

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Holokinetický drive a jeho role v karyotypové evoluci motýlů

Bakalářská práce

Monika Kreklová

Školitel: RNDr. Petr Nguyen, Ph.D.

Školitel specialista: RNDr. Jindra Šíchová, Ph.D.

České Budějovice 2017

Kreklová M (2017) Holokinetický drive a jeho role v karyotypové evoluci motýlů [Holokinetic drive and his role in karyotypic evolution of Lepidoptera. Bc. Thesis, in Czech] - p. 42, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The present study is focused on testing a hypothesis of holokinetic drive and its role in karyotype evolution in Lepidoptera. Negative correlation between chromosome number and genome size, which is one of the main predictions of holokinetic drive, was tested by means of flow cytometry in selected lepidopteran species. The study also confirmed presence of chromosome rearrangements in the r50 *Bombyx mori* strain and *B. mandarina* from Japan, which could be used for an analysis of preferential chromosome transmission in future.

Finanční podpora:

Práce byla financována grantem Grantové agentury České republiky reg. č. 17-17211S.

Prohlášení:

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

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich 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 19. 4. 2017

.....

Monika Kreklová

Poděkování:

Touto cestou bych chtěla v první řadě poděkovat Františkovi Marecovi, který mi umožnil pracovat v jeho skvělé laboratoři. Obrovský dík patří mému školiteli Petrovi za zadání zajímavého tématu, za jeho ochotu vždy mi poradit či pomoci a trpělivost, kterou se mnou po celou dobu měl. Velice bych chtěla poděkovat mé školitelce specialistece Jindře, která mě s nekonečnou trpělivostí a ochotou mnohému naučila. Velké dík také patří Petrovi Kouteckému za umožnění práce v jeho laboratoři a pomoci s průtokovou cytometrií. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu naší laboratoře, který mě ochotně přijal a po celou dobu tvořil přátelskou atmosféru, zejména Martě, Irence a Leo, které byly vždy ochotné mi poradit či pomoci. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat Davidovi a mé rodině, za psychickou i finanční podporu a za bezmeznou důvěru, kterou ve mně vkládali po celou dobu mého studia.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Centromera.....	1
1.2. Centromerický drive	2
1.3. Holokinetické chromozomy.....	4
1.4. Holokinetický drive	7
1.5. Karyotypová evoluce motýlů.....	8
2. Cíle práce.....	10
3. Metody.....	12
3.1. Hmyz.....	12
3.2. Stanovení obsahu DNA průtokovou cytometrií.....	13
3.2.1. Měření hemocytů.....	13
3.2.2. Měření mozkové tkáně	14
3.2.3. Zpracování dat.....	14
3.3. Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace.....	15
3.3.1. Příprava chromozomálních preparátů	15
3.3.2. Syntéza telomerického templátu	15
3.3.3. Značení telomerického templátu	16
3.3.4. Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace s telomerickou sondou (tel-FISH)	16
4. Výsledky.....	18
4.1. Cytometrické analýzy	18
4.2. Karyotyp mutantů <i>Bombyx mori</i> r50 a <i>B. mandarina</i>	23
5. Diskuze	25
6. Souhrn.....	32
7. Literatura	33

1. Úvod

1.1. Centromera

Centromerou se označuje místo primární konstriktce rozdělující chromozom na raménka. Oblast centromery je často tvořena repetitivní DNA, např. satelitní DNA a mobilními elementy (Choo a kol. 1991). Dosud nebyla zjištěna univerzální centromerická sekvence, avšak některé motivy mohou být společné pro jednotlivé taxony. Centromera se skládá z funkční centromerické domény (desítky kbp), kterou často obklopují velké pericentromerické bloky heterochromatinu (> Mb; Plohl a kol. 2014). V místě funkční centromerické domény dochází k sestavení kinetochoru, tj. proteinového komplexu zodpovědného za připojení mikrotubulů dělicího vřeténka. Jedním z hlavních kinetochorových/centromerických proteinů (CENP) sloužících pro sestavování kinetochoru je protein CenH3, tedy centromerická varianta histonu H3 (Malik a Henikoff 2009). Pericentromerická DNA je často vysoce methylovaná a během interfáze zůstává kondenzovaná. Pro histony pericentromerických nukleozomů jsou charakteristické histonové modifikace, jako například hypoacetylace histonu H3 a methylace lyzinu 9 (H3K9me1), které potlačují transkripci (Shu a kol. 2012). Pericentromerický heterochromatin zajišťuje primární spojení sesterských chromatid (Plohl a kol. 2014).

Chromozomy s lokalizovanými centromerami, tj. připojující se k mikrotubulům pouze v jediném místě, nazýváme chromozomy monocentrickými (na rozdíl od chromozomů holokinetických, viz Kap. 1.3.). Podle velikosti je rozlišujeme na bodové, zaujímající velice malou oblast (např. u *Saccharomyces cerevisiae* ~125 bp) a regionální, zabírající větší oblast (až stovky kbp) často s určitými typy sekvencí DNA, jejichž fungování je vymezeno spíše epigeneticky (Malik a Henikoff 2009).

Podle polohy centromery můžeme monocentrické chromozomy rozlišovat na metacentrické (centromera leží uprostřed, raménka jsou stejně dlouhá), submetacentrické (centromera rozděluje chromozom na krátké p a dlouhé q raménko), akrocentrické (centromera je posunuta blíže ke konci chromozomu, výraznější velikostní rozdíl mezi p a q raménky) a telocentrické (centromera leží na konci chromozomu, pouze raménka q). Karyotypy savců jsou často převážně složené právě buď z metacentrických (např. člověk) či akrocentrických (např. myš) chromozomů (de Villena a Sapienza 2001).

Funkce centromery je pro všechny eukaryotické organismy životně důležitá. Její abnormality mohou způsobovat rakovinu, sterilitu a jsou často i smrtelné (Thompson a kol. 2010). Důležitou vlastností centromer je zajištění bezchybného rozchodu chromozomů

během buněčného dělení. Jak již bylo zmíněno výše, centromera zprostředkovává spojení sesterských chromatid (Dej a Orr-Weaver 2000), navázání kinetochu a napojení chromozomu na dělicí vřeténko (Rieder a Salmon 1998). V průběhu mitózy zajišťuje kinetochor spojení sesterských chromatid až do stádia pozdní metafáze a napomáhá správné segregaci chromatid k opačným pólům buňky během anafáze. V meióze I dochází pouze ke ztrátě koheze mezi raménky chromozomu, ale v místě centromery spojení chromatid zůstává. Obě sesterské chromatidy se tak napojí na mikrotubuly vycházející ze stejného pólu buňky. Teprve v meióze II dojde mezi sesterskými chromatidami k přerušení koheze v místě centromery, následkem čehož jsou sesterské chromatidy přitahovány k opačným pólům buňky (Dej a Orr-Weaver 2000).

Kinetochor formující se v oblasti centromer hraje důležitou roli při jednom z kontrolních bodů buněčného cyklu, při kterém se rozhoduje, zda bude buňka pokračovat v buněčném dělení. Jde o kontrolní bod na přechodu z metafáze do anafáze, při kterém se kontroluje, zda je každý kinetochor správně připojen na vlákna dělicího vřeténka (Rieder a Salmon 1998). Dokud nedojde k napojení všech chromozomů/chromatid na mikrotubuly dělicího vřeténka, uvolňuje kinetochor inhibitor potlačující přechod do anafáze. Pokud je tedy některý z chromozomů/chromatid špatně či slabě připojen, dojde k pozastavení dělení i na několik hodin, dokud nedojde ke správnému opětovnému připojení (Rieder a Cole 1998). Pokud by došlo k selhání kontrolního bodu a buněčné dělení by vstoupilo do anafáze ještě před napojením všech chromatid na mikrotubuly dělicího vřeténka, vznikly by buňky s různými (tedy nesprávnými) počty chromozomů, což by mohlo mít tragické následky.

Z funkčního hlediska jsou centromery v průběhu evoluce vysoce konzervované. To je zajištěno epigeneticky koevolucí centromerické DNA a CENP. Repetitivní sekvence centromer patří mezi nejrychleji vyvíjející se DNA eukaryot, lišící se i mezi blízkými příbuznými druhy svou délkou a komplexitou (Melters a kol. 2013). Naopak CENP jsou vysoce konzervované, a jsou tedy patrně významnějším určujícím faktorem centromerické identity než samotná DNA sekvence (Guerra a kol. 2010). K vysvětlení paradoxu ve vztahu mezi základní funkcí centromery a rychlou evolucí její sekvence, navrhli Henikoff a kol. (2001) model tzv. centromerického drivu.

1.2. Centromerický drive

Zatímco při samčí meióze vznikají čtyři rovnocenné spermatidy, výsledkem samičího meiotického dělení jsou tři pólové buňky a jedna buňka vaječná, tzv. oocyt. Samičí meióza je

tedy asymetrická a homologní chromozomy spolu vzájemně soutěží o začlenění do vaječné buňky a tím i o přenos do další generace. Důsledkem této kompetice může dojít k tzv. meiotickému drivu (“meiotic drive”); česky též označovanému jako meiotický tah, který způsobuje nerovnoměrné zastoupení alel v gametách (Sandler a Novitski 1957). Chromozomy nesoucí element způsobující drive budou předávány do další generace na úkor svých homologů s více jak 50% pravděpodobností, která je očekávána na základě Mendelistické dědičnosti. Pokud se takový element nachází na pohlavních chromozomech, může výrazně ovlivnit poměr pohlaví v populaci a zvýšit tak pravděpodobnost jejího zániku. Zároveň může pomáhat šíření škodlivých mutací, které s ním jsou v těsné vazbě (McDermott a Noor 2010). Výsledkem takovéto nenáhodné segregace mohou být dramatické změny mající velkou roli v evoluci (Malik a Henikoff 2009; Buckler a kol. 1999). Meiotický drive proto může představovat významnou evoluční sílu.

Centromerický drive je formou meiotického drivu a stejně jako on je důsledkem samičí asymetrické meiózy, při které si konkurují homologní centromery v průběhu prvního meiotického dělení (de Villena a Sapienza 2001; Bureš a Zedek 2014). Preferenční přenos do vaječné buňky v případě centromerického drivu závisí na velikosti či počtu centromer, případně neocentromer. Například u kukuřice byly na všech chromozomech pozorovány tzv. chromozomální uzly (“chromosomal knobs”). Chromozomální uzly jsou tvořené tandemovými repeticemi, které plní funkci neocentromer, které se však na mikrotubuly neváží klasicky pomocí kinetochoru, ale jiným mechanismem (Fukagawa a Earnshaw 2014). Kikudome (1959) ve své práci dokazuje, že pravděpodobnost meiotického drivu pozitivně koreluje s velikostí chromozomálních uzlů. Pokud jsou dva homology heterozygotní pro velikosti chromozomálních uzlů v lokusu, větší uzel má vyšší pravděpodobnost přenosu do vaječné buňky (Kikudome 1959; Buckler a kol. 1999).

Heterozygita homologních centromerických lokusů je tedy důležitým faktorem, který ovlivňuje nenáhodnou segregaci skrze preferenční přichycení jednoho z homologních chromozomů na mikrotubuly dělicího vřeténka vaječného pólu či pólové buňky (Novitski 1967). Velikost centromery závisí na množství centromerické satelitní DNA. Při nerovnoměrném crossing overu může docházet k rozšiřování satelitních oblastí. Zvětšené centromery na sebe pak mohou vázat více kinetochorových proteinů a lépe se tak připojit k mikrotubulům dělicího vřeténka. Naopak může také dojít ke kontrakci satelitů, která má opačný účinek (Malik a Henikoff 2009). Další možností, jak změnit velikost centromery mohou být fúze akrocentrických chromozomů též známé jako tzv. Robertsonovy translokace, které mohou vést ke karyotypovým změnám. Například u heterozygota pro Robertsonovu

translokaci se v metafázi I fúzovaný metacentrický chromozom, s pouze jednou aktivní centromerou, páruje se dvěma homologními akrocentrickými chromozomy se dvěma aktivními centromerami. Důsledkem tohoto poměru centromer je nenáhodná segregace v meióze I, pozorovaná u myši i u člověka (Pacchierotti a kol. 1995).

Při samičí asymetrické meióze dochází k tvorbě asymetrického dělicího vřeténka. Jednotlivé póly dělicí se buňky se liší počtem mikrotubulů či jejich rychlejším a účinnějším přichytáváním ke kinetochoru, což může také výrazně ovlivnit preferenční přenos centromery do další generace. Například vaječný pól může tvořit více mikrotubulů než opačný pól a zachytit tak chromozomy s větším povrchem kinetochoru, popřípadě s větším počtem chromozomálních uzlů a přenést je tak přednostně do další generace (de Villena a Sapienza 2001).

Chromozom vzniklý Robertsonovou translokací se spíše dostane k pólu, který je méně efektivní v navázání centromery. Pokud je právě tento pól vaječný, budou v daném karyotypu převažovat metacentrické chromozomy. Je-li v zachycení centromer méně efektivní centrozom, tj. organizátor dělicího vřeténka budoucí pólové buňky, budou v karyotypu převažovat akrocentrické chromozomy. Během samičí meiózy tak může docházet ke zvyšování počtu metacentrických či akrocentrických chromozomů v karyotypu (de Villena a Sapienza 2001). Orientace vřeténka se však může lišit mezi druhy, popřípadě i populacemi, což například vysvětluje dramaticky odlišné karyotypy u různých populací myši (Nachman a Searle 1995).

Centromerický drive je tedy hnací silou zodpovědnou za rychlou evoluci jak velikosti a složitosti centromer, tak i jejich proteinů a celého monocentrického karyotypu (Malik a Henikoff 2009).

1.3. Holokinetické chromozomy

Holokinetické (či holocentrické) chromozomy na rozdíl od monocentrických postrádají strukturně vymezenou centromeru, tj. primární konstrikci. Funkčně jsou centromery vymezeny kinetochorem tvořeným po téměř celé délce chromozomů (Wolf 1996, Neumann a kol. 2012).

Dalším rozdílem mezi monocentrickými a holokinetickými chromozomy je segregace chromozomálních fragmentů. Pokud ozáříme monocentrické chromozomy ionizujícím zářením, dojde k jejich fragmentaci a vzniku acentrických, tj. centromeru postrádajících, a centrických fragmentů. Během mitózy nejsou acentrické fragmenty kvůli absenci

centromery a tedy i kinetochoru připojeny k mikrotubulům dělicího vřeténka, a proto nejsou předány do dceřiných buněk, což je pro ně zpravidla letální (Jankowska a kol. 2015). Centrické fragmenty, pak postrádají telomery na nově vytvořeném konci a jsou tudíž tzv. lepivé, tj. mají tendenci k fúzím. Při replikaci se mohou spojit konce chromatid, čímž vzniknou chromozomy s dvěma centromerami, tzv. dicentrické chromozomy. Pokud nedojde k inaktivaci jedné z centromer, dojde v případě, že každá z centromer bude táhnout chromozom k opačným pólům buňky, ke vzniku tzv. anafázního můstku. Ten může vést k zastavení buněčného dělení a smrti buňky, nebo ke zlomu dicentrického chromozomu, který má za následek nerovnoměrnou segregaci genetické informace (McClintock 1939). Naopak při ozáření holokinetických chromozomů se, díky kinetochoru pokrývajícímu celou délku chromozomu, při dělení řádně segregují všechny vzniklé fragmenty (Nordenskiöld 1963).

