

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Mapování fragmentu chromosomu Z v ASF-liniích zavíječe
moučného, *Ephestia kuehniella***

Diplomová práce

Bc. Dagmar Voříšková

Školitel: RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D.

Školitel specialista: RNDr. Martina Dalíková, Ph.D.; Sander Visser, MSc.

České Budějovice 2018

Voříšková D. (2018) Mapování fragmentu chromosomu Z v ASF-liniích zavíječe moučného, *Ephestia kuehniella*. [Mapping of a Z chromosome fragment in *Ephestia kuehniella* ASF lines, Mgr. Thesis, in Czech] 39 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

This study is focused on mapping of the genetic content of Z^{dz+} fragments which can be found in four lines of the Mediterranean flour moth (*Ephestia kuehniella*). Data from qPCR showed that only one out of six tested genes is located on this fragment. Fluorescent in situ hybridization demonstrated that in three out of four lines the Z^{dz+} fragment independently fused with the W chromosome. This chromosomal rearrangement is also reflected in the morphology of the sex chromatin.

Finanční podpora:

Tato práce byla financována z grantu Grantové agentury České republiky reg. č. 17-13713S.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 12. 12. 2018

.....
vlastnoruční podpis

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé diplomové práce RNDr. Magdě Zrzavé, Ph.D. za pomoc od hledání tématu až po zpracování do finální podoby, svým konzultantům: RNDr. Martině Dalíkové, Ph.D. za naprosto všestranné rady v každém ohledu a Sanderu Visserovi, MSc. za pomoc především praktického, logistického a v neposlední řadě komunikačního rázu. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Irence Provazníkové za pomoc kdykoli to bylo třeba, ale hlavně, když se to jevílo prakticky nemožné. Za motivaci děkuji prof. RNDr. Františku Marecovi, CSc., a více než vlídný přístup, který je spolu s odborností duchem laboratoře, v níž jsem měla tu čest trávit poslední roky. Ačkoli sem nemohu vypsát všechny, za jejichž pomoc jsem velice vděčná, ráda bych poděkovala jak výše zmíněným tak těm, na které se nedostalo za ochotu, čas a hlavně trpělivost.

OBSAH

1. Úvod	1
1.1. Pohlavní chromosomy motýlů.....	1
1.1.1. Sex chromatin	2
1.2. Determinace pohlaví.....	3
1.3. Zavíječ moučný (<i>Ephestia kuehniella</i>)	3
1.3.1. ASF-linie	4
2. Cíle práce.....	7
3. Materiál a metody.....	8
3.1. Materiál.....	8
3.2. Izolace DNA	8
3.2.1. Izolace pomocí NucleoSpin DNA Insect kit	8
3.2.2. Izolace DNA pomocí CTAB	9
3.3. Izolace RNA	9
3.3.1. Příprava cDNA	10
3.4. Příprava preparátů.....	11
3.4.1. Chromosomální preparáty	11
3.4.2. Preparáty interfázních jader z Malpighiho žláz.....	11
3.5. Příprava hybridizačních sond	12
3.5.1. Klonování	12
3.5.2. Značení pomocí nick translace	13
3.5.3. Značení pomocí kitu WGA	14
3.5.4. Random priming	14
3.6. qPCR.....	15
3.7. FISH	17
3.7.1. TSA FISH.....	18

3.7.2. Přímá FISH.....	19
4. Výsledky.....	21
4.1. Sex chromatin.....	21
4.2. qPCR.....	22
4.3. Výsledky hybridizace <i>in situ</i>	24
4.3.1. Detekce části fragmentu Z^{dz+} tvořené částí chromosomu W.....	25
4.3.2. Lokalizace genů přítomných na Z^{dz+} fragmentu TSA-FISH.....	26
5. Diskuse.....	28
5.1. qPCR.....	28
5.2. Sex chromatin.....	28
5.3. Fúze fragmentu.....	29
6. Závěr.....	31
Literatura.....	32
Seznam zkratk.....	36
Seznam tabulek.....	36
Seznam obrázků.....	37
Přílohy.....	38

