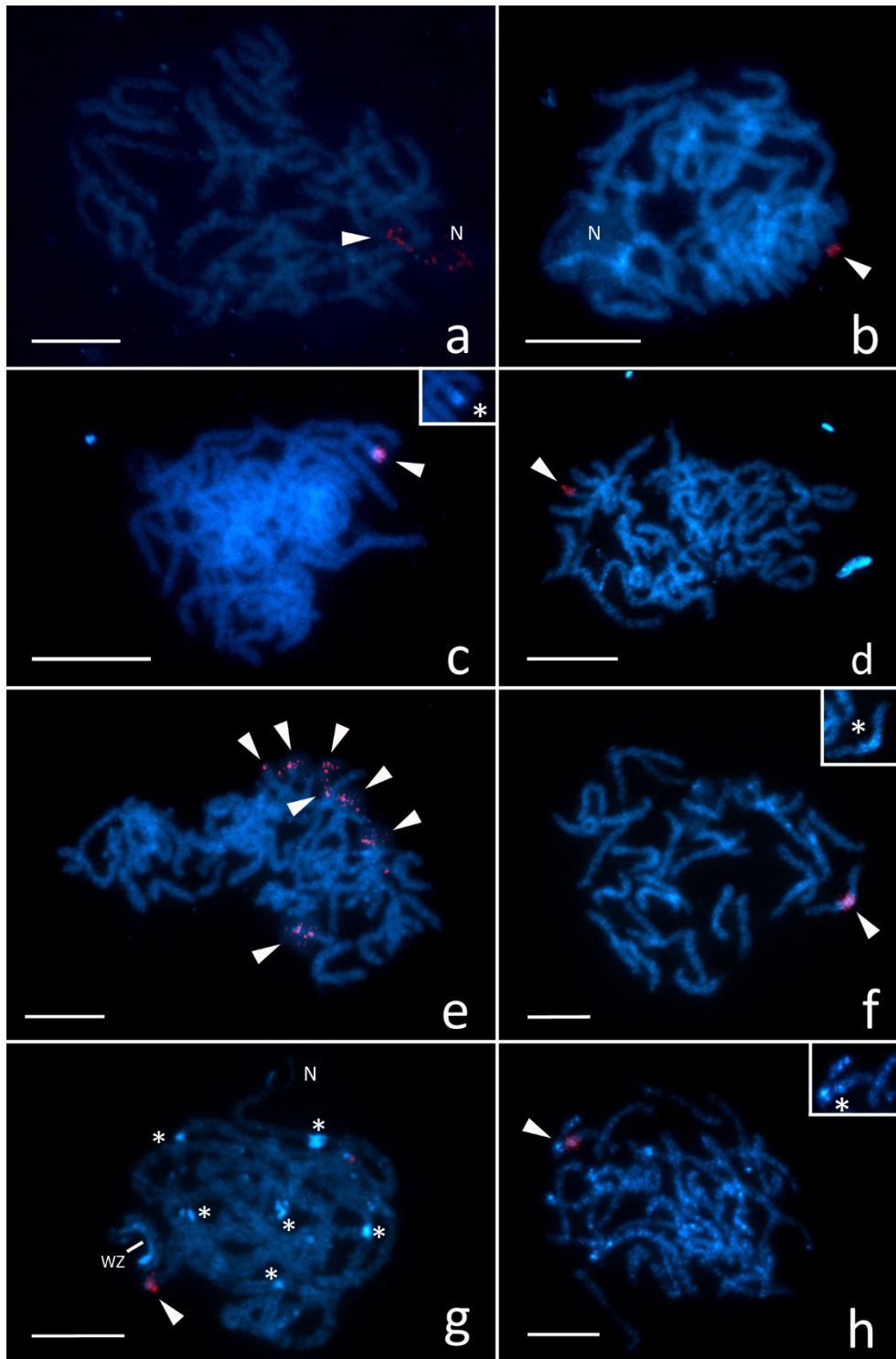
Obr. 3: Lokalizace genů pro rDNA a histon H3 detekovaných na chromosomálních preparátech zástupců nadčeledí Tineoidea (**a, b**), Tischerioidea (**c, d**) a Gracillarioidea (**e, f**) FISH s 18S rDNA sondou (**a, c, e**; červené signály, označeny hroty šipek) a TSA-FISH se sondou pro histon H3 (**b, d, f**; červené signály, označeny hroty šipek). Chromosomy byly podbarveny DAPI (modrá), **a** – pachytennímu jádro samce *T. bisselliella*, **b** – samčí pachytenní jádro *T. bisselliella*, **c** – pachytenní komplement samce *T. ekebladella*, **d** – samčí jádro *T. ekebladella*, **e** – samčí pachytenní jádro *C. ohridella*, hybridizační signál 18S rDNA pokrývá neobvykle velkou část bivalentu, **f** – pachytenní jádro samce *C. ohridella*. * DAPI pozitivní heterochromatinový blok. Měřítko 10 μ m.