Ve stádiu mitotické metafáze se holokinetické chromozomy kromě chybějící primární konstrikce liší od monocentrických také v uspořádání sesterských chromatid. Sesterské chromatidy monocentrických chromozomů vytvářejí charakteristický tvar X či V, zatímco chromatidy holokinetických chromozomů se orientují paralelně.

Při meiotickém dělení může u holokinetických chromozomů docházet k přeměně rozptýlené kinetické aktivity (v mitóze) na lokalizovanou, jejíž pozice se liší mezi různými organizmy (Guerra kol. 2010). Například u *Triatoma infestans* (Heteroptera) Pérez a kol. (1997) pozorovali, že se kinetická aktivita soustřeďuje na jeden z konců chromozomu během prvního meiotického dělení a v průběhu druhého meiotického dělení je přemístěna na opačný konec chromozomu. Pro druhy s monocentrickými chromozomy je typické preredukční meiotické dělení (Banno a kol. 1995; de Bigliardo a kol. 2010). Při tomto typu dělení během meiózy I putuje celý chromozom k jednomu pólu (tzv. heterotypické dělení) a následně se během meiózy II rozcházejí sesterské chromatidy k opačným pólům buňky (tzv. homeotypické dělení; Guerra a kol. 2010). Zejména u druhů s holokinetickými chromozomy však může být pořadí těchto dělení opačné. Meiotické dělení je tedy invertované a označované jako postredukční (Banno a kol. 1995; Gupta 2005). Během anafáze v meióze I se nejprve rozcházejí sesterské chromatidy k opačným pólům buňky (homeotypické dělení), zatímco paternální a maternální homology zůstávají spojeny, a homologní chromatidy se rozcházejí až posléze v anafázi II (heterotypické dělení; Guerra a kol. 2010). Avšak ne vždy dochází u organismů s holokinetickými chromozomy k postredukční meióze. Suomalainen (1953) ve své práci sice tvrdí, že samičí meióza u zástupců řádu Lepidoptera je postredukční, zatímco samčí meióza je preredukční; avšak postredukční meióza u samic nebyla nikdy prokázána a navíc existence modifikovaného synaptonemálního komplexu,

umožňujícího bezchybný rozchod achiasmatických bivalentů samic, ji prakticky vylučuje (Marec 1996). U zástupců řádu Nematoda a Heteroptera však probíhá meióza u obou pohlaví v tradičním sledu (Bongiorni a kol. 2004). Právě změny v kinetické aktivitě mohou způsobit změny v prostorové orientaci holokinetických bivalentů během meiózy, při které mohou být orientovány rovnoběžně (homeotypické dělení) či kolmo (heterotypické dělení) k ekvatoriální rovině buňky (Albertson a Thomson 1993). Tyto změny v orientaci jsou také umožněny díky přetrvávající jaderné membráně, která u organismů s holokinetickými chromozomy přetrvává až do pozdní prometafáze v meióze I (Wrensch a kol. 1994).

Holokinetické chromozomy se pravděpodobně vyvinuly z monocentrických chromozomů a byly pozorovány u mnoha eukaryotických skupin (Mandrioli a Manicardi 2012). Melters a kol. (2012) se domnívají, že ancestrální předek eukaryot nesl právě monocentrické chromozomy. Holokinetické chromozomy se pak vzhledem k jejich fylogenetické distribuci patrně vyvinuly z monocentrických nezávisle nejméně 13x. U zelených řas se holokinetické chromozomy objevují u čeledí Desmidiaceae a Zygnematales (Godward 1954; King 1960). U rostlin vznikly pravděpodobně nezávisle alespoň čtyřikrát. Holokinetické chromozomy má většina druhů z čeledí Juncaceae a Cyperaceae (Melters a kol. 2012). U krytosemenných rostlin byly detekovány Flachem (1966) u muškátovníku vonného (*Myristica fragrans*). Dalšími holokinetickými rostlinami jsou rostliny rodu *Chionographis* (Tanaka a Tanaka 1979), *Cuscuta* (Pazy a Plitman 1994) a *Drosera* (Sheikh a kol. 1995). U živočichů se holokinetické chromozomy vyvinuly nejméně devětkrát. Jednou u kmene Nematoda a osmkrát v kmeni Arthropoda, jmenovitě u hmyzích řádů Ephemeroptera, Odonata, Zoraptera, Dermaptera, Hemiptera, sesterských řádů Trichoptera a Lepidoptera, některých čeledí či podčeledí z třídy Arachnida a u několika druhů čeledí Scutigerae a Heniconidae z třídy Chilopoda (Mola a Papeschi 2006; Melters a kol. 2012). Při porovnávání genomů mezi zástupci hmyzu s monocentrickými a holokinetickými chromozomy Drinnenberg a kol. (2014) zjistili, že testovaným druhům s holokinetickými chromozomy chyběl (na rozdíl od druhů s monocentrickými chromozomy) významný CenH3 protein. Autoři se domnívají, že nezávislý přechod od monocentrických chromozomů k holokinetickým vedl nejméně u čtyř skupin hmyzu k druhotné ztrátě již nepotřebného CenH3 proteinu.

1.4. Holokinetický drive

Dle Bureše a Zedka (2014) se holokinetické chromozomy od monocentrických liší nejen v samotné struktuře chromozomů, ale také ve třech základních karyologických charakteristikách. První z nich je počet chromozomů, který se mezi blízce příbuznými druhy rostlin i živočichů s holokinetickými chromozomy značně liší. Další typickou vlastností těchto skupin je proměnlivá velikost jejich chromozomů, kdy i v rámci jednoho rodu existují velké rozdíly v průměrných velikostech chromozomů. Oproti tomu blízce příbuzné druhy s monocentrickými chromozomy mají spíše podobné velikosti chromozomů. V neposlední řadě se karyotyp holokinetických organismů vyznačuje negativní korelací mezi velikostí genomu a počtem chromozomů.

Aby vysvětlili tyto tři pozorované rozdíly, formulovali Bureš a Zedek (2014) hypotézu holokinetického drivu, který představuje mechanismus analogní centromerickému drivu (Bureš a Zedek 2014). Stejně jako u centromerického drivu musí být i u mechanismu holokinetického drivu splněny podmínky asymetričnosti samičí meiózy a dělicího vřeténka. V případě holokinetického drivu však místo homologních centromer soupeří o začlenění do vaječné buňky během asymetrické meiózy celé homologní chromozomy. Na rozdíl od centromerického drivu si při holokinetickém drivu mohou konkurovat homologní chromozomy v obou meiotických děleních. Analogicky centromerickému drivu bude tedy záležet na velikosti celého chromozomu a schopnosti vaječného pólu přitahovat menší či větší chromozomy (Zedek 2013). Avšak na rozdíl od centromerického drivu, který vedl k převaze akrocentrických či metacentrických chromozomů v karyotypu, by měl holokinetický drive vést ke zvětšování či zmenšování všech chromozomů. Velikost holokinetických chromozomů tak může neustále narůstat či se zmenšovat (Bureš a Zedek 2014).

Na velikost chromozomu má vliv amplifikace či delece repetitivních sekvencí, případně také chromozomální fúze a rozpady. Spolupůsobením těchto změn může dojít ke zvětšení chromozomů. Pokud centrozom vaječného pólu dělicího vřeténka preferuje velké chromozomy, vedl by holokinetický drive ke zvětšení velikosti genomu a zároveň snížení počtu chromozomů. Naopak preference malých chromozomů centrozomem vaječného pólu by vedla ke zmenšování genomu a zvyšování celkového počtu chromozomů (Bureš a Zedek 2014).

Efektivita holokinetického drivu značně závisí na míře chromozomálních fúzí či rozpadů, které jsou považovány za primární příčinu změn velikosti a počtu chromozomů u taxonů s holokinetickými chromozomy. Jak již bylo zmíněno výše, právě struktura holokinetických chromozomů, například u motýlů, umožňuje chromozomální fúze

a fragmentace (Kandul a kol. 2007). Během chromozomální fúze, neboli částečné symploidii, dochází k neletálnímu spojení dvou nehomologních chromozomů. Toto spojení je asociováno se snížením počtu chromozomů a zároveň s jejich zvětšením. Naopak částečnou agmatoploidii, neboli chromozomální fragmentací, se rozumí rozpad chromozomu na životaschopné fragmenty, které jsou právě díky kinetochoru pokrývajícimu celou délku chromozomu normálně děděny v průběhu dělení. Výsledkem fragmentací jsou zmenšené chromozomy a jejich zvýšený počet (Guerra 2016). Holokinetický drive může tedy představovat významnou sílu pohánějící karyotypovou evoluci holokinetických organizmů.

1.5. Karyotypová evoluce motýlů

Řád motýli (Lepidoptera) se s téměř 160 000 popsányými druhy řadí mezi největší živočišné skupiny (van Nieukerken a kol. 2011). Cytogeneticky byl však dosud analyzován jen zlomek druhů. Jak již bylo zmíněno výše, motýli patří spolu se sesterským řádem chrostíků (Trichoptera) mezi skupiny živočichů s holokinetickými chromozomy. Vysoký počet chromozomů malé velikosti a uniformního tvaru spolu s absencí centromery komplikují identifikaci jednotlivých chromozomálních párů. Traut (1976) využil k identifikaci chromozomů bource morušového, *Bombyx mori*, pachytenních chromozomů, které jsou o mnoho delší a vykazují specifický chromomerový vzor. Tento vzor je však možné rozeznat pouze na některých bivalentech, a proto se nepodařilo identifikovat všechny chromozomy. K odlišení jednotlivých chromozomů nelze využít ani klasické proužkovací techniky (De Prins a Saitoh 2003). To vše značně komplikovalo studium motýlích karyotypů. Teprve se zavedením molekulárně-cytogenetických metod, jmenovitě fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a jejích modifikací (např. komparativní genomová hybridizace - CGH či genomová *in situ* hybridizace - GISH), bylo možné lokalizovat cílové sekvence pomocí fluorescenčně značených sond a tím přímo identifikovat i jednotlivé chromozomy (Goldsmith a Marec 2010).

Přes holokinetickou aktivitu svých chromozomů si většina motýlů v průběhu evoluce udržela poměrně konzervovaný karyotyp. U většiny čeledí motýlů se tak haploidní počet chromozomů pohybuje v rozmezí od $n = 29$ po $n = 31$ (Robinson 1971). Nejčastější počet chromozomů $n = 31$ je považován za ancestrální. Vznikl patrně u společného předka motýlů skupiny Ditrysia zahrnující 98 % všech žijících zástupců řádu Lepidoptera před více než 125 milionů let (Ahoła a kol. 2014). Nicméně existuje spousta případů, kdy byl prokázán kolísavý počet chromozomů mezi blízce příbuznými druhy či dokonce uvnitř druhu, například u čeledí Papilionidae (otakárkovití; Ahoła a kol. 2014), Pieridae (běláskovití; Lukhtanov

a kol. 2011), Nymphalidae (babočkovití; Brown a kol. 1992), Riodinidae (pestrobarvcovití; Brown a kol. 2012) či Lycaenidae (modráskovití; Kandul a kol. 2004). Právě modráskovití (Lycaenidae) mají pravděpodobně v celé živočišné říši nejrozdílnější karyotyp mezi blízkými příbuznými druhy. U rodu *Polyommatus* počet chromozomů kolísá od $n = 10$ po $n = 224$ - 226 (Lukhtanov a kol. 2005; Lukhtanov 2015). Z běláskovitých (Pieridae) vykazuje variabilní karyotyp například bělásek hrachorový (*Leptidea sinapis*), jehož počet chromozomů se u geograficky odlišných populací liší v rozmezí od $n = 28$ po $n = 53$ (Lukhtanov a kol. 2011). Brown a kol. (1992) objevili větší variabilitu u dvou primitivních rodů čeledi babočkovití (Nymphalidae). Rod *Podotricha* jehož počty chromozomů jsou různé od $n = 9$ po $n = 29$ a rod *Philaethria* s chromozomy $n = 12$ až $n = 88$. Ze zástupců skupiny motýlů byl doposud nejmenší počet chromozomů $n = 5$ objeven u amerického soumráčníka *Agathymus aryxna* (Freeman 1969) a neotropického motýla *Hypothyris thea* (Brown a kol. 2004). Druhy s odvozeným karyotypem mívají nejčastěji menší počet chromozomů (< 31). Karyotypy s větším počtem chromozomů (> 31) jsou méně časté. Chromozomální fúze tedy v karyotypové evoluci motýlů zjevně převažují nad chromozomálními rozpadly (Robinson 1971).

Stejně jako ptáci či hadi, mají motýli chromozomální určení pohlaví typu *Abraxas*. Samice jsou v tomto případě heterogametické s konstitucí WZ, případně ZO (v závislosti na přítomnosti či absenci chromozomu W). Samčí pohlaví je pak určeno homogametickou konstitucí ZZ (Traut a kol. 2007). Pohlavní chromozomy pravděpodobně vznikly z páru homologních autozomů, kdy jeden z páru získal gen určující pohlaví. Vzhledem k absenci rekombinace u samičího pohlaví, tzv. achiasmatická meióza, na chromozomu W došlo k degradaci genů a akumulaci repetitivních sekvencí (Traut a kol. 2007). Fúzí autozomů a pohlavních chromozomů dochází navíc u motýlů poměrně často ke vzniku tzv. neopohlavních chromozomů (Traut a kol. 2007, Nguyen a Carabajal Paladino 2016). Například bělásci rodu *Leptidea*, kteří mezi motýly vynikají svou dynamickou karyotypovou evolucí, mají díky opakovaným chromozomálním přestavbám mezi pohlavními chromozomy a autozomy také mnohočetné pohlavní chromozomy (Šíchová a kol. 2015). Nguyen a kol. (2013) popsali fúzi chromozomu s autozomem homeologickým k chromozomu 15 bource morušového u obalečů čeledi Tortricidae. S přihlédnutím ke genovému obsahu tohoto autozomu autoři formulovali hypotézu, dle které fúze umožňuje vytvoření vazby mezi detoxifikačními geny a zpravidla pohlavně vázanou postzygotickou reprodukční izolací, což může usnadnit ekologickou specializaci a speciaci (Presgraves 2002).