1. Úvod

1.1. Pohlavní chromosomy motýlů

Motýli (Lepidoptera) jsou po řádu brouků druhý druhově nejpočetnější řád ve třídě hmyzu a zároveň tvoří největší skupinu, kde heterogametickým pohlavím jsou samice (Traut et al. 2007). Většina zástupců tohoto řádu má systém pohlavních chromosomů *Abraxas*, tedy WZ u samice a ZZ u samce (Sahara et al. 2012), ovšem najdou se i výjimky, kde může být více chromosomů Z (nejvíce je zatím zjištěno šest – Šíchová et al. 2016), více chromosomů W (nejvíce jsou zatím zjištěny čtyři – Šíchová et al. 2015) anebo žádný chromosom W (tedy systém ZZ pro samce a Z0 pro samice) (Marec et al. 2010). Obdobný způsob chromosomální determinace pohlaví (tedy, že heterogametické pohlaví je samice a homogametičtí jsou samci) má kromě motýlů i jejich příbuzná skupina chrostíci, což vede k předpokladu, že tento systém získali od svého společného předka před více než 180 miliony let (Grimaldi & Engel 2005, Kaiser & Bachtrog 2010, Kristensen & Skalski 1999, Misof et al. 2014). Naopak jsou známy i druhy, u nichž se chromosom W ztratil druhotně (Marec et al. 2010).

Chromosom W je u většiny zkoumaných druhů složen převážně z konstitutivního heterochromatinu (Traut et al. 2007). Tento chromosom je tvořen z velké části repetitivní DNA, nejčastěji pak mobilními elementy (Abe et al. 1998, Abe et al. 2005a, Abe et al. 2005b), které se v průběhu evoluce často shromažďují na pohlavně specifických chromosomech, což podporují i studie na bourci morušovém, zavíječi moučném či obaleči jablečném (Abe et al. 2005b, Fuková et al. 2007, Traut et al. 2013). Dále zde lze najít tandemové repetice nebo mitochondriální DNA (Traut et al. 2013) a jen velice málo genů, které kódují proteiny (Gotter et al. 1999; Nagaraju et al. 2014).

Chromosom Z je spíše podobný autosomu, je tvořen převážně euchromatinem a nese mnoho genů, z nichž se mnoho exprimuje v testes (Arunkumar et al. 2009). Obsah chromosomu Z je u motýlů vysoce konzervovaný (Dalíková et al. 2017, Fraisse et al. 2017, Voleníková 2015), čehož bylo v této práci využito například při hledání vhodných genů pro qPCR.

U zavíječe moučného, který je předmětem této práce, je chromosom W kratší než chromosom Z a i přesto, že jsou chromosom W a Z vysoce diverzifikované, tvoří při meióze bivalenty. Nicméně bivalenty chromosomů Z a W jsou různé v závislosti na fázi meiózy, v níž se právě nachází. Nejprve se tyto chromosomy spojí pouze v jedné z telomerických (nebo telomeře blízkých) oblastí, vždy jen z jednoho konce. Dále se utvoří bivalent, v němž je většina chromosomu W již spárována na rozdíl od delšího chromosomu Z, který se následně obtáčí okolo kratšího chromosomu W (Marec & Traut 1994). Nakonec se délky obou chromosomů přizpůsobí buď vyrovnáním nebo upravením synapsí (Weith & Traut 1986), přičemž zatímco chromosom W si svou délku ponechává, chromosom Z se může zkrátit.

1.1.1. Sex chromatin

Ve vysoce polyploidních jádrech, která jsou přítomna například v Malpighiho tubicích, se u samic motýlů, které mají chromosom W, nachází heterochromatinové tělísko (Traut et al. 2007). Toto tělísko je tzv. sex chromatinem a je tvořeno mnohočetnými kopiemi chromosomu W (Traut et al. 1978). Dlouho se tento sex chromatin používal jako důkaz, že samice testovaného druhu mají chromosom W (Traut & Marec 1996). Tento typ indikace chromosomu W byl důležitý hlavně u druhů, z nichž se špatně shání materiál (Lukhtanov 2000). Nicméně tento způsob se ukázal jako nespolehlivý, protože ne všechny samice, které mají chromosom W, mají na preparátech přítomný sex chromatin, což je poměrně častý jev u druhů, u kterých došlo k fúzi chromosomu W s jiným chromosomem (Ennis, 1976, Traut et al. 1986, Vlašánek et al. 2017, Voleníková 2015). Heterochromatinové tělísko mohou tvořit i tzv. B chromosomy (deriváty chromosomů), ale toto tělísko se může nacházet u obou pohlaví (Voleníková, 2012).