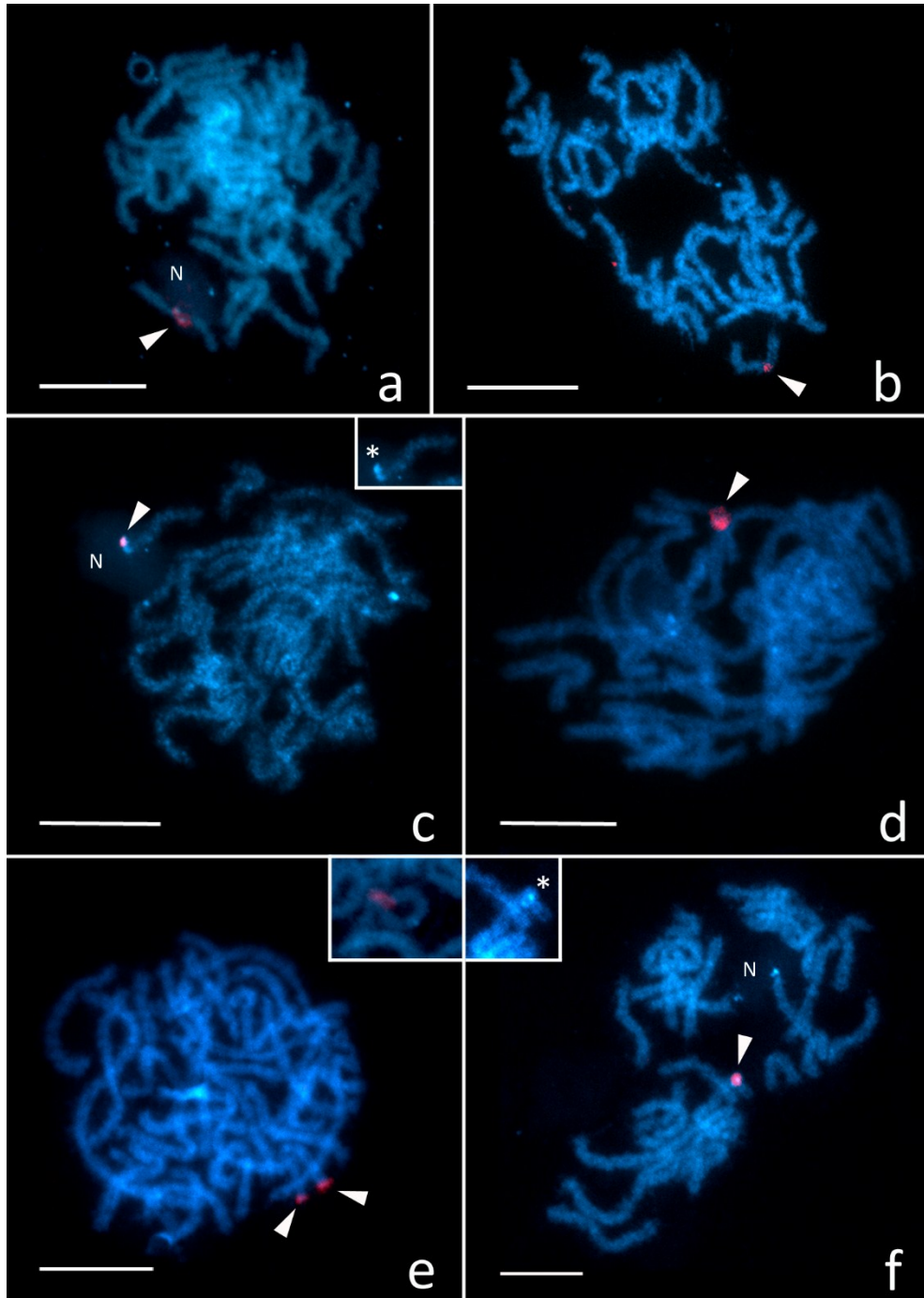
Obr. 4: (předchozí strana) Lokalizace genů pro rDNA a histon H3 detekovaných na chromosomálních preparátech zástupců nadčeledi Yponomeutoidea FISH s 18S rDNA sondou (**a, c, e, g, i**; červené signály, označeny hroty šipek) a TSA-FISH se sondou pro histon H3 (**b, d, f, h, j**; červené signály, označeny hroty šipek). Chromosomy byly podbarveny DAPI (modrá). **a** – samčí pachytenní komplement *P. xylostella*, **b** – pachytenní jádro samce *P. xylostella*, ve výřezu detail heterochromatinového bloku, **c** – samčí pachytenní jádro *T. gutella*, **d** – pachytenní jádro samce *T. gutella*, **e** – samičí pachytenní komplement *Y. plumbella* s viditelným bivalentem pohlavních chromosomů WZ, ve výřezu signálem označený silný heterochromatinový blok, **f** – pachytenní samičí jádro *Y. plumbella*, **g** – samčí meiotické jádro *Y. cagnagella*, **h** – samčí pachytenní komplement, **i** – pachytenní jádro samice *Y. evonymella*, **j** – samičí pachytenní komplement *Y. evonymella*. * DAPI pozitivní heterochromatinový blok. Měřítko 10 μm.



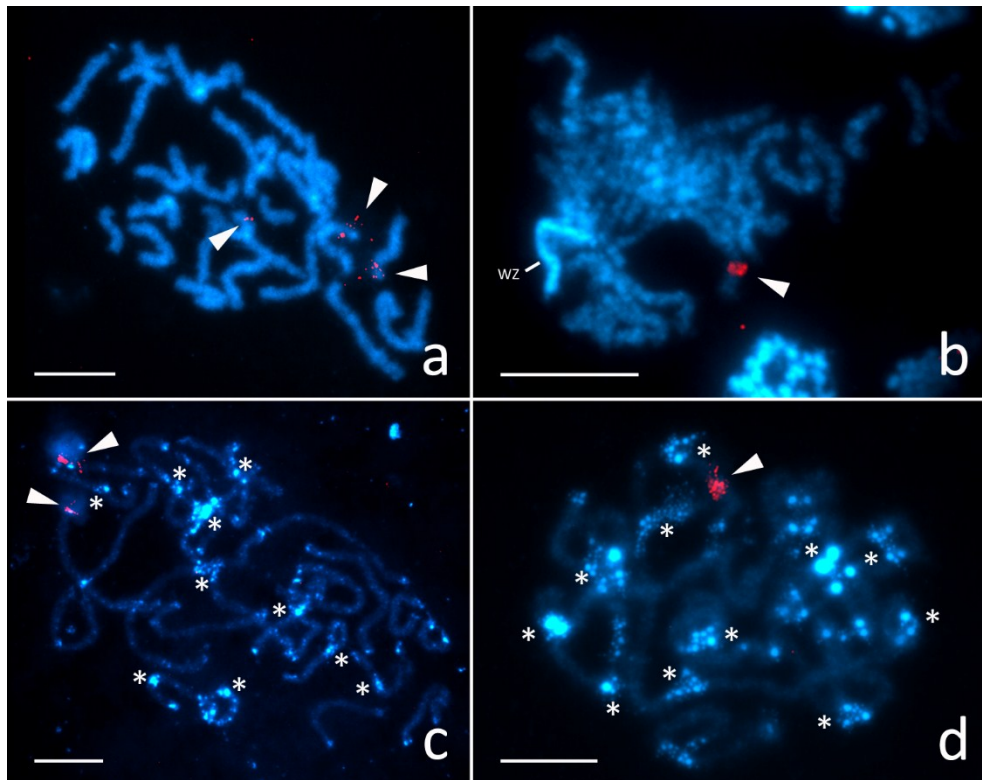
Obr. 5: Lokalizace genů pro rDNA a histon H3 detekovaných na chromosomálních preparátech *C. cossus*, zástupce nadčeledi Cossioidea FISH s 18S rDNA sondou (**a**; červený signál, označen hrotem šipky) a TSA-FISH se sondou pro histon H3 (**b**; červený signál, označen hrotem šipky). Chromosomy byly podbarveny DAPI (modrá), **a** – samčí pachytenní jádro, **b** – samčí pachytenní jádro. Měřítko 10 μm.