2. Cíle práce

Jak již bylo zmíněno výše, chromozomální přestavby mezi autozomy a pohlavními chromozomy mohou vést ke vzniku neopohlavních chromozomů. Yoshida a Kitano (2012) ukázali, že evoluce mnohočetných pohlavních chromozomů je spojená s evolucí celého karyotypu. Ve své studii zjistili, že mnohočetný systém pohlavních chromozomů XY_1Y_2 se u savců častěji vyskytuje u druhů s převažujícím metacentrickým karyotypem, a naopak systém X_1X_2Y převažuje u druhů, jejichž karyotyp obsahuje zejména akrocentrické chromozomy. Proto navrhli meiotický drive jako jeden z mechanismů umožňujících fixaci fúzí pohlavních chromozomů s autozomy (viz Kap. 1.2.). Pokorná a kol. (2014) ve své analýze výskytu mnohočetných chromozomů u blanatých obratlovců (Amniota) zjistili, že u ptáků, kteří mají stejně jako motýli heterogametické určení samičího pohlaví, mnohočetné pohlavní chromozomy chybí, zatímco u linií s heterogametickým určením samčího pohlaví jsou časté. Tento kontrast autoři vysvětlují rozdílným zapojením heterochromozomů Y a W v samičí meióze. Chromozom Y se neúčastní samičí meiózy a je tedy chráněn před vlivem samičího meiotického drivu. Oproti tomu by nenáhodná segregace chromozomu W způsobená meiotickým drivem měla vést k vychýlení poměru pohlaví v potomstvu, a proto je penalizována selekcí.

Bureš a Zedek (2014) opírají svou hypotézu holokinetického drivu, analogu samičího meiotického drivu (viz Kap. 1.4.), mimo jiné také o analýzu potomstva hybridů martináčů *Antheraea pernyi* ($2n = 98$) a *A. roylei* ($2n = 60$) heterozygotních pro chromozomální přestavby. Interpretace výsledků této analýzy však nejsou zcela jednoznačné (cf. Nagaraju a Jolly 1986; Bureš a Zedek 2014) a přítomnost holokinetického drivu u motýlů tak dosud nebyla řádně testována (Nguyen a Carabajal Paladino 2016). Pochyby budí také celková evoluční stabilita motýlího karyotypu spolu s časným výskytem fúzí mezi pohlavními chromozomy a autozomy (viz Kap. 1.5.).

Holokinetický drive lze experimentálně testovat analýzou potomstva samice nesoucí chromozomální fúzi či rozpad v heterozygotním stavu. Pokud se výskyt sledované chromozomální aberace v potomstvu bude lišit od očekávaného Mendelistického poměru, lze předpokládat, že příčinou je právě holokinetický drive. Alternativně lze testovat hlavní predikci hypotézy holokinetického drivu, a to nepřímo úměrnou závislost mezi počtem chromozomů a velikostí genomu (Bureš a Zedek 2014).

Cílem mé bakalářské práce bylo předběžně otestovat predikovanou nepřímou závislost mezi velikostí genomu a počtem chromozomů a ověřit možnosti produkce heterokaryotů

křížením mutantní linie *Bombyx mori* r50 a japonské populace *B. mandarina*. Dílčími cíli práce byla optimalizace měření velikosti genomu motýlů metodou průtokové cytometrie, stanovení velikosti genomu vybraných zástupců motýlů a použití dostupných dat k provedení korelační analýzy k určení závislosti mezi velikostí genomu a počtem chromozomů. Dále bylo nutné ověřit přítomnost chromozomálních aberací u linie r50 *B. mori*, která nese translokaci chromozomů 23 a 25 (Banno a kol. 1993) a japonské populace *B. mandarina*, v jejímž karyotypu došlo pravděpodobně k fúzi chromozomů 14 a 27 (Banno a kol. 2004; K. Sahara nepublikované výsledky).

3. Metody

3.1. Hmyz

Pro stanovení velikostí genomu jsem jako standard použila housenky laboratorního kmene WT-C zavíječe moučného (*Ephestia kuehniella*) chované při teplotě 21 ± 1 °C na pšeničném šrotu, doplněném sušenými pivovarskými kvasnicemi. Bližší informace o původu kmene jsou uvedeny v práci Marec (1990). Jako alternativní standard byly použity larvy laboratorního kmene Krym-61 obaleče jablečného (*Cydia pomonella*), jehož velikost genomu byla stanovena v rámci této práce. Larvy tohoto standardu byly chovány za specifických nediapauzních podmínek na umělé potravě v místnosti o stálé teplotě 27 ± 1 °C a fotoperiodě 16 h den a 8 h noc. Detailnější informace o způsobu chovu a původu kmene jsou uvedeny v práci Fuková a kol. (2005).

Studované druhy motýlů jsem odchytila z přírodních populací; seznam studovaných druhů včetně jejich odchyťových lokalit je uveden v Tab. I. U druhů modrásek jehlicový (*Polyommatus icarus*) a bělásek řepový (*Pieris rapae*) jsem získala pouze oplozené samice, které jsem následně nechala při normálním denním a nočním režimu vyklást na živnou rostlinu v plastové krabici. Jako živnou rostlinu u *P. icarus* jsem použila štírovník růžkatý (*Lotus corniculatus*) a pro *P. rapae* byl živnou rostlinou křen selský (*Armoracia rusticana*). Housenky jedinců druhu martináč hedvábný (*Samia cynthia ricini*) byly chované v naší laboratoři. Od zbylých testovaných druhů jsem odchytila pouze samce, které jsem buď zamrazila ponořením do tekutého dusíku a uchovala při -80 °C či rovnou použila k měření. Bělásky rodu *Leptidea* mi poskytla RNDr. Jindra Šichová, Ph.D.

Tab. I: Seznam testovaných druhů včetně lokality odchyty.

Čeleď	Druh	Lokalita odchyty
Lycaenidae	<i>Polyommatus icarus</i>	Suchdol nad Lužnicí, Česká republika
Pieridae	<i>Colias crocea</i>	Suchdol nad Lužnicí, Česká republika
	<i>Colias hyale</i>	Suchdol nad Lužnicí, Česká republika
	<i>Gonepteryx rhamni</i>	Lužnice, Česká republika
	<i>Leptidea juvernica</i>	České Budějovice, Česká republika
	<i>Leptidea reali</i>	Přírodní park Montseny, Barcelona, Španělsko
	<i>Leptidea sinapis</i>	Havraníky, Česká republika
	<i>Pieris brassicae</i>	Novosedly nad Nežárkou, Česká republika
	<i>Pieris napi</i>	Třeboň, Česká republika
	<i>Pieris rapae</i>	Třeboň, Česká republika
Saturniidae	<i>Samia cynthia ricini</i>	Laboratorní chov
Tortricidae	<i>Cydia pomonella</i>	Laboratorní kmen Krym-61

Vajíčka mutantní linie r50 domestikovaného bource morušového (*Bombyx mori*) a jeho divoké japonské formy *Bombyx mandarina* poskytl Dr. Yutaka Banno (Institute of Genetic Resources, Kyushu University, Japonsko). Vylíhlé housenky *B. mori* jsem odchovávala na umělé potravě (Nihon Nosan Kogyo, Ltd., Yokohama, Japonsko). Larvy *B. mandarina* jsem živila listy morušovníku černého (*Morus nigra*).

3.2. Stanovení obsahu DNA průtokovou cytometrií

Měření průtokovou cytometrií jsem provedla za spolupráce s Mgr. Petrem Kouteckým, Ph.D. v Laboratoři molekulární biologie rostlin PŘF JU v Českých Budějovicích na průtokovém cytometru CyFlow SL (zdrojem světla je laser o vlnové délce 532 nm; Partec GmbH., Münster, Německo).

Abych mohla prostřednictvím průtokové cytometrie určit velikosti genomu jednotlivých druhů motýlů, potřebovala jsem alespoň dva standardy o známé velikosti genomu. Jako standardy jsem použila druh *Ephestia kuehniella* o známém obsahu jaderné DNA $1C = 0,45$ pg (Buntrock a kol. 2012) a druh *Cydia pomonella*, jehož obsah jaderné DNA dosud nebyl znám, a proto jsem ho nejdříve stanovila (viz Kap. 4.1.) použitím *E. kuehniella* jako standardu. Během měření byl cytometr nastaven vždy tak, aby byl standard *E. kuehniella* zaznamenáván na kanálu 200 a standard *C. pomonella* na kanálu 300, popřípadě kanálu 200 na 1 024 kanálové stupnici. Všechny vzorky jsem obarvila interkalačním barvivem propidium jodid a při měření zaznamenávala fluorescenci 5 000 jader. Každý druh jsem nejprve měřila zvlášť s oběma standardy. Podle toho, jak se vzorek se standardy překrýval, jsem pro další měření vybrala vhodný standard.

3.2.1. Měření hemocytů

Při prvních analýzách s druhy *Polyommatus icarus* a *Pieris rapae* jsem postupovala podle protokolu Buntrock a kol. (2012). Po odstřížení panožky housenky měřených druhů i standardů jsem pipetou odebrala vytvořenou kapku hemolymfy o objemu cca 5 μ l. Hemolymfu vzorku i standardu jsem přenesla do 1 ml pufru (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM $MgCl_2$ a 1% Triton X-100; podle práce Sigmundová 1997) s několika zrnky fenylthiomočoviny, která inhibuje fenol oxidázy a zamezuje tak černání hemolymfy. Následně jsem ke vzorku přidala 50 μ l propidium jodidu, důkladně promíchala a nechala vzorek alespoň 15 min barvit při pokojové teplotě.

Po obarvení jsem vzorek přefiltrovala přes 42 µm filtr (Uhelon 130 T), pohledem zkontrolovala, zda neobsahuje nečistoty či zbylá zrnka fenylthiomočoviny a následně vložila do průtokového cytometru k vlastnímu měření.

3.2.2. Měření mozkové tkáně

Pro analýzy zbylých druhů jsem použila hlavičky larev či dospělců obsahujících diploidní mozkovou tkáň, které poskytovaly lepší výsledky (jednotlivé vrcholy byly úzké a daly se od sebe rozlišit; cf. Tobler a kol. 2005).

Do Petriho misky jsem napipetovala 1 ml pufru a následně jsem vložila hlavu dospělého zkoumaného druhu a hlavu larvy standardu. Pokud hlavy dospělců studovaných druhů byly mnohonásobně větší než hlavy larev standardů, materiál jsem rozpůlila. Hlavičky jsem poté v pufru důkladně homogenizovala žiletkou. Vzniklou suspenzi buněk jsem přefiltrovala přes 42 µm filtr (Uhelon 130 T) a pohledem zkontrolovala čistotu. K takto získanému vzorku jsem následně přidala 50 µl propidium jodid a po řádném promíchání nechala barvit alespoň 15 min. Po obarvení jsem vzorek vložila do cytometru k vlastnímu měření.

3.2.3. Zpracování dat

Získaná data z cytometru jsem dále zpracovávala pomocí programu FlowJo 10 (FlowJo, LLC, Ashland, OR, USA). U každého analyzovaného vzorku jsem z průměrných poloh vrcholu (“peaku”) vzorku a standardu vypočetla poměr fluorescence vzorku a standardu. Tento výsledek jsem následně vynásobila velikostí genomu použitého standardu (*Ephesia kuehinella* = 0,45 pg či *Cydia pomonella* = 0,78 pg) a získala tak velikost genomu vzorku. Souhrnná rovnice pro výpočet velikosti genomu (C) je:

$$C = \frac{\text{vzorek}}{\text{standard}} \times C \text{ standard.}$$

Měření bylo, s výjimkou *Pieris brassicae*, prováděno ve třech biologických replikách, ze kterých byl následně spočítán průměr a směrodatná odchylka. V případě *P. brassicae* byla velikost genomu stanovena pouze u dvou samců.

Vypočítané velikosti genomů zkoumaných druhů jsem analyzovala v programu Statistica 13 (Dell Inc., Tulsa, OK, USA) pomocí mnohonásobné regrese.

3.3. Fluorescenční *in situ* hybridizace

3.3.1. Příprava chromozomálních preparátů

Meiotické chromozomální preparáty pro FISH jsem připravila pomocí takzvané “spreading” techniky na histologické ploténce podle protokolu z práce Mediouni a kol. (2004). Pro přípravu preparátů jsem použila testes housenek pátého instaru ze dvou druhů bource, *Bombyx mori* r50 s chromozomální aberací T(23;25) (Banno a kol. 1993) a *B. mandarina* s chromozomální aberací F(14;27) (Banno a kol. 2004; K. Sahara nepublikované výsledky). Testes jsem pítvala ve fyziologickém roztoku pro *Ephestia kuehniella* (Glaser 1917 citovaný v práci Lockwood 1961; 0,9% NaCl, 0,042% KCl, 0,025% CaCl₂, 0,02% NaHCO₃). Testes jsem následně na 10 min přenesla do hypotonického roztoku 0,075 M KCl. Po očištění jsem testes přenesla do fixáže připravené dle Carnoye (etanol - chloroform - kyselina octová v poměru 6 : 3 : 1) a nechala fixovat po dobu 15 min. Část testes jsem pak přemístila do kapky 60% kyseliny octové na podložním skle ošetřeném v kyselém etanolu (1% HCl v 96% etanolu). V této kapce jsem pomocí wolframových jehel testes macerovala. Po důkladné maceraci jsem přenesla sklíčko na histologickou plotýnku zahřátou na 45 °C, kde jsem pomocí wolframové jehly postupným posouváním odpařující se kapky rozprostřela materiál po sklíčku. Nakonec jsem chromozomální preparáty odvodnila v etanolové řadě (70% - 80% - 100% po 30 - 60 s) a do dalšího použití uchovala při -20 °C.

3.3.2. Syntéza telomerického templátu

Telomerický templát (TTAGG)_n jsem vyrobila pomocí metody beztemplátové polymerázové řetězové reakce (PCR) podle protokolu popsáního v Sahara a kol. (1999). Složení reakce o celkovém objemu 100 µl bylo následující: 0,5 µM primer F o sekvenci 5'-TAGGTTAGGTTAGGTTAGGT-3', 0,5 µM primer R o sekvenci 5'-CTAACCTAACCTAACCTAAC-3', 1 x Ex *Taq* pufr, 0,2 mM dNTP, 8 U Ex *Taq* polymerázy (TaKaRa, Otsu, Japonsko). Reakce probíhala v následujících krocích: počáteční denaturace 90 s při 94 °C, následovaná třiceti cykly, v kterých docházelo opakovaně k denaturaci po 45 s při 94 °C, annealingu po 30 s při 52 °C, syntéze 60 s při 72 °C. Závěrečná syntéza probíhala 10 min při 72 °C.

DNA templát jsem následně precipitovala přidáním 1/10 celkového objemu reakce 3 M octanu sodného a 2,5 násobku 100% etanolu. Vzorek byl inkubován v -80 °C po dobu jedné hodiny a vysráženou DNA jsem poté centrifugovala 20 min při 4 °C a 13 000 rpm. Po centrifugaci jsem odebrala supernatant a vzniklý pelet promyla 70% etanolem. Pročištěný

pelet jsem nakonec rozpustila přes noc ve vodě při 4 °C. Koncentraci vyrobeného telomerického templátu jsem změřila pomocí Qubit 3.0 fluorometru (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Při měření koncentrace jsem postupovala podle protokolu výrobce.