Sex chromatin má u zavíječe moučného obvykle podobu jediného kulatého, hladkého tělíška (Marec et al. 2010). Tento tvar se může v důsledku možných mutací spojených s chromosomem W lišit, například může být toto tělísko větší, menší, tvarově deformované, neostře ohraničené nebo těchto tělíšek může být přítomné větší množství (obvykle při fúzi chromosomu W právě s chromosomem Z – Marec & Traut 1994) a ve vzácných případech může dokonce zcela chybět (například při fúzi chromosomu W s autozomem – Traut et al 1986).

1.2. Determinace pohlaví

Motýli mají systém chromosomálního určení pohlaví WZ/ZZ nebo Z0/ZZ, ale molekulární podstata v drtivé většině není známa. Jediný motýl, u kterého je již publikovaná znalost determinace pohlaví na molekulární úrovni, je bourec morušový, kde jsou za vývoj v samce či samici zodpovědné geny *masc* (masculinizer) a *fem* (feminizer). Gen *masc* se nachází na chromosomu Z a za přítomnosti funkčního sestřihu tohoto genu dojde k vývoji v samce. Na chromosomu W jsou geny pro piRNA, označované jako *fem*. Tato piRNA brání translaci mRNA genu *masc* prostřednictvím RNA interference. Dojde tedy k umlčení genu *masc* a vývoji jedince v samici (Kiuchi et al. 2014). U druhů motýlů, které nemají chromosom W, tento mechanismus být nemůže. Předpokládá se tedy, že se zde uplatňuje systém jako u octomilky *Drosophila melanogaster* prostřednictvím exprese genů zjišťujících poměr sad autosomů k počtu chromosomů X (octomilky mají systém pohlavních chromosomů XY). Pokud je tento poměr poloviční, jedná se o samce, zatímco pokud je počet sad autosomů shodný s počtem chromosomů X, bude se jedinec dále vyvíjet v samici (Pomiankowski et al. 2004). Chromosom Y nemá u *D. melanogaster* na determinaci pohlaví vliv. Podobně, i když ovšem některé druhy motýlů mají chromosom W, nemusí se tento chromosom nutně podílet na determinaci pohlaví, jak bylo ukázáno například u martináče pajasanového, *Samia cynthia* (Yoshido et al. 2016).

1.3. Zavíječ moučný (*Ephestia kuehniella*)

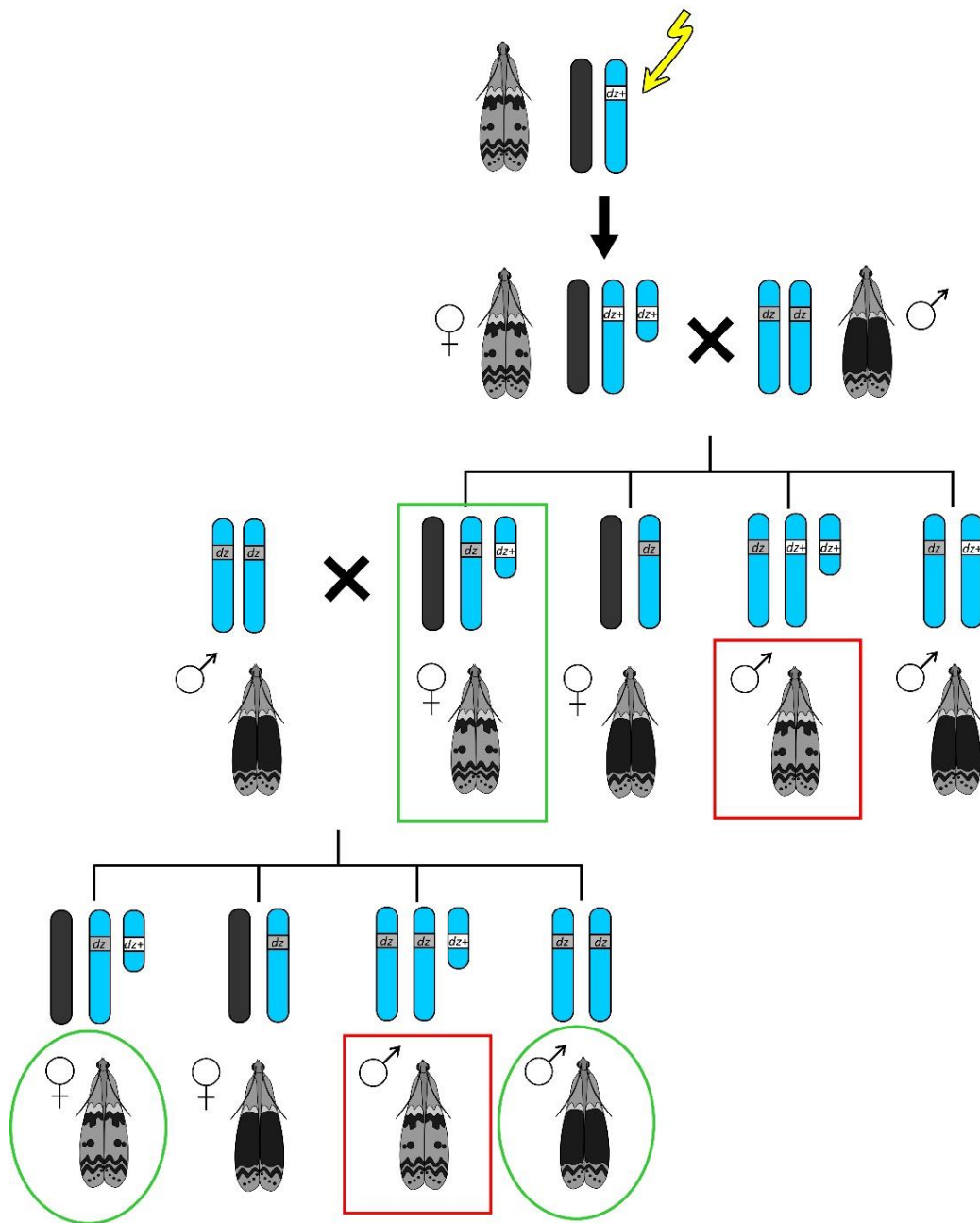
Zavíječ moučný se nachází především jako škůdce v mouce nebo u obilovin. Může se rozmnožovat rychlostí až pět generací za rok v závislosti na teplotě, pro rychlejší vývoj preferuje vyšší teploty (Severa et al. 2005), ale přežít dokáže v širším teplotním pásmu (Jacob et al. 1976).