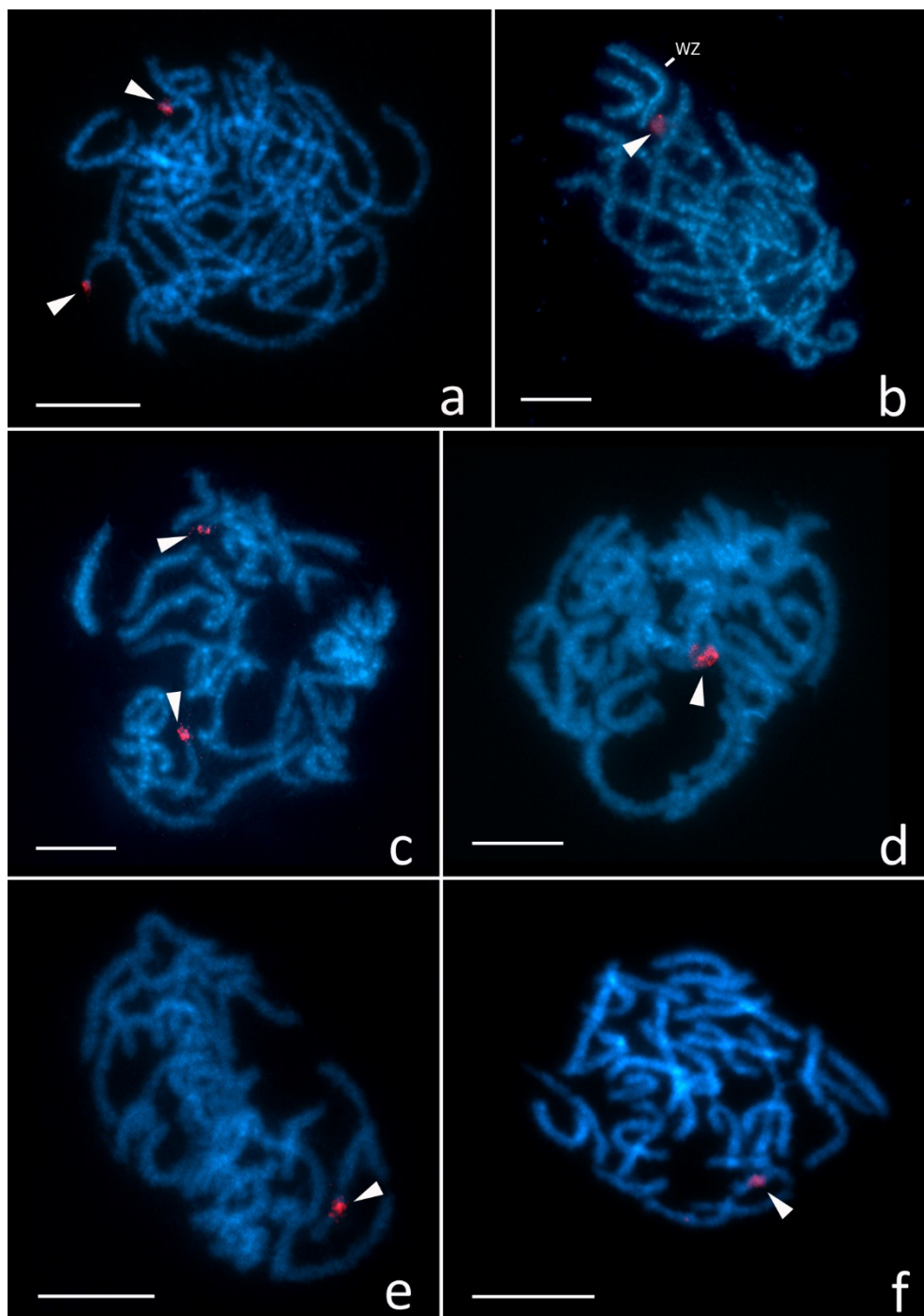
Obr. 6: Lokalizace genů pro rDNA a histon H3 detekovaných na chromosomálních preparátech zástupců nadčeledi Papilionoidea FISH s 18S rDNA sondou (**a, c, e**; červené signály, označeny hroty šipek) a TSA-FISH se sondou pro histon H3 (**b, d, f, g, h**; červené signály, označeny hroty šipek). Chromosomy byly podbarveny DAPI (modrá), **a** – samčí pachytenní komplement *P. rapae*, **b** – samčí komplement *P. rapae*, **c** – pachytenní jádro samce *G. rhamni*, ve výřezu detail heterochromatinového bloku, **d** – samčí meiotické jádro *G. rhamni*, **e** – samčí pachytenní komplement *A. urticae*, **f** – samičí pachytenní uskupení *A. urticae*, ve výřezu detail heterochromatinového bloku, **g** – samičí meiotické jádro *P. brassicae* s viditelným bivalentem pohlavních chromosomů WZ, **h** – samčí pachytenní jádro *I. io*, ve výřezu detail heterochromatinového bloku. * DAPI pozitivní heterochromatinový blok. N jadérko (NOR). Měřítko 10 μ m.



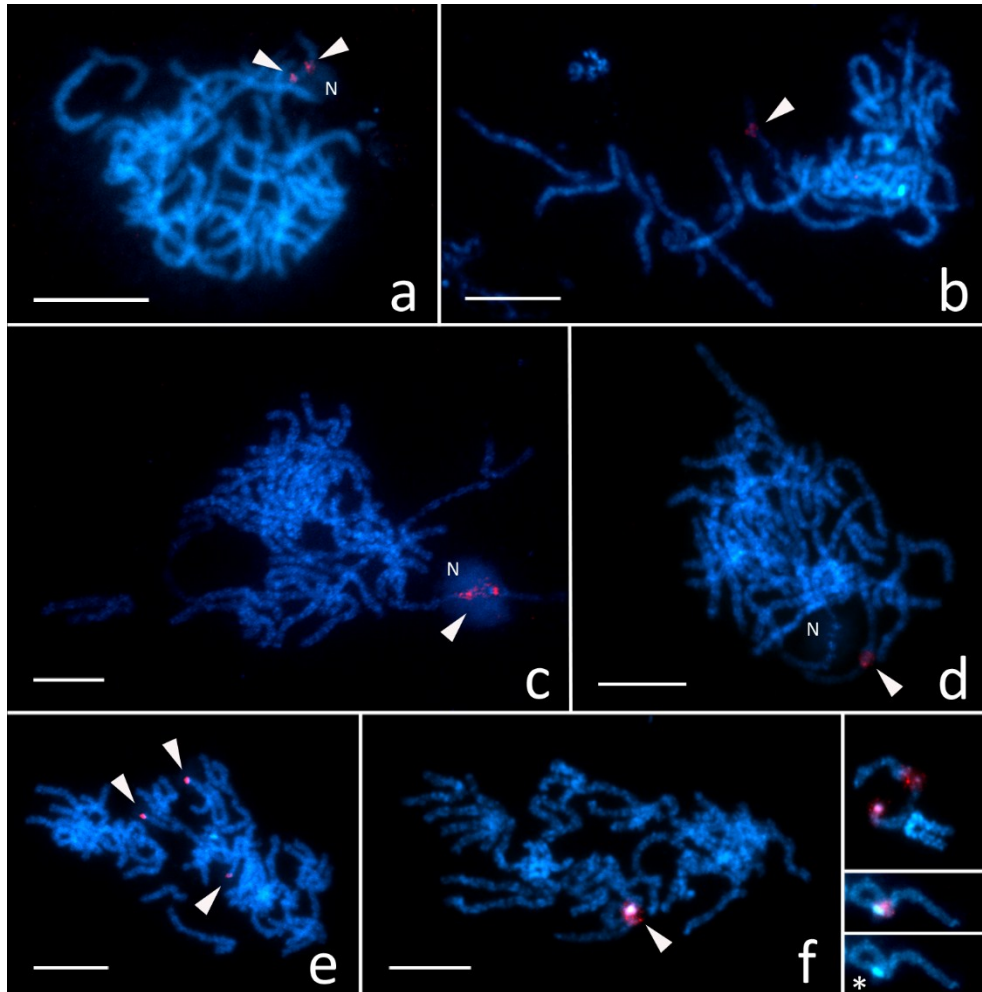
Obr. 7: Lokalizace genů pro rDNA a histon H3 detekovaných na chromosomálních preparátech zástupců nadčeledi Gelechioidea a Pyraloidea FISH s 18S rDNA sondou (**a**, **c**; červené signály, označeny hroty šipek) a TSA-FISH se sondou pro histon H3 (**b**, **d**, **e**, **f**; červené signály, označeny hroty šipek). Chromosomy byly podbarveny DAPI (modrá). **a** – samčí pachytenní jádro *D. daucella*, **b** – samčí jádro *D. daucella*, **c** – samčí pachytenní jádro *L. phragmitella*, ve výřezu detail heterochromatinového bloku, **d** – meiotický komplement samce *L. phragmitella*, **e** – samčí jádro ve stádiu pachytene *T. absoluta*, ve výřezu detail charakteristického stáčení chromosomu nesoucího klastry histonu H3, **f** – samčí pachytenní jádro *E. kuehniella* (Pyraloidea), ve výřezu detail heterochromatinového bloku. * DAPI pozitivní heterochromatinový blok. N jadérko (NOR). Měřítko 10 μ m.