3.3.3. Značení telomerického templátu

Připravený telomerický templát jsem následně naznačila metodou tzv. “nick translace” fluorochromem Cy3-dUTP (Jenna Bioscience, Jena, Germany) soupravou Nick Translation Kit (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA) dle pokynů výrobce. Značící reakce probíhala po dobu jedné hodiny při teplotě 15 °C a následně byla inaktivována zahřátím na 70 °C po dobu 10 min.

3.3.4. Fluorescenční *in situ* hybridizace s telomerickou sondou (tel-FISH)

Pro identifikaci trivalentu tvořeného aberantním chromozomem T(23;25) a chromozomy 23 a 25 jsem použila metodu fluorescenční *in situ* hybridizace s telomerickou sondou (TTAGG)_n (tel-FISH), značící konce chromozomů.

Preparáty jsem po vyjmutí z mrazicího boxu odvodnila v etanolové řadě (70% - 80% - 100% po 30 - 60 s) a nechala oschnout. Mezitím jsem si připravila 70% deionizovaný formamid v 2 x SSC pro denaturaci chromozomů. Na každý preparát jsem nanasla 100 µl denaturační směsi a překryla ji krycím sklíčkem (24 x 50 mm). Preparáty jsem následně nechala denaturovat ve vyhřátém bločku na 68 °C po dobu 3 min 30 s. Ihned po denaturaci jsem preparáty vložila na 1 min do ledového 70% etanolu, abych zabránila případné renaturaci DNA, a dokončila etanolovou řadu (80% - 100% po 30 - 60 s). Takto denaturované a odvodněné preparáty jsem nakonec nechala oschnout na vzduchu.

Pro přípravu hybridizační směsi na každý preparát jsem smíchala 100 ng telomerické sondy a 25 µg sonikované lososí DNA. Následně jsem ke směsi přidala 1/10 objemu 3 M octanu sodného a 2,5 x objemu 100% ledového etanolu. Vzniklou hybridizační směs jsem stočila v chlazené centrifuze při 4 °C a 14 000 rpm po dobu 25 minut. Po centrifugaci jsem odstranila supernatant. Utvořený pelet jsem promyla přidáním ledového 70% etanolu a znovu centrifugovala za stejných podmínek, tentokrát po dobu 5 min. Následně jsem opět odebrala supernatant a nechala pelet řádně oschnout na vzduchu při pokojové teplotě. Pelet jsem následně rozpustila v 5 µl 100% deionizovaného formamidu 30 min inkubací při 37 °C. Nakonec jsem k hybridizační směsi přidala 5 µl dextran sulfátu v 4x SSC pufru a dala na 5 min

denaturovat do vodní lázně předeřáté na 90 °C. Po denaturaci jsem sondu ihned vložila na led, abych zabránila případné renaturaci.

Na každý preparát s denaturovanými chromozomy jsem nanesla 10 µl denaturované hybridizační směsi, přikryla krycím sklíčkem (24 x 32 mm) a následně utěsnila okraje krycího sklíčka kaučukovým lepidlem Fixogum (Marabuwerke GmbH, Tamm, SRN), abych zamezila odpařování hybridizační směsi. Preparáty jsem následně nechala hybridizovat 3 dny při 37 °C v komůrce s navlhčeným ubrouskem v 2 x SSC pufru.

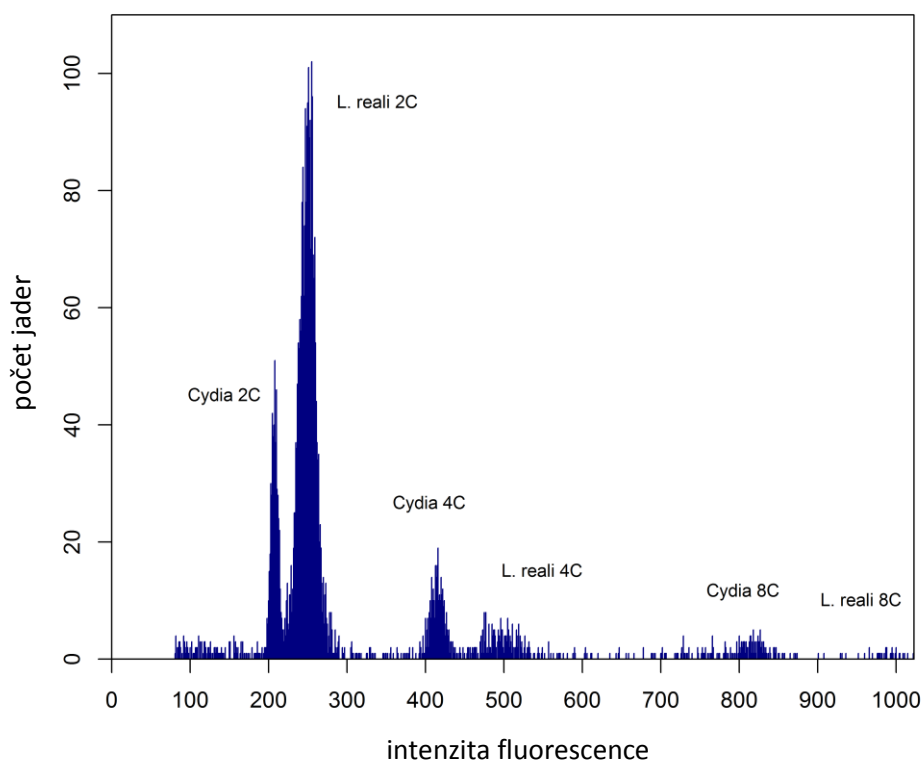
Po třech dnech hybridizace jsem z preparátů odmočila krycí sklíčka v 0,1 x SSC/1% Triton X-100 při pokojové teplotě. Preparáty jsem následně vložila do 0,1 x SSC/1% Triton X-100 a nechala promývat ve vodní lázni předeřáté na 62 °C, po dobu 5 minut. Následně jsem preparáty ještě promyla 1 min v 1% PhotoFlo/miliQ. Po částečném oschnutí preparátů jsem na každý preparát nanesla 0,5 mg/ml DAPI a média zabraňujícího vyhasínání fluorescence (“antifade”) připraveného z DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a překryla krycím sklíčkem (24 x 40 mm). Přebytek média jsem odsála pomocí jemného stlačení přes filtrační papír a nakonec jsem hrany krycího sklíčka překryla lakem na nehty, abych zamezila jeho odpařování.

Preparáty jsem prohlížela ve fluorescenčním mikroskopu Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Jena, Německo). Digitální fotografie jsem snímala pro každou fluorescenční barvu zvlášť chlazenou CCD kamerou XM10 pomocí programu cellSens 1.9 (Olympus Europa Holding, Hamburg, SRN). Pořízené fotografie jsem posléze obarvila a složila v programu Adobe Photoshop, verze 6.0.

4. Výsledky

4.1. Cytometrické analýzy

Při měření velikosti genomu jednotlivých druhů motýlů prostřednictvím průtokové cytometrie jsem jako standardy střídala dva druhy chované v naší laboratoři, tak aby šly hodnoty měřeného vzorku a standardu dobře odečíst. První standard, *Ephestia kuehniella*, s velikostí genomu $1C = 0,45$ pg (Buntrock a kol. 2012) jsem použila nejprve pro stanovení druhého standardu, *Cydia pomonella*, a následně pro měření druhů *Colias crocea*, *Gonepteryx rhamni*, *Leptidea juvernica*, *L. sinapis*, *Pieris napi*, *P. rapae*, *Polyommatus icarus* a *Samia cynthia ricini*. Druhý standard, *C. pomonella*, jsem použila při zjišťování velikosti genomu u motýlů *Colias hyale*, *Leptidea reali* a *Pieris brassicae*. Na Obr. 1 je ukázka histogramu získaného průtokovou cytometrií. Z průměrných 2C hodnot standardu a vzorku jsem následně vypočetla velikost genomu testovaného jedince.



Obr. 1: Příklad stanovení velikosti genomu na průtokovém cytometru. Histogram ukazuje závislost počtu jader na jejich relativní intenzitě fluorescence na příkladu běláška *Leptidea reali* s použitím obaleče *Cydia pomonella* jako standardu. První vrchol představuje množství diploidních jader (2C) standardu *C. pomonella*, kterému byla přiřazena hodnota intenzity fluorescence 200. Na kanálech 400 a 800 jsou pak násobky 2C jader, tedy tetraploidní a oktaploidní jádra *C. pomonella*. Zbylé vrcholy pak představují jádra analyzovaného druhu

L. reali. Je patrné, že v obou případech byla většina jader ve stádiu G1 fáze (2C). Z grafu je také zřejmé, že měřená suspenze jader obsahovala větší množství vzorku než standardu a to i přesto, že byla pro měření použita jen polovina hlavy dospělého testovaného druhu, která byla stále mnohem větší než hlavička použitého standardu.

Celkem jsem velikost genomu stanovila u 12 druhů motýlů. Výsledky jednotlivých měření spolu s jejich průměrnou hodnotou a směrodatnou odchylkou jsou uvedeny v Tab. II. Ke všem analyzovaným druhům jsem v literatuře dohledala diploidní počty chromozomů, které jsou uvedeny spolu s příslušnými referencemi v Tab. III. Jelikož u zástupců rodu *Leptidea* je karyotyp značně variabilní i v rámci druhu, je v Tab. III zahrnut průměr spočtený na základě minimálního a maximálního zaznamenaného počtu chromozomů.

Tab. II: Výsledné haploidní (1C) velikosti genomu stanovené průtokovou cytometrií.

Čeleď	Druh	Vzorek 1	Vzorek 2	Vzorek 3	průměr DNA (pg)	SD
Lycaenidae	<i>Polyommatus icarus</i>	0,63	0,64	0,63	0,63	0,005
Pieridae	<i>Colias crocea</i>	0,39	0,40	0,39	0,39	0,005
	<i>Colias hyale</i>	0,42	0,42	0,42	0,42	0,000
	<i>Gonepteryx rhamni</i>	0,40	0,39	0,39	0,39	0,005
	<i>Leptidea juvernica</i>	1,11	1,15	1,15	1,14	0,019
	<i>Leptidea reali</i>	0,91	0,90	0,94	0,92	0,017
	<i>Leptidea sinapis</i>	0,85	0,86	0,86	0,86	0,005
	<i>Pieris brassicae</i>	0,28	0,28	n/a	0,28	0,000
	<i>Pieris napi</i>	0,38	0,39	0,39	0,39	0,005
	<i>Pieris rapae</i>	0,32	0,32	0,31	0,32	0,005
Saturniidae	<i>Samia cynthia ricini</i>	0,57	0,57	0,57	0,57	0,000
Tortricidae	<i>Cydia pomonella</i>	0,77	0,78	0,78	0,78	0,005

SD - Směrodatná odchylka; n/a - Chybějící data.

Tab. III: Mnou naměřené haploidní velikosti genomu a diploidní počty chromozomů testovaných druhů získaných z literatury.

Čeleď	Druh	1C DNA (pg)	2n	Reference
Lycaenidae	<i>Polyommatus icarus</i>	0,63	46	Robinson (1971)
Pieridae	<i>Colias crocea</i>	0,39	62	Robinson (1971)
	<i>Colias hyale</i>	0,42	62	Robinson (1971)
	<i>Gonepteryx rhamni</i>	0,39	62	Robinson (1971)
	<i>Leptidea juvernica</i>	1,14	88*	Šíchová a kol. (2015)
	<i>Leptidea reali</i>	0,92	53*	Šíchová a kol. (2015)
	<i>Leptidea sinapis</i>	0,86	71*	Šíchová a kol. (2015)
	<i>Pieris brassicae</i>	0,28	30	Robinson (1971)
	<i>Pieris napi</i>	0,39	50	Robinson (1971)
	<i>Pieris rapae</i>	0,32	50	Robinson (1971)
Saturiidae	<i>Samia cynthia ricini</i>	0,57	28	Yoshido a kol. (2011)
Tortricidae	<i>Cydia pomonella</i>	0,78	56	Fuková a kol. (2005)

*Průměrná hodnota z rozmezí: *L. juvernica* 2n = 85 - 91; *L. reali* 2n = 51 - 55; *L. sinapis* 2n = 69 - 73.

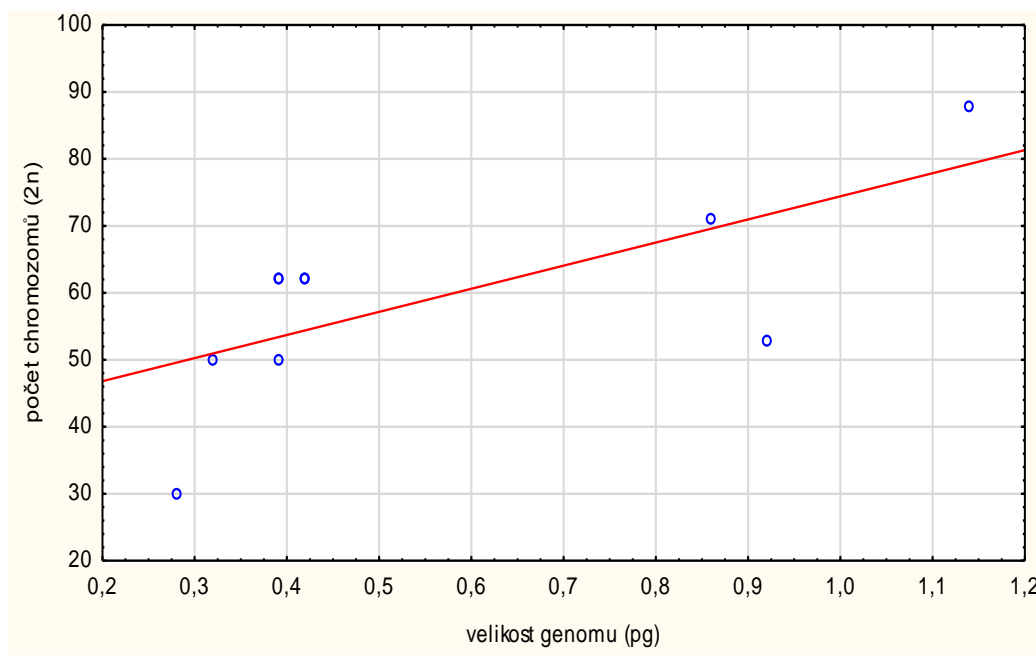
Tab. IV: Přehled motýlů se známými diploidními počty chromozomů, haploidními velikostmi genomu a jejich metodou měření, dostupných z literatury.