Obr. 8: Lokalizace genů pro rDNA a histon H3 detekovaných na chromosomálních preparátech zástupců nadčeledi Geometroidea FISH s 18S rDNA sondou (**a, c**; červené signály, označeny hroty šipek) a TSA-FISH se sondou pro histon H3 (**b, d**; červené signály, označeny hroty šipek). Chromosomy byly podbarveny DAPI (modrá). **a** – samčí pachytenní komplement *B. betularia*, **b** – pachytenní jádro samice *B. betularia* s viditelným bivalentem pohlavních chromosomů WZ, **c** – samčí pachytenní jádro *A. grossulariata*, **d** – pachytenní jádro samce *A. grossulariata*. * DAPI pozitivní heterochromatinový blok. Měřítko 10 μm.



Obr. 9: Lokalizace genů pro rDNA a histon H3 detekovaných na chromosomálních preparátech zástupců nadčeledi Noctuoidea FISH s 18S rDNA sondou (**a, c, e**; červené signály, označeny hroty šipek) a TSA-FISH se sondou pro histon H3 (**b, d, f**; červené signály, označeny hroty šipek). Chromosomy byly podbarveny DAPI (modrá), **a** – samčí pachytenní jádro *C. vinula*, **b** – samičí meiotický komplement *C. vinula* s viditelným bivalentem pohlavních chromosomů WZ, **c** – pachytenní jádro samice *P. bucephala*, **d** – samičí jaderný komplement *P. bucephala*, **e** – samčí pachytenní jádro *S. frugiperda*, **f** – pachytenní jádro *S. frugiperda*. Měřítko 10 μm .



Obr. 10: Lokalizace genů pro rDNA a histon H3 detekovaných na chromosomálních preparátech zástupců nadčeledi Bombycoidea FISH s 18S rDNA sondou (**a, c, e**; červené signály, označeny hroty šipek) a TSA-FISH se sondou pro histon H3 (**b, d, f**; červené signály, označeny hroty šipek). Chromosomy byly podbarveny DAPI (modrá), **a** – samčí meiotické jádro *E. potatoria*, **b** - samčí pachytenní komplement *E. potatoria*, **c** – jádro samce *B. mori*, **d** – samčí pachytenní komplement *B. mori*, **e** – samčí pachytenní jádro *H. cecropia*, **f** – meiotický komplement samce *H. cecropia*, ve výřezech detail heterochromatinového bloku a typického formování bivalentů nesoucích histonové klastry * DAPI pozitivní heterochromatinový blok. N jádrko (NOR). Měřítko 10 μm.

Příloha II

Sekvence histonu H3 izolované z genomové DNA studovaných druhů pro TSA-FISH.

```
>Depresaria_daucella_histone_H3
CCTACGCGCAAGCTGAATGTCTTGGGCGTGATGGTGACACGCTTGGCGTGGATGGCGCACAGGTTTCGTGTCTT
CGAACAGACCGACCAGGTAAGCCTCGCTGGCCCTCTGGAGCGCCATGACGGCGGAGCTCTGGAAGCGAAGGTTCG
GTCTTGAAGTCTTGGACGATCTCACGGACGAGACGTTGGAAGGGCAGCTTGC GGATCAGGAGCTCCGTGCTCTT
CTGGTAGCGACGGATCTCACGGAGGGCTACTGTTCCGGCCCTGTAGCGATGCGGCTTCTTGACGCCTCCGGTGG
CGGGCGCGCTCTTGC GGCGGCCTTAGTGGCTAGCTGTTTGC GGCGAGCTTTACCACCGGTCGACTTACGAGCG
>Yponomeuta_evonymella_histone_H3
TCTGCGCGCCAGCTGAATGTCTTCCGGCATGATGGTGACGCGTTTGGCGTGGATCGCGCACAGGTTGGTGTCTT
CGAAGAGACCGACCAGGTAAGCCTCGCTGGCCCTCTGGAGGGCCATCACGGCGGAGCTCTGGAAGCGAAGGTTCG
GTCTTGAAGTCTTGGGCGATCTCGCGGACGAGACGCTGGAAGGGCAGCTTGC GGATCAGAAGCTCGGTGCTCTT
CTGGTAGCGACGGATCTCACGGAGGGCGACGGTACC GGTTCTGTAGCGATGGGGTTTCTTGACACCGCCGGTGG
CGGGCGCACTCTTGC GGCGGCCTTGGTGGCGAGCTGTTTGC GGCGGCTTTACCACCGGTGGATTTACGAGCG
>Yponomeuta_plumbella_histone_H3
CCTGCGAGCCAGCTGGATGTCTTGGGCATGATGGTGACACGCTTGGCGTGGATGGCGCACAGGTTGGTGTCTT
CGAAGAGACCGACGAGGTAAGCCTCGCTGGCCCTCTGGAGAGCCATAACGGCGGAGCTCTGGAAGCGCAGGTTCG
GTCTTGAAGTCTTGGAGCGATCTCACGGACCGAGACGCTGGAAGGGCAGCTTGC GGATCAGAAGCTCAGTGTCTT
CTGGTAGCGACGGATCTCACGTAGGGCTACGGTGCCGGTCTGTAGCGATGGGGTTTCTTGACACCGCCGGTGG
CGGGCGCACTCTTGC GGCGGCCTTGGTGGCGAGCTGTTTGC GGCGGCTTTACCACCGGTGGATTTACGAGCG
>Cossus_cussus_histone_H3
TCCTGCGAGCCAGCTGGATGTCTTGGGCATGATGGTGACACGCTTGGCGTGGATGGCGCACAGGTTGGTGTCTT
TCGAAGAGACCGACGAGGTAAGCCTCGCTGGCCCTCTGGAGAGCCATAACGGCGGAGCTCTGGAAGCGCAGGTTC
GGTCTTGAAGTCTTGGAGCGATCTCACGGACCGAGACGCTGGAAGGGCAGCTTGC GGATCAGAAGCTCAGTGTCTT
TCTGGTAGCGACGGATCTCACGTAGGGCTACGGTGCCGGTCTGTAGCGATGGGGTTTCTTGACACCGCCGGTGG
CGGGCGCACTCTTGC GGCGGCCTTGGTGGCGAGCTGTTTGC GGCGGCTTTACCACCGGTGGATTTACGAGCG
G
>Tuta_absoluta_histone_H3
ACGACGAGCGAGCTGGATGTCTTGGGCATGATGGTGACACGCTTGGCGTGGATCGCGCACAGGTTGGTGTCTT
CGAAGAGACCGACGAGGTAAGCCTCGCTGGCCCTCTGGAGGGCCATCACGGCGGACGACTGGAACCGGAGGTTCG
GTCTTGAAGTCTTGGAGCGATCTCACGGACGAGACGCTGGAAGGGCAGCTTGC GTATCAGAAGCTCGGTACTCTT
CTGGTAACGACGGATCTCACGGAGAGCGACGGTACC GGACGGTAACGGTGAGGCTTCTTACACCGCCGGTGG
CCGGTGC ACTCTTGC GCGCAGCTTTGGTGGCGAGCTGCTTACGCGGCCTTACCACCGGTGGATTTACGAGCG
>Spodoptera_frugiperda_histone_H3
CCTACGCGCCAGCTGGATGTCTTGGGCATGATGGTGACACGCTTGGCGTGGATGGCGCACAGGTTGGTGTCTT
CGAACAGACCGACCAGGTAAGCTTCGCTGGCCCTCTGCAGTGCCATCACGGCGGAGCTCTGGAACCGGAGATCG
GTCTTGAAGTCTTGGAGCGATCTCACGGACGAGACGCTGGAACGGGAGCTTGC GGATCAACAGCTCGGTACTCTT
CTGGTAACGACGGATCTCACGAAGAGCGACGGTTCGGGCTGTAGCGATGGGGCTTCTTGACACCGCCGGTGG
CCGGTGC GCTCTTACGCGCAGCCTTGGTGGCGAGCTGCTTCCCTCGGGCTTTGCCACCGGTGGATTTACGAGCG
>Abraxas_grossulariata_histone_H3
TTCTACGCGCCAAGTGTATGTCTTGGGCATGATGGTGACACGCTTCCGCTGAATCGCGCAAAGGTTGGTGTCTT
TCGAAAAGACCGACCAGATAGGCTTCGCTCGCCTCTGCAGCGCCATCACCGCGGAGCTCTGGAAGCGGAGGTTC
GGTCTTGAAGTCTTGTGCGATCTCACGCACCGACGCTGGAACGGCAACTTGC GGATCAGGAGCTCGGTACTCTT
TCTGGTAGCGACGGATCTCACGGAGAGCAACAGTCCGGGCTGTAGCGATGGGGTTTCTTACGCCGCCGGTGG
GCCGGTGC GCTCTTGC GCGCGGCTTTGGTGGCCAGCTGCTTGC GCGGCGCCTTACCACCGGTGGATTTGCGAGCG
G
>Euthrix_potatoria_histone_H3
TTCTGCGCGCCAAGTGTATGTCTTCCGGCATGATGGTTACTCGCTTGGCGTGGATCGCGCACAGATTGGTGTCTT
TCGAACAGACCGACCAGGTACGCCCTCGCTGGCCCTCTGGAGCGCCATAACTGCAGAGCTCTGGAACCGGAGATC
GGTCTTGAAGTCTTGTGCGATCTCGCGCACGAGACGCTGGAACGGCAGCTTGC GGATCAACAGCTCTGTGCTCTT
TCTGGTAACGACGGATCTCACGGAGAGCCACGGTACC GGCTGTAGCGATGTGGCTTCTTTACGCCGCCGGTGG
GCAGGCGCGCTCTTACGCGCAGCTTTGGTGGCGAGCTGCTTGC GCGGCGCCTTACCACCGGTAGATTTACGAGCG
G
>Plutella_xylostella_histone_H3
ACGGCGAGCGAGCTGGATGTCTTCCGGCATGATGGTGACACGCTTCCGCTGGATGGCGCACAGGTTAGTGTCTT
CGAAAAGACCGACGAGGTACGCCCTCGCTGGCCCTCTGGAGGGCCATAACGGCGGAGCTCTGGAACCGCAGGTCA
GTCTTGAAGTCTTGC GCGATCTCACGCACGAGACGCTGGAACGGCAGCTTGC GGATCAGAAGCTCAGTGTCTT
```