Čeleď	Druh	2n	1C DNA (pg)	Metoda	Reference
Bombycidae	<i>Bombyx mori</i>	56	0,53	BCA	Robison (1971)*; Gage (1974) [#]
Erebidae	<i>Lymantria dispar</i>	62	1,03	NS	Robison (1971)*; Petitpierre (1996) [#]
Geometridae	<i>Lycia pomonaria</i>	102	1,46	NS	Darlington (1937)*; Petitpierre (1996) [#]
Hesperiidae	<i>Lerema accius</i>	58	0,30	GS	Lukhtanov (2014)*; Cong a kol. (2016) [#]
Lycaenidae	<i>Calycopis cecrops</i>	48	0,75	GS	Robison (1971)*; Cong a kol. (2016) [#]
Noctuidae	<i>Heliothis virescens</i>	62	0,41	FCM	Yasukochi a kol. (2011)*; Taylor a kol. (1993) [#]
	<i>Xestia c-nigrum</i>	58	0,78	FIA	Franclemont (1980)*; Gregory a Hebert (2003) [#]
Nymphalidae	<i>Bicyclus anynana</i>	56	0,49	FIA	Van 't Hof a kol (2008)*; Gregory a Hebert (2003) [#]
	<i>Danaus plexippus</i>	60	0,29	FIA	Walters a Mongue (2016)*; Gregory a Hebert (2003) [#]
	<i>Heliconius melpomene</i>	42	0,30	FCM	Yasukochi a kol. (2011)*; Jiggins a kol. (2005) [#]
	<i>Melitaea cinxia</i>	62	0,40	GS	Robison (1971)*; Cong a kol. (2016) [#]
Papilionidae	<i>Papilio glaucus</i>	60	0,44	FIA	Sadhotra a Tripathi (2010)*; Gregory a Herbert (2003) [#]
	<i>Papilio machaon</i>	60	0,29	GS	Robison (1971)*; Song a kol. (2016) [#]
	<i>Papilio polytes</i>	60	0,23	GS	Robison (1971)*; Cong a kol. (2016) [#]
	<i>Papilio xuthus</i>	60	0,25	FCM	Robison (1971)*; Li a kol. (2015) [#]
Pieridae	<i>Phoebis sennae</i>	62	0,42	GS	Saura a kol. (2013)*; Cong a kol. (2016) [#]
Plutellidae	<i>Plutella xylostella</i>	62	0,40	GS	Baxter a kol. (2011)*; Cong a kol. (2015) [#]
Pyralidae	<i>Ephestia kuehniella</i>	60	0,45	FCM	Schultz a Traut (1979)*; Buntrock a kol. (2012) [#]
	<i>Galleria melonella</i>	60	0,5	FD	Robison (1971)*; Sigmundová 1997 [#]
Saturniidae	<i>Antheraea pernyi</i>	98	1,00	FD	Robison (1971)*; Efstratiadis a kol. (1976) [#]
Sphingidae	<i>Manduca sexta</i>	56	0,43	GS	Yasukochi a kol. (2011)*; Cong a kol. (2016) [#]

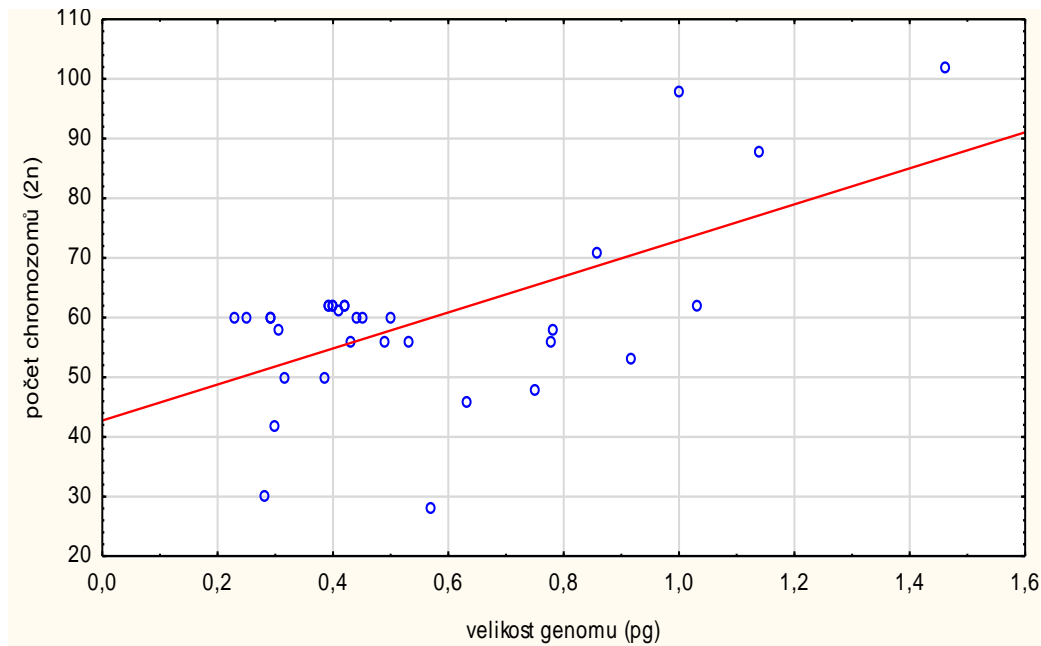
BCA - biochemická analýza; FCM - průtoková cytometrie; FD - Feulgen densitometrická analýza; FIA - Feulgen denzitometrická analýza obrazu buněk; GS - sekvenace genomu; NS - nespecifikováno; * Počet chromozomů; # Velikost genomu.

Kromě mnou testovaných druhů jsem také sestavila seznam motýlů, u nichž byly počty chromozomů a velikosti genomu již známé z dostupné literatury (Tab. IV). Z hodnot uvedených v Tab. III a IV je patrné, že druhy s ancestrálním počtem chromozomů $2n = 62$ mají, i přes značnou fylogenetickou vzdálenost, podobnou velikost genomu o průměrné hodnotě 0,483 pg ($SD = 0,207$ pg). Variabilita dat je přitom způsobena jedinou extrémní hodnotou u druhu *Lymantria dispar*, jejíž velikost genomu je více jak dvojnásobná v porovnání s ostatními druhy majícími karyotyp $2n = 62$. Po vyloučení tohoto druhu je průměrná velikost ancestrálního motýlího genomu 0,404 pg ($SD = 0,012$).

Korelaci mezi počty chromozomů a velikostí genomů jsem testovala nejdříve pro zástupce čeledi Pieridae, tedy mnou měřených druhů rodu *Colias*, *Gonepteryx*, *Leptidea* a *Pieris* (Tab. III) a žluťáčka *Phoebis sennae* (Tab. IV), a následně pro všechny druhy s dostupnými daty (Tab. III a Tab. IV). Graf závislosti počtu chromozomů na velikosti genomu u druhů čeledi Pieridae je zobrazen na Obr. 2. Korelační analýza ukázala, že haploidní velikost genomu těchto motýlů pozitivně koreluje s počtem chromozomů $r(8) = 0,687$, $P < 0,05$. Na Obr. 3 je vynesena graf závislosti počtu chromozomů na velikosti genomu pro všechna dostupná data. Při zahrnutí všech známých údajů je sice lineární závislost mezi diploidním počtem chromozomů a C-hodnotou volnější, ale stále statisticky signifikantní, $r(31) = 0,600$, $P < 0,01$.



Obr. 2: Graf závislosti diploidního počtu chromozomů ($2n$) na velikosti genomu ($1C$) u motýlů čeledi Pieridae ($2n = 39,9152 + 34,5114 \cdot 1C$).



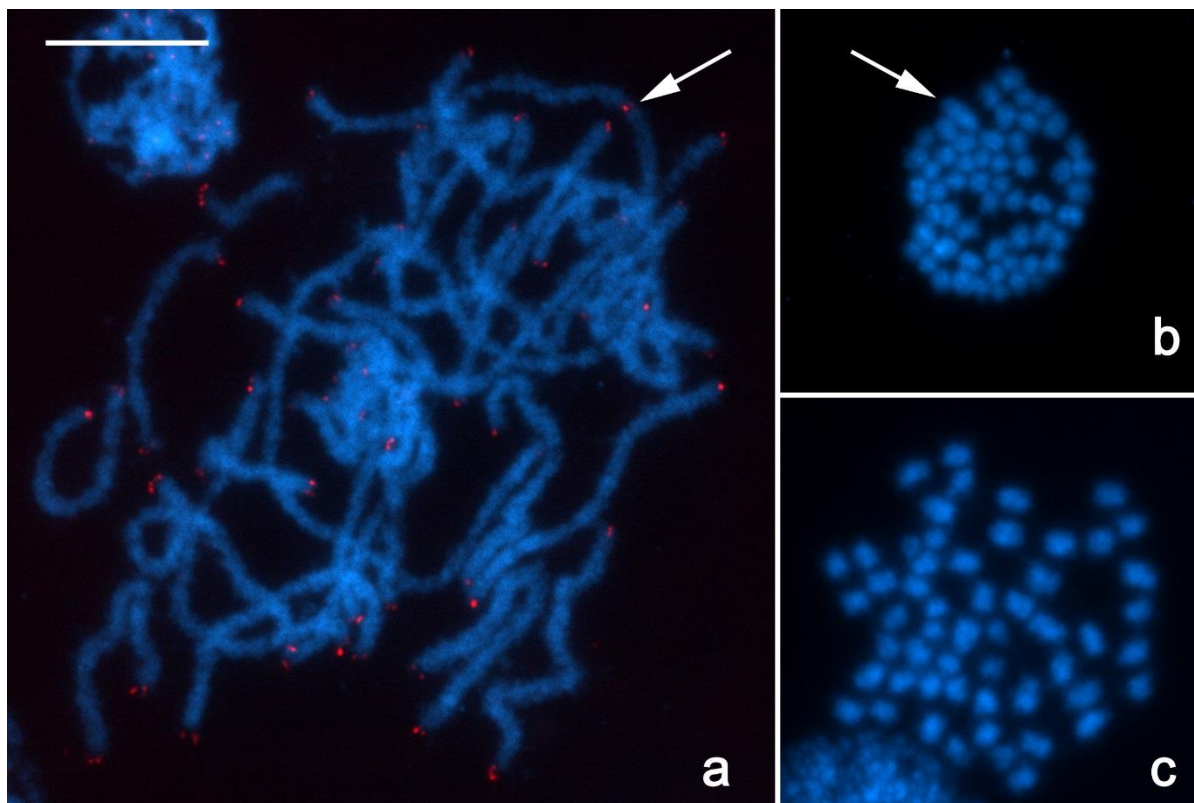
Obr. 3: Vztah závislosti diploidního počtu chromozomů ($2n$) na velikosti genomu ($1C$) pro všechna dostupná data ($2n = 42,7443 + 30,1909 * 1C$).

4.2. Karyotyp mutantů *Bombyx mori* r50 a *B. mandarina*

Použití FISH s telomerickou sondou na chromozomálních preparátech mi umožnil zviditelnit telomery na koncích pachytenních a mitotických chromozomů, což usnadnilo stanovení jejich počtu a detekci trivalentu.

U mutantní linie *B. mori* r50 FISH odhalila v samčím pachytenním jádře signály nejen na koncích chromozomů. Na mimořádně dlouhém elementu byly detekovány také vnitřní signály naznačující, že jde ve skutečnosti o trivalent (Obr. 4a). Přítomnost trivalentu dále podpořila samčí mitotická metafázní jádra, která se skládala z lichého počtu chromozomů, $2n = 55$ (Obr. 4b). Zároveň bylo možné v těchto jádrech rozeznat chromozom, který byl výrazně větší než ostatní chromozomy a postrádal homolog odpovídající velikosti. Vzhledem k tomu, že karyotyp divokého typu sestává z $2n = 56$ chromozomů (Nakamura a kol. 1999), jsou tyto výsledky důkazem přítomnosti translokovaného chromozomu v heterozygotní konstituci.

U samců japonské populace druhu *B. mandarina* byl v mitotických jádrech pozorován počet chromozomů $2n = 54$. Ačkoli na rozdíl od mutantní linie *B. mori* r50 není v komplementu přítomný žádný mimořádně velký chromozom, tento karyotyp je ve srovnání s počtem chromozomů čínské populace *B. mandarina* a domestikovaného *B. mori* s $2n = 56$ (Nakamura a kol. 1999) nižší a odpovídá chromozomální fúzi v homozygotním stavu.



Obr. 4: Karyotypová analýza mutantní linie r50 *Bombyx mori* (**a**, **b**) a japonské populace *B. mandarina* (**c**). **a** Samčí pachytenní jádro *B. mori* r50 po fluorescenční *in situ* hybridizaci s telomerickou sondou (TTAGG)_n; šipka označuje vnitřní telomerické signály párujících se s translokovaným chromozomem za vzniku dlouhého trivalentu. Chromozomy byly podbarveny DAPI (modrá), telomerická sonda značící konce chromozomů, byla naznačena fluorochromem Cy3-dUTP (červená). **b** Mírně rozptýlené samčí mitotické metafázní jádro *B. mori* r50 sestávající z 2n = 55; šipka ukazuje zřetelně větší chromozom, který je patrně výsledkem translokace. **c** Rozptýlený mitotický komplement samce z japonské populace *B. mandarina* sestávající z 2n = 54. Měřítko = 10 μm.

5. Diskuze

Holokinetické chromozomy byly popsány Schraderem již roku 1935. Přesto toho však o jejich původu a evoluci dodnes víme velmi málo (Zedek 2013). Jednou z jejich často zmiňovaných charakteristik je jejich tolerance k frangmentacím a fúzím (Marec a kol. 2001; Bureš a Zedek 2014; Jankowska a kol. 2015). Při těchto přestavbách může dojít k částečným degradacím konců chromozomů (Roalson a kol. 2007), popřípadě amplifikaci či delecii repetitivních sekvencí DNA, což může mít vliv na velikost genomu (Bureš a Zedek 2014).

Při studiích mnohočetných pohlavních systémů u savců bylo zjištěno, že jejich evoluce je úzce spjatá s evolucí celého karyotypu, ve kterém v důsledku meiotického drivu, způsobeného asymetrickou samičí meiózou, dochází k hromadění akrocentrických či metacentrických chromozomů (Yoshida a Kitano 2012). V případě holokinetických organismů pak Bureš a Zedek (2014) navrhli mechanismus analogní meiotickému (centromerickému) drivu, holokinetický drive, který by mohl vysvětlovat karyologické charakteristiky a změny v celém karyotypu holokinetických organismů. Jedním z nich je negativní korelace mezi počtem chromozomů a velikostí genomu. Bureš a Zedek (2014) předpokládají, že holokinetický drive vede k nepřímo úměrnému vztahu mezi počtem chromozomů a velikostí genomu. U řádu Lepidoptera však holokinetický drive nebyl dosud řádně testován a bližší pohled na cytogenetické charakteristiky motýlů vyvolává pochybnosti o jeho přítomnosti a roli v karyotypové evoluci motýlů.

V této práci jsem se zaměřila na předběžné otestování hlavní predikce hypotézy holokinetického drivu, kterou je právě negativní korelace mezi počtem chromozomů a velikostí genomu. Za tímto účelem jsem stanovila velikosti genomu u vybraných zástupců čeledí Lycaenidae, Pieridae, Saturniidae a Tortricidae. Velikost genomu je známa u více než 90 druhů motýlů (Gregory 2017). Dostupné velikosti genomů motýlů byly stanoveny odlišnými metodami (viz Tab. IV; Gregory 2017), které jsou však poměrně srovnatelné. Například velikost genomu zavíječe *Ephestia kuehniella* byla stanovena na 0,45 pg a 0,46 pg na základě průtokové cytometrie, respektive Feulgenovy fotocytometrie (Buntrock a kol. 2012). Také výsledné velikosti genomů bělásků rodu *Leptidea* (tato práce) odpovídají relativnímu srovnání interfázních jader provedenému v práci Šichová a kol. (2015). Do práce byly také zahrnuty velikosti genomu osmi druhů určených prostřednictvím sekvenace genomu. Délka sekvence genomu přitom nemusí zcela odpovídat velikosti genomu, protože repetice zodpovědné za změny ve velikosti genomu mohou při skládání jeho sekvence vést ke vzniku mezer nebo slučování repetitivních sekvencí, což patrně podhodnocuje skutečnou

velikost genomu (Treangen a Salzberg 2011). To je patrné například ze studia bource *Bombyx mori*, jehož délka sekvence genomu odpovídá 0,44 pg (International Silkworm Genome Consortium 2008), ačkoliv jeho naměřená velikost genomu je ve skutečnosti 0,53 pg (Gage 1974). Nicméně bylo ukázáno, že délka sekvence genomu pozitivně koreluje [$r(36) = 0,466$, $P < 0,01$] se zastoupením transpozonů, které představují hlavní příčinu změn ve velikosti genomu (Canapa a kol. 2015). Stejný vztah mezi délkou sekvence genomu a procentuelním zastoupením repetitivních sekvencí byl potvrzen i u motýlů [$r(32) = 0,713$, $P < 0,01$; R. Challis nepublikovaná data; <http://lepbase.org/repeat-content/>], a proto byla tato data zahrnuta do provedené analýzy.

Průtoková cytometrie je ve srovnání s jinými přesnější a rychlejší metodou stanovení velikosti genomu (Greilhuber 2007). Průtokovou cytometrií jsem nejdříve změřila velikosti genomu zástupců čeledi Lycaenidae, Pieridae, Saturniidae a Tortricidae. Na počátku experimentů jsem připravovala materiál podle protokolu Buntrock a kol. (2012) odebráním hemolymfy larev, avšak výsledky tohoto postupu nebyly příliš uspokojivé kvůli komplikovanému odběru hemolymfy a proměnlivému množství v ní obsažených hemocytů. Navíc byla tato metoda z důvodu malého množství hemolymfy nevhodná pro dospělé. Proto jsem se pokusila měření optimalizovat nahrazením hemolymfy nervovou tkání (Tobler a kol. 2005). Tato záměna umožnila čisté měření, takže bylo snadnější rozlišit od sebe měřený vzorek a standard (jednotlivé vrcholy byly úzké a snadno od sebe odlišitelné). Použití hlaviček motýlů navíc dovolilo měřit přímo dospělé bez nutnosti odchování potomstva. Optimalizovaný protokol bylo navíc možné použít také k měření velikosti genomu z materiálu uchovávaného v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (cf. Hanrahan a Johnston 2011).

Velikost genomu je známa u poměrně velkého počtu druhů motýlů (Gregory 2017), pouze u 21 z nich jsou však dostupné také údaje o jejich počtu chromozomů (viz Tab. IV). Spolu s výsledky této práce (Tab. III) jsou tedy údaje o velikosti genomu a počtu chromozomů dostupné celkem u 33 druhů, z nichž mělo osm zástupců ancestrální karyotyp $2n = 62$. Všechny tyto druhy, s výjimkou bekyně *Lymantria dispar*, měly podobnou velikost genomu o průměrné hodnotě 0,404 pg ($SD = 0,012$). *Lymantria dispar* z čeledi Lymantridae měla jako jediná velikost genomu výrazně větší a to 1,03 pg. Právě čeleď Lymantridae je však charakteristická dynamickou karyotypovou evolucí. Například u štetconošů rodu *Orgyia* a *Calliteara*, došlo v průběhu evoluce k mnohým chromozomálním fúzím a fragmentacím (Robinson 1971; Traut a Clarke 1997; Yoshido a kol. 2005). Nabízí se tedy hypotéza, že zvýšení velikosti genomu je nutnou prerekvizitou karyotypové nestability u motýlů. Právě repetitivní sekvence totiž zprostředkovávají ektopickou rekombinaci mezi sekvencemi

z různých částí genomu, která vede ke vzniku chromozomálních přestaveb (Mieczkowski a kol. 2006; Nguyen a kol. 2010). Ahola a kol. (2014) také ukázali, že chromozomy s vyšším obsahem repetice vykazují vyšší frekvenci chromozomálních přestaveb. Tomu odpovídají také druhy s vysokým počtem chromozomů, které mají zároveň velký genom (viz Tab. III a IV).

Analýzou lineární regrese jsem otestovala korelaci mezi počtem chromozomů a velikostí genomu pro čeleď Pieridae. Výsledkem tohoto testu byla pozitivní korelace mezi počtem chromozomů a velikostí genomu [$r(8) = 0,687$, $P < 0,05$]. Přesnost analýzy však mohla být ovlivněna nedostatečným počtem zahrnutých druhů a nereprezentativností analyzovaného vzorku. Druhy s nejvyššími či nejnižšími počty chromozomů patřily k jednomu rodu, *Leptidea* respektive *Pieris*, a nešlo tedy o zcela nezávislé hodnoty. Jelikož bylo v této analýze zahrnuto jen několik zástupců s vysokými počty chromozomů, všichni z rodu *Leptidea*, je možné, že právě tyto bělásci významně zvyšují korelační koeficient a zkreslují tak výsledek analýzy. Proto jsem provedla test lineární regrese také pro všechna dostupná data, abych do analýzy zahrnula více druhů i s vyššími počty chromozomů a snížila zkreslení výsledku. I v tomto případě však vyšla statisticky průkazná pozitivní korelace [$r(31) = 0,600$, $P < 0,01$].

Pro další testování by bylo vhodné zahrnout do analýzy více druhů s vysokými počty chromozomů. Velké odvozené modální počty chromozomů a dynamická karyotypová evoluce jsou, vedle čeledi Pieridae, typické například pro čeleď Saturniidae (Robinson 1971). Avšak největší mezidruhová karyotypová variabilita byla pozorována u modrásků čeledi Lycaenidae, přesněji u rodu *Polyommatus*, u kterého se haploidní počet chromozomů pohybuje v rozmezí $2n = 20 - 452$ (Lukhtanov a kol. 2005; Lukhtanov 2015). Ačkoliv je modální počet chromozomů čeledi Lycaenidae $2n = 46 - 48$ (Robinson 1971), došlo během evoluce u tří rodů skupiny Polyommatina k rozsáhlým fragmentacím karyotypu (Kandul a kol. 2004). Obrovská variabilita v počtu chromozomů těchto rodů přitom pravděpodobně není způsobena polyploidizací, ale rozsáhlými chromozomálními přestavbami zahrnujícími zejména fúze a fragmentace chromozomů (Lukhtanov a kol. 2005). Modrásci tak představují vhodný modelový systém pro další testování vztahu mezi velikostí genomu a počtem chromozomů u motýlů. Předběžné výsledky získané v rámci této práce ukazují, že modální karyotyp čeledi Lycaenidae reprezentovaný v této práci modráskem jehlicovým, *Polyommatus icarus*, s $2n = 46$ koresponduje s genomem velkým 0,63 pg (Tab. III).

Předběžné výsledky korelačních analýz provedených v této práci nepotvrdily negativní korelaci mezi počtem chromozomů a velikostí genomu motýlů, která je klíčovým předpokladem hypotézy holokinetického drivu. Podobný test vztahu mezi počtem

chromozomů a velikostí genomu provedli například Lipnerová a kol. (2013), avšak s opačným výsledkem. Testováním korelace na 96 diploidních rostlinách rodu *Carex* potvrdili nepřímou úměru [korelace s fylogenetickou korekcí nezávislých kontrastů (“phylogenetically independent contrast, Pic”); PicR = -0,300, $P = 0,002$] mezi počtem chromozomů a velikostí genomu. Negativní korelace byla dále prokázána u rostlinných čeledí Juncaceae a Cyperaceae (Roalson a kol. 2007; Bureš a Zedek 2014). Nicméně další studie odhalily i opačný vztah odporující predikci holokinetického drivu. Například Chung a kol. (2012) při testování 87 druhů rodu *Carex* podrodu *Vignea* odhalili, že mezi počtem chromozomů a velikostí genomu existuje korelace pohybující se od slabé, avšak statisticky neprůkazné, pozitivní u sekce *Ovales* [korelace s fylogenetickou korekcí zobecněných nejmenších čtverců (“generalized least squares, GLS”); GLS $\beta_1 = 0,061$, $R^2 = 0,069$, $P = 0,093$] až po slabou negativní u zbylých druhů podrodu *Vignea* (GLS $\beta_1 = -0,211$, $R^2 = 0,147$, $P < 0,05$). K stejnému závěru o pozitivní korelaci dospěli také Escudero a kol. (2015) při experimentech na rostlinách rodu *Carex laevigata*. Ačkoliv autoři negativní korelaci nepotvrdili, přesto si myslí, že jakákoliv významná korelace, pozitivní i negativní, by mohla být brána jako podpora holokinetického drivu. To však činí z holokinetického drivu netestovatelnou hypotézu.

Kromě negativní korelace jsou dle Bureše a Zedka (2014) typickými karyologickými znaky pro holokinetiky ještě variabilní počet chromozomů mezi blízkce příbuznými druhy a jejich variabilní velikost chromozomů. Variabilní počet chromozomů mezi blízkce příbuznými druhy byl pozorován například u rostlin rodů *Carex* $2n = 12 - 124$ a *Eleocharis* $2n = 6 - 196$ čeledi Cyperaceae (Roalson 2008) či rodů *Juncus* $2n = 18 - 170$ a *Luzula* $2n = 6 - 84$ čeledi Juncaceae (Fedorov 1969 citovaný v Bureš a Zedek 2014). Avšak co se týče motýlů, je známo, že jejich karyotyp je vysoce konzervovaný s nejčastějším a pravděpodobně ancestrálním počtem chromozomů $2n = 62$, přičemž i jednotlivé čeledi se vyznačují pro ně typickým, tzv. modálním, počtem chromozomů (Robinson 1971). Navíc bylo ukázáno, že u modrásků rodu *Agrodiaetus* průměrné karyotypové rozdíly pozitivně korelují s nukleotidovou divergencí ($R^2 = 0,82$, $P < 0,01$). Rozdíly v karyotypech se tedy zvyšují s rostoucím časem divergence (Lukhtanov a kol. 2005).

Poslední charakteristikou organismů s holokinetickými chromozomy má být dle Bureše a Zedka (2014) variabilní velikost chromozomů mezi blízkce příbuznými druhy. Velikost chromozomů se skutečně značně liší například u rostlin rodů *Carex* v rozsahu 2,6 - 122 Mbp, *Eleocharis* v rozmezí 8 - 299 Mbp a *Luzula*, kde se pozorovaná velikost chromozomů mění od 8 do 1 324 Mbp (Bureš a Zedek 2014). Naopak u motýlů jsou však chromozomy v rámci karyotypu uniformní, malé a často se ve svých velikostech liší jen mírně

(Mediouni a kol. 2004). Výjimkou mohou být chromozomální aberace, tj. fúze, rozpady či translokace (Kandul a kol. 2007). Vzhledem k tomu, že se však metrické analýzy u motýlů neprovádějí (cf. Yoshido a kol. 2005), srovnání velikostí chromozomů mezi druhy nebylo dosud možné.

Holokinetické chromozomy vznikly pravděpodobně několikrát nezávisle z monocentrických chromozomů (Melters a kol. 2012) a byla tak navržena hypotéza, že se holokinetická aktivita chromozomů vyvinula jako obrana proti centromerickému drivu (Malik a Henikoff 2009; Bureš a kol. 2013). Bureš a kol. (2013) argumentovali, že je vzhledem k velikosti kinetochoru, který pokrývá celou délku chromozomu, amplifikace centromerické satelitní DNA zanedbatelná při porovnání dvou homologů soupeřících o přenos do vaječné buňky. Holokinetické chromozomy by tak mohly zabraňovat hromadění velkých bloků centromerické satelitní DNA a tím potlačovat centromerický drive. Například u druhů *Luzula nivea* a *Caenorhabditis elegans*, jež mají holokinetické chromozomy, bylo skutečně zjištěno, že mají velice krátké úseky satelitní DNA (Emmons 1988; Haizel a kol. 2005), což by mohlo být způsobeno potlačením centromerického drivu související s holokinetickou strukturou jejich chromozomů. Centromerický drive se i přes inhibici akumulace satelitní DNA může objevit v případě, že se dva homology výrazně liší svou velikostí, například při fúzi dvou chromozomů, kdy se fúzní produkt páruje se svými homology (Bureš a kol. 2013).

Další pochybnosti o přítomnosti holokinetického drivu u motýlů přináší fakt, že jejich chromozomy jsou sice funkčně holokinetické, avšak kinetochor nepokrývá celou délku chromozomu, což je klíčovým předpokladem holokinetického drivu (Bureš a Zedek 2014). Bylo ukázáno, že kinetochor pokrývá pouze 30 - 70 % povrchu motýlích chromozomů (Gassner a Klemetson 1974; Wolf 1994). V průběhu evoluce motýlů tedy dosud nedošlo ani k předpokládanému rozšíření kinetochoru na celou délku chromozomů (Nguyen a Carabajal Paladino 2016).

Chromozomy motýlů tedy, zdá se, nesplňují základní předpoklady ani predikce holokinetického drivu, který tak patrně u motýlů není přítomen. Vylučuje však absence holokinetického drivu samičí meiotický, tj. centromerický, drive v původním pojetí?

Přítomnost centromerického drivu lze testovat analýzou segregace chromozomů v potomstvu hybrida heterozygotního pro fúze (Bureš a Zedek 2014). Nagaraju a Jolly (1986) provedli mezidruhové křížení martináčů *Antheraea roylei* ($2n = 62$) a *A. pernyi* ($2n = 98$). Následným křížením hybridů první filiální generace (F_1) nesoucích pravděpodobně 19 trivalentů a analýzou jejich potomstva zjistili, že do další generace jsou přednostně předávány menší, nezfúzované, chromozomy. Analýza F_{23} pak ukázala, že byly velké

chromozomy z genomu zcela eliminovány. Ačkoli autoři výsledky vysvětlují působením selekce, Bureš a Zedek (2014) se domnívají, že jde o experimentální potvrzení meiotického drivu, jehož vlivem docházelo k preferenčnímu přenosu malých chromozomů do další generace.