CTGGTAACGACGGATCTCACGAAGAGCGACGGTACCGGGCCTGTAACGATGGGGCTTCTTACACCTCCGGTGG
 CGGGCGCACTCTTACGAGCAGCCTTAGTTGCGAGCTGCTTGCAGGGGCGCTTTCCTCCGGTGGACTTGCAGGGCA
 >Tischeria_ekebladella_histone_H3
 ACGCCTGGCCAACTGGATGTCTTGGGCATGATGGTAACGCGTTTGGCGTGGATGGCGCACAGGTTTCGTGTCTT
 CGAATAGACCGACGAGGTAAGCCTCGCTCGCCTCCTGGAGGGCCATCACGGCGGAGCTCTGGAAACGCAGGTCC
 GTCTTGAAGTCTGTGCGATCTCACGCACGAGACGCTGGAAGGGCAGCTTGCAGGATAAGAAGCTCGGTGTCTTT
 CTGGTAACGACGGATCTCACGAAGAGCGACGGTACCGGGACGGTAACGATGAGGCTTCTTAACACCACCGGTTG
 CAGGGGCGCTCTTGCAGCCGCTTGGTGGCGAGCTGCTTACGTGGTGCTTTACCACCGGTCGACTTACGGGCA
 >Cameraria_ohridella_histone_H3
 GCGGCGAGCGAGCTGGATGTCTTGGGCATAATGGTTACACGCTTGGCGTGGATGGCGCACAGGTTGGTGTCTT
 CGAAGAGACCAACAAGGTATGCCTCGCTAGCCTCCTGGAGGGCCATCACTGCCGAGCTCTGGAAACGAAGATCT
 GTCTTGAAGTCTTGAGCGATCTCACGCACCAAACGCTGGAAGGGGAGTTTGCAGGATAAGAAGCTCGGTACTCTT
 CTGGTAACGACGGATCTCACGGAGAGCCACCGTTCCAGGCCTGTAACGATGGGGCTTCTTGACACCACCGGTTG
 CCGGGGCGCTCTTCTCGCCGCTTGGTGGCGAGCTGCTTCCCTAGGAGCCTTCTCCTGTGATTTACGGGCG
 >Hepialus_humuli_histone_H3
 GCGTCGCGCAGCTGGATGTCTTGGCATAATGGTGACGCGCTTGGCGTGGATGGCGCACAGGTTGGTGTCCC
 CGAAGAGACCCACGAGGTACGCTCGCTCGCCTCCTGCAGGGCCATCACGGCAGAGCTCTGGAAGCGGAGGTCCG
 GTCTTGAAGTCTTGAGCTATCTCGCGCACCAAACGCTGGAAGGGCAGCTTGCAGGATGAGCAGTTCCGTACTCTT
 CTGGTAGCGGCGGATCTCGCGCAACGCCACGGTGCCGGGCGGTTAGCGATGCGGCTTCTTCACTCCGCGGTTG
 CGGGCGCGCTCTTGCAGCCGCTTAGTGGCGAGCTGCTTGCAGGGCGCTTGCCTCCGGTTCGACTTGCAGGGC
 >Glyphotaelius_pellucidus_histone_H3
 TGCGTCTCGCCAGCTGGATGTCTTGGGCATGATGGTGACGCGCTTGGCGTGGATCGCGCACAGGTTGGTGTCC
 TCGAAGAGGCCGACCAGATAGGCTCGCTAGCCTCCTGCAGGGCCATCACGGCCGAGCTCTGGAAGCGCAGGTC
 GGTCTTGAAGTCTTGGGCGATCTCGCGCACCCAGCCGCTGGAAGGGCAGCTTGCAGGATCAGCAGCTCGGTGTCTT
 TCTGGTAGCGGCGGATCTCGCGAAGGGCGACAGTGCCGGGCGCTTAGCGATGGGGCTTCTTCACTCCTCCGGTG
 CGGGGCGCGCTCTTCTCGCCGCTTCTGTGGCCAGCTGCTTCTTGGGGGCTTGCCTCCGGTTCGACTTGCAGGGC
 T
 >Phalera_bucephala_histone_H3
 TCCTCCTGGCGAGCTGTATATCTTTCGGCATGATGGTGACACGCTTGGCGTGGATGGCGCAGAGGTTGGTGTCT
 CCGAACAGGCCACGAGATAAGCCTCGCTGGCCTCCTGCAACGCCATCACAGCAGAGCTCTGGAACCTGAGATC
 GGTCTTGAAGTCTTGGGCGATCTCGCGAACAGACGCTTGGAAAGGGAGCTTGCAGTATAAGCAGCTCGGTGTCTT
 TCTGGTAGCGACGAATCTCACGCAGAGCGACCGTACCGGGCCTGTAGCGATGAGGTTCTTCACTCCGCGGTC
 GCGGGCGCGCTCTTGCAGTCCGCTTGGTTGCGAGTTGTTTCTCGGACCTTACCACCGGTTGGACTTGCAGAGC
 A
 >Limnaecia_phragmitella_histone_H3
 TCGTCGGGCAAGCTGGATGTCTTTAGGCATGATGGTGACACGCTTGGCGTGAATGGCGCACAAAGTTGGTGTCTT
 CAAACAGGCCACCAGGTATGCCTCACTGGCTTCTGTAACATAAGGAACATTATCATCAGTAAGGTATAATTT
 AGGTTTATAGTATGATTACACAAAATAGGTTAAAAAACACATGGCTTAAACAAAATAGATGGTGATTCCCACC
 TGCAGAGCGCCAATAGCGGCGGACTGGAAACGAAGATCAGTTTTGAAGTCTTGGGCAATTTCTCTGACAAGCCG
 TTGGAAGGCAGTTTGCAGATCAGCAACTCTGTGGATTTCTGGTAGCGACGAATTTACGAAGAGCCACCGTAC
 CAGGGCGGTAACGATGGGGCTTCTTCACTCCACCAGTGCTGGGCGCTGATTTACGCGCAGCTTTTGTAGCCAGC
 TGTTTACGGGGCGCTTACCTCCCGTGGACTTACGAGCA
 >Aglais_urticae_histone_H3
 TACGACGAGCGAGCTGGATGTCTTTAGGCATGATGGTACACGCTTGGCGTGGATGGCGCACAAAGTTGGTGTCT
 TCGAACAGCCCCACCAGGTACGCTTCACTGGCTTCTGCGAGGAGAAAAATAAAAGTATTAACAAGAGAACAAA
 AACTACTAACAAAGACTCTGCAGTTAGGTTAGGTTTGGTTTCAATGGGTGTTAGTAAACACGTGCGTGGTAAAA
 ATATAGTATGCCACCTGCAGCGCTCCGATAGCAGCCGACTGGAAACGCAGGTCGGTTTTTGAATCTTGTGCGA
 TTTCTCTGACAAGTTCGCTGGAAAGGCGAGTTTGCAGGATCAGCAACTCGGTAGATTTCTGGTAACGACGAATTTCA
 CGAAGCGCCACGGTACCAGGGCGGTAACGATGGGGCTTCTTACACCACCAGTGCTTGGCGCCGATTTACGCGC
 CGCCTTTGTGGCCAACGTTTGCGGGGAGCTTTTCTCCCGTTCGATTTACGAGCA
 >Cerura_vinula_histone_H3
 CCTTCGTGCAAGTTGGATGTCTTTGGCATAATAGTGACGCGCTTAGCATGGATCGCGCATAAATGGTGTCTT
 CAAACAGACCCACCAGGTATGCTTCACTTGCCTCCTGAAATAAAAAATAATATATTATTAATAAGGAACCTAACA
 CAGCACTTATACAACCCAAATAGATGCTAAATAGGTTCCAGTATTTACCTGTAGAGCGCCAATAGCAGCGGAT
 TGGAAACGCAGGTCAGTCTTGAATCTTGAGCGATTTCTCTCACACAGACGCTGGAACGGCAGCTTACGGATAAG
 TAACTCCGTGGATTTCTGATAACGACGGATCTCACGCAGGGCTACGGTACCAGGGCGGTAACGGTGGAGTTTCT
 TTACACCACCTGTGCTTGGCGCCGACTTACGCGCTGCCCTTGTGCGCAACTGTTTACGAGGCGCTTACCTCCA
 GTAGATTTACGGGCA
 >Gonepteryx_rhamni_histone_H3
 CCGTCTGGCCAACTGGATGTCTTTAGGCATAATAGTTACACGCTTAGCGTGGACGGCGCATAAGTTGGTGTCTT
 CAAATAAGCCGACGAGGTAGGCTTCACTCGCTTCTGTATTAACAACATAAAGTATTTATGCCATACTCAGATA

ACAATAATAATTTTAATAATACTGCAATTTATTCATGCTTACCTGCAAAGCGCCAATGGCGGCAGACTGGAAC
CGAAGGTCAGTCTTGAAATCTTGAGCGATTTCTCTGACGAGTCGCTGGAAAGGCAGTTTACGGATGAGCAACTC
AGTGGATTTCTGGTATCGGGCAATTTCTCGAAGGGCGACTGTTCCAGGGCGGTAACGATGGGGCTTTTACCC
CCCCAGTGCTGGGTGCAGATTTTCGCGCCGCTTTTGTGGCTAACTGTTTACGAGGAGCCTTTCTCTCTGTTGAT
TTACGTGCA

>Teinoptilla_gutella_histone_H3

TCGTCGAGCCAACTGGATGTCTTTAGGCACGATTGTGACGCGCTTGGCGTGGATGGCGCACAAGTTGGTGTCTT
CGAAGAGACCCACCAAGTAGGCTTCGCTGGCTTCCTGCAATACAAACATGAGGCATGATAATGTTTCCCGCCAA
TTTTAACTGCTCTAACAGAAAAGTAAAACGTGACATAGTGAATCACTTGAGAGAAAATGGTGGCGCTTGTGTAA
TTGAAATAAGGCACAAGAACAACCTGGAGAGCACCGATGGCGGCAGACTGGAAACGCAGATCAGTCTTGA
AGTCTTGAGCAATTTCTCTCACAAAGTCGCTGGAAAGGGCAGCTTGC GGATGAGCAACTCCGTGGACTTTTGGTAA
CGACGGATTTTACGAAAGCGCCACGGTACCAGGGCGGTAACGATGAGGTTTCTTCACTCCACCAGTGTGGGCGC
AGATTTGCGCGCGGCCCTTGGTCGCCAATTGTTTGGGGGAGCCTTTCTCTCCGGTAGATTTACGCGCA