Podobný experiment lze provést s mutančními liniemi bourců nesoucími chromozomální aberace. Domestikovaná linie druhu *Bombyx mori* ztratila v průběhu domestikace schopnost přežít volně v přírodě, a tudíž je zcela závislá na člověku, který využívá jejích kokonů pro výrobu hedvábí (Nakamura a kol. 1999). Naopak morfologicky podobný bourec *B. mandarina* žije volně v přírodě ve východní Asii (Kawaguchi 1928 citovaný v Banno a kol. 2004). Vzhledem k tomu, že hybridní potomstvo těchto dvou druhů je normálně fertillní, předpokládá se, že *B. mandarina* je původním druhem domestikovaného *B. mori*. Navíc se počet chromozomů *B. mori* $2n = 56$ shoduje s počtem chromozomů divokého *B. mandarina*. To však platí pouze pro *B. mandarina* obývajícího Čínu. Populace v oblasti Japonska totiž mají počet chromozomů $2n = 54$ (Nakamura a kol. 1999). Tento rozdíl v počtu chromozomů odlišující geografické populace druhu *B. mandarina* vznikl v důsledku fúze chromozomů 14 a 27 (Banno a kol. 2004; K. Sahara nepublikované výsledky). V různých chovech ovšem existují i různé mutanční linie domácího *B. mori*. V této práci byla testována linie *B. mori* r50. Jde o linii bourců, u níž došlo k translokaci chromozomu 23 a chromozomu 25 a vznikl tak jeden velký chromozom. Chromozomální aberace T(23;25) je v chovu udržována prostřednictvím křížení, při kterém se využívá jako markerů recesivních mutančních fenotypů vázaných na chromozomy 23 a 25, jmenovitě jde o tub ("tubby"), který se v homozygotním stavu projevuje krátkým thoraxem a silným abdomenem a oy ("y-translucent") projevující se v homozygotním stavu průsvitnou pokožkou larev. Samice nesoucí translokaci v heterozygotním stavu T(23;25)/+, +/tub +/oy je tedy křížena se samcem bez této aberace +, tub oy (Banno a kol. 1993). Při meióze tak dochází místo tvorby bivalentu k vytváření trivalentu, jenž sestává právě z velkého translokovaného chromozomu T(23;25) a k němu dvěma homologními chromozomům 23 a 25 (Banno a kol. 1993).

S cílem provést analýzu potomstva heterozygotního hybridu získaného zkřížením mutanční linie *B. mori*, nesoucí translokaci T(23;25) v heterozygotním stavu (Banno a kol. 1993), a japonské linie *B. mandarina*, nesoucí fúzi F(14;27) (Banno a kol. 2004; K. Sahara nepublikované výsledky), jsem v této práci otestovala jejich karyotypy pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace s telomerickou sondou (TTAGG)_n. Metodu FISH s užitím telomerické sondy jsem vybrala proto, abych byla schopna u druhu *B. mori* detekovat ve stádiu pachytene trivalent tvořený translokovaným chromozomem T(23;25) a dvou k němu

homologních chromozomů 23 a 25 (Obr. 4a). FISH s telomerickou sondou potvrdila přítomnost trivalentu. Translokace v heterozygotním stavu byla také potvrzena lichým počtem mitotických chromozomů $2n = 55$ a přítomností velkého nepárového chromozomu v mitotickém metafázním komplementu (Obr. 4b). Při testování druhého druhu *B. mandarina* jsem pozorovala počet chromozomů $2n = 54$, což odpovídá očekávanému počtu za přítomnosti chromozomální fúze F(14;27).

Navazující výzkum bude v testování samičího meiotického drivu u motýlů pokračovat. Křížením bude připraven heterozygot nesoucí chromozomální přestavby T(23;25) a F(14;27). Pro křížení použiji mnou ověřené mutantní linie *Bombyx mori* r50 a *B. mandarina* lišící se dvěma chromozomálními aberacemi. Pro detekci těchto aberací se v budoucnu pokusím identifikovat inserce a delece specifické pro jednotlivé linie a chromozomy, které bude možné jednoznačně detekovat pomocí PCR i v heterozygotním stavu. Zkřížením samice japonského druhu *Bombyx mandarina* homozygotní pro fúzi F(14;27) se samcem mutantní linie *B. mori* r50 heterozygotním pro translokaci T(23;25)/+ vznikne potomstvo heterozygotní pro obě chromozomální aberace T(23;25)/+ F(14;27)/+ a potomstvo heterozygotní pouze pro F(14;27)/+. Z této F1 generace budou pomocí PCR vybrány pouze samice heterozygotní pro obě chromozomální aberace. Ty budou následně kříženy se samcem *B. mori* divokého typu. Z tohoto křížení budou vznikat čtyři různé genotypy, které budou identifikovány prostřednictvím PCR a ověřeny FISH s chromozomálně specifickými markery. Pokud se poměr genotypů v potomstvu bude lišit odočekávaných štěpných poměrů, například ve prospěch velkých aberantních chromozomů, nebo naopak malých neaberantních chromozomů, lze předpokládat, že k fixaci chromozomálních přestaveb u motýlů může docházet působením samičího meiotického drivu způsobeného samičí asymetrickou meiózou.

6. Souhrn

Ve své práci jsem se zabývala testováním holokinetického drivu u motýlů. Jedním z hlavních cílů bylo otestovat negativní korelaci mezi počtem chromozomů a velikostí genomu predikovanou pro organizmy s holokinetickými chromozomy. Velikost genomu vybraných druhů motýlů jsem měřila pomocí metody průtokové cytometrie, jejíž protokol se mi podařil úspěšně optimalizovat. Abych měla větší množství dat pro zamýšlenou korelační analýzu, přidala jsem k mnou studovaným druhům také druhy, u nichž byly informace o velikosti genomu a počtu chromozomů dostupné z literatury. Pro nejrepresentativněji zastoupenou čeleď Pieridae a následně pro všechna dostupná data jsem provedla korelační analýzu, jejímž výsledkem byla v obou případech pozitivní korelace [$r(8) = 0,687$, $P < 0,05$ respektive $r(30) = 0,602$, $P < 0,01$] mezi počtem chromozomů a velikostí genomu. Tento závěr je v rozporu s predikovanou negativní korelací, která je očekávána v případě působení holokinetického drivu.

Mým druhým cílem bylo ověřit přítomnost chromozomálních aberací u mutantních linií *Bombyx mori* r50 a japonské *B. mandarina*. Pomocí tzv. “spreading” metody jsem z buněk testes obou jedinců připravila chromozomální preparáty, které jsem hybridizovala s telomerickou sondou metodou fluorescenční *in situ* hybridizace. Inspekce naznačených chromozomálních preparátů u druhu *B. mori* potvrdila přítomnost translokovaného chromozomu T(23;25) v heterozygotním stavu. Výskyt translokace byl také potvrzen lichým počtem chromozomů $2n = 55$. Mutantní linie *B. mandarina*, nesoucí fúzi F(14;27), vykazovala očekávaný počet chromozomů $2n = 54$. Jelikož lze tyto linie křížit, jsou vhodné pro budoucí testování samičího meiotického drivu prostřednictvím analýzy potomstva jejich hybrida heterozygotního pro obě chromozomální aberace.

7. Literatura

- Ahola V, Lehtonen R, Somervuo P, Salmela L, Koskinen P a kol. (2014) The Glanville fritillary genome retains an ancient karyotype and reveals selective chromosomal fusions in Lepidoptera. *Nature Communications* **5**: 4737.
- Albertson DG, Thomson JN (1993) Segregation of holocentric chromosomes at meiosis in the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Chromosome Research* **1**: 15-26.
- Banno Y, Kawaguchi Y, Koga K, Doira H (1993) Cytogenetical analysis of chromosomal aberration due to translocation between the 23rd and 25th linkage groups in the silkworm, *Bombyx mori*. *Hereditas* **118**: 259-263.
- Banno Y, Kawaguchi Y, Koga K, Doira H (1995) Postreductional meiosis revealed in males of mutant with chromosomal aberration „T(23;25)Nd“ of the silkworm *Bombyx mori*. *Journal of Sericulture Science of Japan* **64**: 410-414.
- Banno Y, Nakamura T, Nagashima E, Fujii H, Doira H (2004) M chromosome of the wild silkworm, *Bombyx mandarina* (n = 27), corresponds to two chromosomes in the domesticated silkworm, *Bombyx mori* (n = 28). *Genome* **47**: 96-101.
- Baxter SW, Davey JW, Johnston JS, Shelton AM, Heckel DG a kol. (2011) Linkage Mapping and Comparative Genomics Using Next-Generation RAD Sequencing of a Non_Model Organism. *PLoS ONE* **6**: e19315.
- Bongiorni S, Fiorenzo P, Pippoletti D, Prantera G (2004) Inverted meiosis and meiotic drive in mealybugs. *Chromosoma* **112**: 331-341.
- Brown KS, Emmel TC, Eliazar PJ, Suomalainen E (1992) Evolutionary patterns in chromosome numbers in neotropical Lepidoptera. I. Chromosomes of the Heliconiini (Family Nymphalidae: Subfamily Nymphalinae). *Hereditas* **117**: 109-125.
- Brown KS, von Schoultz B, Saura AO, Saura A (2012) Chromosomal evolution in the South American Riodinidae (Lepidoptera: Papilionoidea). *Hereditas* **149**: 128-138.
- Brown KS, von Schoultz B, Suomalainen E (2004) Chromosome evolution in Neotropical Danainae and Inthomiinae (Lepidoptera). *Hereditas* **141**:216-36.
- Buckler ES, Phelps-Durr TL, Buckler CS, Dawe RK, Doebley JF a kol. (1999) Meiotic drive of chromosomal knobs reshaped the maize genome. *Genetics* **153**: 415-426.
- Buntrock L, Marec F, Krueger S, Traut W (2012) Organ growth without cell division: somatic polyploidy in a moth, *Ephestia kuehniella*. *Genome* **55**: 755-763.
- Bureš P, Zedek F (2014) Holokinetic drive: centromere drive in chromosomes without centromeres. *Evolution* **68**: 2412-2420.

- Bureš P, Zedek F, Marková M (2013) Holocentric chromosomes. In: Leitch IJ, Greilhuber J, Doležel J, Wendel J (eds) *Plant Genome Diversity Volume 2: Physical Structure, Behaviour and Evolution of Plant Genomes*. Springer Verlag, Wien, 187-208.
- Canapa A, Barucca M, Biscotti MA, Forconi M (2015) Transposons, genome size, and evolutionary insights in animals. *Cytogenetic and Genome Research* **147**: 217-239.
- Cong Q, Shen J, Borek D, Robbins RK, Otwinowski Z a kol. (2016) Complete genome of Hairstreak butterflies, their speciation, and nucleo-mitochondrial inkongruence. *Scientific Reports* **6**: 24863.
- Darlington CD (1937) *Recent Advances in Cytology*. London. 2nd ed., 671 pp
- de Bigliardo GR, Virla EG, Carol S, Dasso SM (2010) Karyotype and male pre-reductional meiosis of the sharpshooter *Tapajosa rubromarginata* (Hemiptera: Cicadellidae). *Revista de Biología Tropical* **59**: 309-314.
- de Prins J, Saitoh K (2003) Karyology and sex determination. In: Kristensen NP (ed.) *Lepidoptera, moths and butterflies: Morphology, physiology, and development*. Walter de Gruyter, Berlin, Germany, 449-468.
- de Villena FPM, Sapienza C (2001) Female meiosis drives karyotypic evolution in mammals. *Genetics* **159**: 1179-1189.
- Dej KJ, Orr-Weaver TL (2000) Separation anxiety at the centromere. *Trends in Cell Biology* **10**: 392-299.
- Drinnenberg IA, deYoung D, Henikoff S, Malik HS (2014) Recurrent loss of CenH3 is associated with independent transitions to holocentricity in insects. *eLife* **3**:e03676.
- Efstratiadis A, Crain WR, Britten RJ, Davidson EH, Kafatos FC (1976) DNA Sequence Organization in the Lepidopteran *Antheraea pernyi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **73**: 2289-2293.
- Emmons SW (1988) The genome. In: Wood WB (ed) *The nematode *Caenorhabditis elegans**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 47-79.
- Escudero M, Maquilla E, Loureiro J, Castro M, Castro S a kol. (2015) Genome size stability despite high chromosome number variation in *Carex gr. laevigata*. *American Journal of Botany* **102**: 233-238.
- Fedorov AA (ed.) (1969) *Chromosome numbers of flowering plants*. Nauka, Leningrad, 926 pp.
- Flach M (1966) Diffuse centromeres in a dicotyledonous plant. *Nature* **209**: 1369-1370.

- Franclemont JG (1980) „Noctua-C-Nigrum“ In Eastern North America, The Description Of two New Species Of Xestia Hubner (Lepidoptera, Noctuidae, Noctuinae). *Proceedings of The Entomological Society of Washington* **82**: 576-586.
- Freeman HA (1969) Systematic review of the Megathymidae. *Journal of the Lepidopterists' Society* **23**: 1-58.
- Fukagawa T, Earnshaw WC (2014) Neocentromeres. *Current Biology* **24**: R946-R947.
- Fuková I, Nguyen P, Marec F (2005) Codling moth cytogenetics: karyotype, chromosomal location of rDNA, and molecular differentiation of sex chromosomes. *Genome* **48**: 1083-1092.
- Gage LP (1974) The *Bombyx mori* genome: analysis by DNA reassociation kinetics. *Chromosoma* **45**: 27-42.
- Gassner G, Klemetson DJ (1974) A transmission electron microscope examination of hemipteran and lepidopteran gonial centromeres. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **16**: 457-464.
- Glaser RW (1917) The growth of insect blood cells in vitro. *Psyche* **24**: 1-7.
- Godward MDE (1954) The 'diffuse' centromere or polycentric chromosomes in *Spirogyra*. *Annals of Botany* **70**: 143-156.
- Goldsmith MR, Marec F (2010) Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 368 pp.
- Gregory TR, Hebert PDN (2003) Genome size variation in lepidopteran insects. *Canadian Journal of Zoology* **81**: 1399-1405.
- Gregory TR (2017) Animal Genome Size Database. <http://www.genomesize.com>.
- Greilhuber J (2007) Cytochemistry and C-values: The less-well-known world of nuclear DNA amounts. *Annals of Botany* **101**: 791-804.
- Guerra M (2016) Agmatoploidy and symploidy: a critical review. *Genetics and Molecular Biology* **39**: 492-496.
- Guerra M, Cabral G, Cuacos M, Gonzálet-García M, González-Sánchez a kol. (2010) Neocentrics and holokinetics (holocentrics): Chromosomes out of the centromeric rules. *Cytogenetic and Genome Research* **129**: 82-96.
- Gupta PK (2005) Cell and Molecular Biology. Rastogi Publications, 942 pp.
- Haizel T, Lim YK, Leitch AR, Moore G (2005) Molecular analysis of holocentric centromeres of *Luzula* species. *Cytogenetic and Genome Research* **109**: 134-143.
- Hanrahan SJ, Johnston JS (2011) New genome estimates of 134 species of arthropods. *Chromosome Research* **19**: 809-823.