>Tineola_bisselliella_histone_H3

AAAGCAGACTGCTCGTAAATCAACTGGAGGAAAGGCTCCTCGTAAGCAGCTGGCTACTAAAGCCGCGCGTAAGT
CTGCGCCAAGCACTGGTGGAGTGAAGAAACCCCATCGTTACCGCCAGGAACAGTGGCCCTCCGAGAAATTCGT
CGTTACCAGAAGTCTACCGAGTTGCTGATCCGTAACCTCCGTTTTCAGCGTCTCGTGAGAGAAATCGCTCAGGA
CTTCAAGACTGATTTGCGTTTTTCAGTCTGCAGCCATTGGTGTCTCTCCAGGTAAGTGCCATGTGGTTTTATATTA
AATAATGTGGTATTTTCAAGAGTTTATTTTTTATATGATTAATTTTTTGCAGGAGGCAAGCGAAGCCTACCTTGT
GGGCTTGTGTTGAAGACACCAACTTGTGTGCTATCCATGCCAAGCGCTGACTATCATGCCAAGGACATCCAGC
TT

>Ephestia_kuehniella_histone_H3

TAAACAGACAGCTCGCAAGTCCACTGGCGGTAAGCGCCGCGCAAGCAGCTAGCGACGAAAGCGGCTAGAAAAA
GCGCTCCAGCGACCGGCGGGGTCAAGAAGCCGCATCGCTATCGGCCGGGACTGTGCGCTGCGCGAAATTCGC
CGCTATCAAAAAAGCACTGAACTGCTTATTCGCAAAATGCCGTTTCAACGGTTGGTGCAGAGATCGCGCAGGA
TTTCAAGACGGATCGGCGTTTCCAGAGCTCTGCTGTGATGGCCTTGCAGGAGGCCAGCGAGGCCATTTGGTTG
GCCCTTTGAGGACACTAACCTCTGCGCCATTACGCTAAAAGGGTCACTATCATGCCAAGGACATCCAGCTT
G

>Pieris_napi_histone_H3

GAAGCAGACAGCCCCGCAAGTCCACCGGAGGTAAGGCGCCGCGTAAGCAGCTCGCCACCAAGGCGGCCCGCAAGA
GCGCTCCCGCCACCGGCGGGCTGAAGAAGCCTCACCGTTACAGGCCCGGTACCGTCTGCTCTGAGAGAGATCCGT
CGCTACCAGAAGAGTACCGAGCTGTTGATCCGCAAGTTGCCGTTCCAGCGTCTGGTGAGGGAGATTGCGCAGGA
CTTCAAGACCGACCTCAGGTTCCAGAGCTCCGCCGTGATGGCCCTTCCAGGAGCGAGCGAGGCCATCTGGTGG
GTCTCTTCGAGGACACCAACCTGTGCGCCATTACGCCAAGCGAGTGACGATCATGCCAAGGACATCCAACCTG

>Biston_betularia_histone_H3

GAAGCAGACCGCTCGTAAATCTACCGGTGGTAAGGCGCCGCGCAAGCAGCTCGCCACCAAGCTGCGCGTAAGA
GCGCGCCTGCCACCGGCGGCGTAAAGAAGCCACATCGCTACAGGCCCGGTACCGTGGCTCTCCGTGAGATCCGT
CGTTACCAGAAGAGCACAGAGCTGTTGATCCGCAAGCTGCCGTTCCAGCGTCTCGTGCGCGAGATCGCACAGGA
CTTCAAGACCGATCTCCGTTTCCAGAGTTCTGCAAGTTATGGCGCTCCAAGAGGCCAGCGAGGCCATCTGGTGC
GTCTGTTTGAAGACACCAATCTGTGTGCGATCCACGCCAAGCGAGTAACCATCATGCCAAGGACATACAGTTG
G

>Inachis_io_histone_H3

GAAACAGACGGCCCGAAAAATCAACCGGCGGTAAGGCGCCGCGAAGCAACTCGCCACCAAGGCCGCTCGTAAGA
GCGCTCCGCGCCACGGAGGTGTGAAGAAACCTCATCGTTACAGACCCGGTACGGTCTGCTCTTTCGTGAAATACGT
CGCTATCAGAAGAGTACGGAACCTTTGATACGCAAGCTGCCGTTCCAGCGTCTTGTCCGTGAGATCGCACAAAGA
CTTCAAGACGGATCTACGTTTCCAGAGTTCCGCGCTTATGGCGTTACAGGAAGCTAGCGAGGCTTACCTCGTGC
GTCTATTCGAAGACACGAACCTGTGCGCTATCCACGCCAAGCGTGTAAACGATCATGCCAAGGATATTCAATTG

>Hyalophora_cecropia_histone_H3

CAAGCAGACCGCACGCAAAATCGACCGGAGGTAAGGCGCCTCGTAAACAGCTCGCCACGAAGGCGGCACGGAAGA
GTGCGCCAGCGACGGGCGGTGTCAAGAAACCCCATCGGTACAGACCCGGAACGGTCTGCTCTTTCGTGAGATCCGA
CGTTATCAGAAAAGTACCGAACTGCTGATCCGCAAGCTGCCATTCCAACGGCTCGTTTCGTGAGATCGCTCAAGA
TTTTAAAACGGACCTCCGTTTCCAGAGTTCCGCAAGTATGGCCCTGCAGGAGGCCAGCGAGGCATATCTGGTGC
GTCTATTCGAGGACACGAATCTGTGCGGATTCATGCAAAACGTGTACCATTATGCCGAAAGATATCCAGCTG
G

>Bombyx_mori_histone_H3

CGCAAGCAATTTGGCGACCAAGGCCGCTCGTAAGAGCGCACCGGCAACAGGAGGTGTCAAGAAGCCTCATCGTTA
CAGGCCCGGGACGGTGCCTTTCGTGAGATTCGTCTGTTACCAGAAGAGCACGGAACCTTTGATTCGCAAACTGC
CTTTCCAGCGTCTCGTCCGTGAGATAGCTCAAGACTTCAAGACCGATCTCCGTTTTTCCAGAGTTCCGCGGTGATG
GCCCTGCAGGAAGCCAGCGAGGCGTATCTGGTCCGTTCTTCCGAGGACACGAACCTTTGCGCTATTCACGCGAA
ACGTGTGACAATAATGCCAAAAGACATACAGCTCA