- Henikoff S, Ahmad K, Malik HS (2001) The centromere paradox; stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science* **293**: 1098-1102.
- Choo KH, Vissel B, Nagy A, Earle E, Kalitsis P (1991) A survey of the genomic distribution of alpha satellite DNA on all the human chromosomes, and derivation of a new consensus sequence. *Nucleic Acids Research* **19**: 1179-82.
- Chung KS, Hipp AL, Roalson EH (2012) Chromosome number evolves independently of genome size in a clade with nonlocalized centromeres (*Carex*: Cyperaceae). *Evolution* **66**: 2708-2722.
- International Silkworm Genome Consortium (2008) The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm, *Bomby mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **38**: 1036-1045.
- Jankowska M, Fuchs J, Klocke E, Fojtová M, Polanská P a kol. (2015) Holokinetic centromeres and efficient telomere healing enable rapid karyotype evolution. *Chromosoma* **124**: 519-528.
- Jiggins CD, Mavarez J, Beltran M, McMillan WO, Johnston JS a kol. (2005) A genetic linkage map of the mimetic butterfly *Heliconius melpomene*. *Genetics* **171**: 557-570.
- Kandul NP, Lukhtanov VA, Dantchenko DA, Coleman JWS, Sekercioglu C a kol. (2004) Phylogeny of *Agrodiaetus* Hübner 1822 (Lepidoptera: Lycaenidae) inferred from mtDNA Sequences of COI and COII and Nuclear Sequences of *EF1- α* : Karyotype Diversification and Species Radiation. *Systematic Biology* **53**: 278-298.
- Kandul NR, Lukhtanov VA, Pierce NE (2007) Karyotypic diversity and speciation in *Agrodiaetus* butterflies. *Evolution* **61**: 546-559.
- Kawaguchi E (1928) Zytologische Untersuchungen am Seidenspinner und seinen Verwandten. I. Gametogenese von *Bombyx mori* L. und *B. mandarina* M. und ihrer Bastard. *Zeitschrift für Zellforschung und mikroskopische Anatomie* **7**: 519-552.
- Kikudome GY (1959) Studies on the phenomenon of preferential segregation in maize. *Genetics* **44**: 815-831.
- King GC (1960) The cytology of the desmids: the chromosomes. *New Phytologist* **59**: 65-72.
- Li X, Fan D, Zhang W, Liu G, Zhang L a kol. (2015) Outbred genome sequencing and CRISPR/Cas9 gene editing in butterflies. *Nature Communications* **6**: 8212.
- Lipnerová I, Bureš P, Horová L, Šmarda P (2013) Evolution of genome size in *Carex* (Cyperaceae) in relation to chromosome number and genomic base composition. *Annals of Botany* **111**: 79-94.

- Lockwood APM (1961) “Ringer” solutions and some notes on the physiological basis of their ionic composition. *Comparative Biochemistry and Physiology* **2**: 241-289.
- Lukhtanov VA (2014) Chromosome number evolution in skippers (Lepidoptera, HesperIIDae). *Comparative Cytogenetics* **8**: 275-291.
- Lukhtanov VA (2015) The blue butterfly *Polyommatus* (Plebicula) *atlanticus* (Lepidoptera, Lycaenidae) holds the record of the highest number of chromosomes in the non-polyploid eukaryotic organisms. *Comparative Cytogenetics* **9**: 683-690.
- Lukhtanov VA, Dincă V, Talavera G, Vila R (2011) Unprecedented within-species chromosome number cline in the wood white butterfly *Leptidea sinapis* and its significance for karyotype evolution and speciation. *BMC Evolutionary Biology* **11**: 109.
- Lukhtanov VA, Kandul NP, Plotkin JB, Dantchenko AV, Haig D a kol. (2005) Reinforcement of pre-zygotic isolation and karyotype evolution in *Agrodiaetus* butterflies. *Nature* **436**: 385-389.
- Malik HS, Henikoff S (2009) Major evolutionary transitions in centromere complexity. *Cell* **138**: 1067-1082.
- Mandrioli M, Manicardi GC (2012) Unlocking holocentric chromosomes: New perspectives from comparative and functional genomics? *Current Genomics* **13**: 343-349.
- Marec F (1990) Genetic control of pest Lepidoptera: Induction of sex-linked recessive lethal mutations in *Ephestia kuehniella* (Pyralidae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca* **87**: 445-458.
- Marec F (1996) Synaptonemal complexes in insects. *International Journal of Insect Morphology & Embryology* **25**: 205-233.
- Marec F, Tothová A, Sahara K, Traut W (2001) Meiotic pairing of sex chromosome fragments and its relation to atypical transmission of sex-linked marker in *Ephestia kuehniella* (Insecta: Lepidoptera). *Heredity* **87**: 659-671.
- McClintock B (1939) The behavior in successive nuclear divisions of a chromosome broken at meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **25**: 405-416.
- McDermott SR, Noor MAF (2010) The role of meiotic drive in hybrid male sterility. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **365**: 1265-1272.

- Mediouni J, Fuková I, Frydrychová R, Dhouibi MH, Marec F (2004) Karyotype, sexchromatin and sex chromosome differentiation in the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae). *Caryologia* **57**: 184-94.
- Melters D, Bradnam KR, Young HA, Telis N, May MR a kol. (2013) Comparative analysis of tandem repeats from hundreds of species reveals unique insights into centromere evolution. *Genome Biology* **30**: R10.
- Melters D, Paliulis L, Korf I, Chan S (2012) Holocentric chromosomes: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. *Chromosome Research* **20**: 579-593.
- Mieczkowski PA, Lemoine FJ, Petes TD (2006) Recombination between retrotransposons as a source of chromosome rearrangements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* **5**: 1010-1020.
- Mola LM, Papeschi AG (2006) Holokinetic chromosomes at a glance. *Journal of Basic and Applied Genetics* **17**: 17-33.
- Nagaraju J, Jolly MS (1986) Interspecific hybrids of *Antheraea roylei* and *A. pernyi* - cytogenetic reassessment. *Theoretical and Applied Genetics* **72**: 269-273.
- Nachman MW, Searle JB (1995) Why is the house mouse karyotype so variable? *Trends in Ecology & Evolution* **10**: 397-402.
- Nakamura T, Banno Y, Nakada T, Nho SK, Xü MK a kol. (1999) Geographic dimorphism of the wild silkworm, *Bombyx mandarina*, in a chromosome number and the occurrence of the a retroposon-like insertion in the arylphorin gene. *Genome* **42**: 1117-1120.
- Neumann P, Navrátilová A, Schroeder-Reiter E, Koblížková A, Steinbauerová V a kol. (2012) Stretching the rules: monocentric chromosomes with multiple centromere domains. *PLoS Genetics* **8**: e1002777.
- Nguyen P, Carabajal Paladino L (2016) On the neo-sex chromosomes of Lepidoptera. In: Pontarotti P (ed.): *Evolutionary Biology: Convergent Evolution, Evolution of Complex Traits, Concepts and Methods*. Springer, Heidelberg, 171-185.
- Nguyen P, Sahara K, Yoshido A, Marec F (2010) Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica* **138**: 343-354.
- Nguyen P, Sýkorová M, Šichová J, Kůta V, Dalíková M a kol. (2013) Neo-sex chromosomes and adaptive potential in tortricid pests. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 6931-6936.
- Nordenskiöld H (1963) A study of meiosis in the progeny of X-irradiated *Luzula purpurea*. *Hereditas* **49**: 33-47.
- Novitski E (1967) Nonrandom disjunction in *Drosophila*. *Annual Review of Genetics* **1**: 71-86.

- Pacchierotti F, Tiveron C, Mailhes JB, Davisson MT (1995) Susceptibility to Vinblastine-induced aneuploidy and preferential chromosome segregation during meiosis I in Robertsonian heterozygous mice. *Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis* **15**: 217-230.
- Pazy B, Plitmann U (1994) Holocentric chromosome behaviour in *Cuscuta* (Cuscutaceae). *Plant Systematics and Evolution* **191**: 105-109.
- Pérez R, Panzera F, Page J, Suja JA, Rufas JS (1997) Meiotic behaviour of holocentric chromosomes: orientation and segregation of autosomes in *Triatoma infestans* (Heteroptera). *Chromosome Research* **5**: 47-56.
- Petitpierre E (1996) Molecular cytogenetics and taxonomy of insects, with particular reference to the Coleoptera. *International Journal of Insect Morphology & Embryology* **25**: 115-133.
- Plohl M, Meštrović N, Mravinac B (2014) Centromere identity from the DNA point of view. *Chromosoma* **123**: 313-325.
- Pokorná M, Altmanová M, Kratochvíl L (2014) Multiple sex chromosomes in the light of female meiotic drive in amniote vertebrates. *Chromosome Research* **22**: 35-44.
- Presgraves DC (2002) Patterns of postzygotic isolation in Lepidoptera. *Evolution* **56**: 1168-1183.
- Rieder CL, Cole RW (1998) Entry into mitosis in vertebrate somatic cells is guarded by a chromosome damage checkpoint that reverses the cell cycle when triggered during early but not late prophase. *Journal of cell biology* **142**: 1013-1022.
- Rieder CL, Salmon ED (1998) The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. *Trends in Cell Biology* **8**: 310-318.
- Roalson E (2008) A synopsis of chromosome number variation in the Cyperaceae. *Botanical Review* **74**: 209-393.
- Roalson E, McCubbin AG, Whitkus R (2007) Chromosome evolution in Cyperales. In: Columbus JT, Friar EA, Porter JM, Prince LM, Simpson MG (eds.) *Monocots: comparative biology and evolution of Poales*. Allen, Claremont, 62-71.
- Robinson R (1971) *Lepidoptera Genetics*. Pergamon Press, Oxford, 698 pp.
- Sadhotra M, Tripathi NK (2010) A chromosomal investigation of three species of *Papilio* (Papilionidae: Lepidoptera). *Asian Journal of Biological Sciences* **5**: 102-105.
- Sahara K, Marec F, Traut W (1999) TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Research* **7**: 449-460.

- Sandler L, Novitski E (1957) Meiotic drive as an evolutionary force. *American Naturalist* **91**: 105-110.
- Saura A, von Schoultz B, Saura AO, Brown KS (2013) Chromosome evolution in Neotropical butterflies. *Heredity* **150**: 26-37.
- Sheikh SA, Kondo K, Hoshi Y (1995) Study of diffused centromeric nature of *Drosera* chromosomes. *Cytologia* **60**: 43-47.
- Shu H, Wildhaber T, Siretskiy A, Gruissem W, Hennig L (2012) Distinct modes of DNA accessibility in plant chromatin. *Nature Communication* **3**: 1281.
- Schrader F (1935) Notes on the mitotic behaviour of long chromosomes. *Cytologia* **6**: 422-430.
- Schultz HJ, Traut W (1979) The pachytene complement of the wildtype and a chromosome mutant strain of the flour moth, *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). *Genetica* **50**: 61-66.
- Sigmundová M (1997) Studium organizace chromatinových smyček synaptonemálních komplexů motýlů v závislosti na velikosti genomu. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta, České Budějovice.
- Song W, Cao LJ, Wang YZ, Li BY, Wei SJ (2016) Novel microsatellite markers for the oriental fruit moth *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae) and effect of null alleles on population genetics analyses. *Bulletin of Entomological Research* doi: 10.1017/S0007485316000936.
- Suomalainen E (1953) The kinetochore and the bivalent structure in the Lepidoptera. *Hereditas*, **39**: 88-96.
- Šíchová J, Voleníková A, Dincă V, Nguyen P, Vila R a kol. (2015) Dynamic karyotype evolution and unique sex determination system in *Leptidea* wood white butterflies. *BMC Evolutionary Biology* **15**: 89.
- Tanaka N, Tanaka N (1979) Chromosome studies in *Chionographis* (Liliaceae). II. Morphological characteristics of the somatic chromosomes of four Japanese members. *Cytologia* **44**: 935-949.
- Taylor M, Zawadzki J, Black B, Kreitman M (1993) Genome size and endopolyploidy in pyrethroid-resistant and susceptible strains of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of Economic Entomology* **86**: 1030-1034.
- Thompson SL, Bakhoun SF, Compton DA (2010) Mechanisms of chromosomal instability. *Current Biology* **20**: R285-95.
- Tobler A, Kapan D, Flanagan NS, Gonzalez C, Peterson E a kol. (2005) First-generation linkage map of the warningly colored butterfly *Heliconius erato*. *Heredity* **94**: 408-417.

- Traut W (1976) Pachytene mapping in the female silkworm, *Bombyx mori* L. *Chromosoma* **58**: 275-284.
- Traut W, Sahara K, Marec F (2007) Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sexual Development* **1**: 332-346.
- Treangen TJ, Salzberg SL (2012) Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Nature Reviews Genetics* **13**: 36-46.
- van Nieuwerkerken EJ, Kaila L, Kitching IJ, Kristensen NP, Lees DC a kol. (2011) Order Lepidoptera Linnaeus. In: Linnaeus (1758) *Animal Biodiversity: An Outline of Higher-level Classification and Survey of Taxonomic Richness*. Zootaxa.
- Van't Hof A, Marec F, Saccheri I, Brakefield P, Zwaan B (2008). Cytogenetic characterization and AFLP-based genetic linkage mapping for the butterfly *Bycyclus anynana*, covering all 28 karyotyped chromosomes. *PLoS ONE* **3**: e3882.
- Walters J, Mongue AJ (2016) A neo-sex chromosome in the Monarch butterfly, *Danaus plexippus*. bioRxiv. doi: 10.1101/036483.
- Wolf KW (1994) The unique structure of lepidopteran spindles. *International Review of Cytology* **152**: 1-48.
- Wolf KW (1996) The structure of condensed chromosomes in mitosis and meiosis of insects. *International Journal of Insect Morphology and Embryology* **25**: 37-62.
- Wrensch DL, Kethley JB, Norton RA (1994) Cytogenetics of holokinetic chromosomes and inverted meiosis: keys to the evolutionary success of mites, with generalizations on eukaryotes. In: Houck MA (Ed.), *Mites: Ecological and evolutionary analyses of life history patterns*. Chapman and Hall, New York, 282-343.
- Yasukochi Y, Tanaka-Okuyama M, Kamimura M, Nakano R, Naito Y a kol. (2011) Isolation of BAC Clones Containing Conserved Genes from Libraries of Three Distantly Related Moths: Genomics of Lepidoptera. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 165894, 6.
- Yoshida K, Kitano J (2012) The contribution of female meiotic drive to the evolution of neo-sex chromosomes. *Evolution* **66**: 3198-3208.
- Yoshido A, Marec F, Sahara K (2005) Resolution of sex chromosome constitution by genomic *in situ* hybridization and fluorescence *in situ* hybridization with (TTAGG)_n telomeric probe in some species of Lepidoptera. *Chromosoma* **114**: 193-202.
- Yoshido A, Sahara K, Marec F, Matsuda Y (2011). Step-by-step evolution of neo-sex chromosomes in geographical populations of wild silkmths, *Samia cynthia ssp.* *Heredity* **106**: 614-624.

Zedek F (2013) Evolution of holocentric chromosomes and karyotypes. Disertační práce.
Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, Brno.