Příloha III

Sekvence 5S rDNA, U1 a U2 snRNA izolované z gDNA *C. pomonella*. Tyto sekvence byly použity při navrhování restriktivního štěpení gDNA pro Southernovu hybridizaci. Mezerníková sekvence je znázorněna menší velikostí písma.

```
>C. pomonella_U1snRNA
AATTCACTAGTGATTCGTAGGGGACACCGTGATCAAGAAGGCGGTTCCCCCAGGGCGAGACTCTTCCATTGCAC
TGCGGTTGGGTTGACCCTTGCATTATCCCTAATGTGGATAACTCGGACGCGTAATTTTTG
>C. pomonella_U2snRNA
AGATCAAAGTGTAGTATCTGTTCTTTTCAGCTTAATATCTGAAAGTTCCTCCTGAGGGACCAGTATATTTAAA
CTGATTTTTGTAAACCACGGGATGTTTCGGGGCTCGCTCCACTCCCGTCACGGGTCGGCCCCGATTGCAG
>C. pomonella_5SrDNA_a
GCCAACGTCCATAACCATGCTGAATACACCGGTTCTCGTCCGATCACCGAAGTTAAGCAACGTCGGGCGAGGTCA
GTACTTGGATGGGTGACCGCTGGGAACACCGCGTGACGTTGGCTT
>C. pomonella_5SrDNA_b
AAGCCAACGACACGCGGTGTTCCAGGCGGTCACCCATCCAAGTACTGACCGCGCCCGTCGTTGCTTAACCTCG
GTGATCGGACGAGAACCGGTGTATTCAACATGGTATGGACGTTGGC
>C. pomonella_5SrDNA_c
GCCAACGTCCATAACCATGCTGAATACACCGGTTCTCGTCTGATYMCCGAAGTTAAGCAACGTCGGGCGAGGTCA
GTACTTGGATGGGTGACCGCTGGGAACACCTCGTGTGCTTGGCTTTTGGTTCTTTTTGGCACAAATTTGGTGA
GTGACAGAGTGGTCT
CTGTAGCTTGTACGTTTTTATGAAGTTTTACGTTTCTAAAAAGTGTATGTGTTAGATTTGGTCAAAGCAAATGTCATG
CATTTGTAGGCATTGTAGCAATGACTTTCATATTTCTGATACGGAT
TACAATATTCGGACATTTTGTcGCCAACGTCCATAACACGTTGAATACACCGGTTCTCGTCCGATCACCGAAGTTA
AGCAACGTCGGGCGAGGTCA
TCCGCTAGCTTGTACGTTTTTATGAAGTTTTACGTTTCTAAAAAGTGTATGTGTTAGATTTGGTCAAAGCAAATG
TCATGTCATTTGTAGGCATTGTAGCAATGACTTTCATATTTCTGATACGGAT
TACAATATTCGGACATTTTGTcGCCAACGTCCATAACACGTTGAATACACCGGTTCTCGTCCGATCACCGAAGTTA
AGCAACGTCGGGCGAGGTCA
TCCGCTAGCTTGTACGTTTTTATGAAGTTTTACGTTTCTAAAAAGTGTATGTGTTAGATTTGGTCAAAGCAAATG
TCATGTCATTTGTAGGCATTGTAGCAATGACTTTCATATTTCTGATACGGAT
TACAATATTCGGACATTTTGTcGCCAACGTCCATAACACGTTGAATACACCGGTTCTCGTCCGATCACCGAAGTTA
AGCAACGTCGGGCGAGGTCA
GTACTTGGATGGGTGACCGCTGGGAACACCGCGTGCCGTTGGCTT
>C. pomonella_5SrDNA_d
GCCAACGTCCATAACCATGTTGAATACACCGGTTCTCGTCCGATCACCGAAGTTAAGCAACGTCGGGCGAGGTCA
GTACTTGGATGGGTGACCGCTGGGAACACCTCGTGTGCTTGGCTTTTGGTTCTATTGGTTTCTAAGTCCATACCTA
AGTAGTATTTTTTT
TGCCAAACATTCAGGTTAGCTAATTTATTTATGCGGCATCAGTTCTGAAAACATAACAGTTAATATAATCAGGCAATTC
GCTTCTCGTCTTATATAAAAAAAGAATTAATCTCTCA
AAGCATGATATTCACGCTCTCAGTTTATGTTTATACATATGTTATCCTTATCACATGTGATTGAACACACATGAGTGA
AAGAAATAAGGATCAAGTTAAATGGCGTCTCAAAGTTTAAAT
ATATGTAAAAAGATGGCAGTAAATTTACGTCGCTACAAATTTGTTCTTTGACAATACACCTCTATTTCAAATTCCTT
TGATATGCTTAAAAAATAAAGTAATCCGATAATATGATTTTTAAAC
TATAAATAACGTAATACGTAGCAGTGACGTACAACACACACACACATCACACAGCCACAAGTTTATGTACTAACTAA
ACAATATTCAGATCTAGATAATAATTAAGTAGTTTTGTT
GCCAACGTCCATAACCATGCTGAATACACCGGTTCTCGTCCGATCACCGAAGTTAAGCAACGTCGGGCGAGGTCA
GTACTTGGATGGGTGACCGCTGGGAACACCGCGTGCCGTTGGCTT
>C. pomonella_U1snRNA_b
CAAAAAATACGCGTCCGAGTTATCCACATTAGGGATAATCGCAAGGGTCAACCCAACCGCAGTGCAATGGAAGA
GTCTCGCCCTGGGGGAACCGCTTCTTGATCACGGTATCCCCATGCCAGGTAAGTATGAGTTCACAACGTTGGTGGC
GAGAGGGTCAATTCGTTAGAA
AAATCTTAACACCGCGATGTACGATTTCCGACGCGGAGACACAGCGACATCTAACGGCAAATGTTGAACATACTCTGT
ACCAGGCGAGCGATGAGTTCGATCATATTTGATTAATCTTCTTGT
TTGTAACCAATCATAATTTTCATTACAGTACTCATTAATACAATACTTTCGATTAACAGTACACAAATTTATAAACC
GTCGAGAAATAACGCATGCATAAGCGAGTCACTTCCATTCGATGCT
TCCGCTTGCAGGGCAATATGGCACGTGGCGCTCCATTGTTTTTTTTTTCTTATTAAGGGGGTGAATTCAAAATTTT
ACACTTGCAATCGGTTGGTTTTGACTAAATTTTCATTTAAATAA
TTGTAATTTGCCCCCTATAAAGTAAAGGGCCCTATCAAAAATTTGCGTTCGGATTCCTCACGCGACCCGGGCGGGT
GATTTATGTCGGGTGTCAGCATCAGTCTCACTTACGATCACT
CGCCTATGCTCCCGAGACAAGGAAGTTGCAGAGCGGCGACCGCGCGGTGTCATACAGTTGCGGGACACAACGATAG
CCGAGCTAACTAACGCACAGCGACATCTAGCGAGATTTGGC
AGGTTAATTTGCCAACGTTTATTTGTTGATACCATGTCGGTGGCTGACAAGCATACGGCCCGCTGACGGTAAGCGGC
CAACATATCTTTGGACCTGTAACCTCCGAGGTGTTGATTCATG
ATATAAACTAATTTTCAAGTATACACCGTGTTTTTTTGATTTGCGTTAATTTTCGAGGTTGATTCCTGAGCTTAA
ATTAAGTAACTTTCTCAAAGATACCGATATCTAACTAACTCCATTT
CGGAGATAATCAATCATAATTTTTATATAAAGCCCTTACGAGCGGTACACTTGCTTTAGGACCTGTTACTTATTAGT
TAGTGTGTTAGTGGAGTTTCATACATTTGCTACTAAACGTAC
GTACTATCTCGGACGATCGATTTAGAAATGACATTTGATATGTCACAGTTTCAATTTGTTGGTTGAGTAAATGTA
ATGCCCCGTGTACAACAACGCTATATGCAACATTTAGTTACTTTTTA
TAAAAATAAAATAGTAAAAAAAACAAAAAAATTTTTTTTTGAAAAATAACTATGCCATTTAGTTTCTTAAACGTA
CTTACCAGAACCCCGGAGTTAACGCAATCAATAAAAAACCGG
TGTATATGGGGGGACGGCGCTACGCAGTCCCCACTACCAAAAATACGCGTCCGAGTTATCCACATTAGGGATAATCG
CAAGGGTCAACCCAACCGCAGTGCAATGGAAGAGTCTCGCCCTGGGGGAACCGCTTCTTGATCACGGTGTCCCCTAC
```