V prostorách Entomologického ústavu Biologického centra Akademie Věd v Českých Budějovicích je kmenové centrum shromažďující linie zavíječe moučného s různými mutacemi a chromosomálními přestavbami. V těchto chovech se nachází i tzv. ASF-linie, které byly předmětem výzkumu pro tuto práci.

1.3.1. ASF-linie

Linie WT-C02 byla založena 17. 1. 2002 z části divoké populace odchycené v Boršově nad Vltavou u Českých Budějovic, její genotyp by měl být totožný se zavíječi, s nimiž je možné se setkat ve volné přírodě a fenotyp je standardní divoký, tedy šedá křídla s dvěma charakteristickými černě lemovanými bílými klikatými pruhy (Marec 1990). Koncem 80. let 20. století byly vytvořeny tzv. ASF-linie („abnormal segregating females“), jejichž cílem bylo získat linie zavíječe moučného nesoucí translokace chromosomu W a Z, což umožnilo produkovat samce nesoucí reciproké recesivní letální mutace na chromosomech Z pro biologickou kontrolu divokých populací zavíječe moučného (Marec & Mirchi, 1990). Působením gamma záření docházelo k polámání genomu a různým chromosomálním přestavbám například k vytvoření fragmentu Z^{dz+} (tedy derivátu chromosomu Z, často s navázanou částí chromosomu W), kterým se vyznačují právě ASF-linie. Vzhledem k tomu, že se tato práce zabývá fragmentem Z^{dz+} , bylo třeba vědět, který jedinec tímto fragmentem disponuje. Tento fakt se dá zjistit pomocí genu *dz* (dunkles Zentralfeld – Marec & Mirchi 1990), který se nachází na chromosomu Z a je součástí i fragmentu Z^{dz+} . Tento gen v recesivně homozygotním nebo hemizygotním stavu způsobuje změnu ve zbarvení křídel, kterou lze snadno rozpoznat jako tmavé pole uprostřed křídel. Linie *dz*, nesoucí recesivní mutaci *dz* v homozygotním nebo hemizygotním stavu, byla důležitá pro tvorbu ASF-linií, k jejichž vzniku došlo opakovaným křížením ozářené samice z divoké linie s *dz* samci, dokud z divoké linie nezbyl pouze Z^{dz+} fragment (zbytek genomu pocházel od linie *dz*).

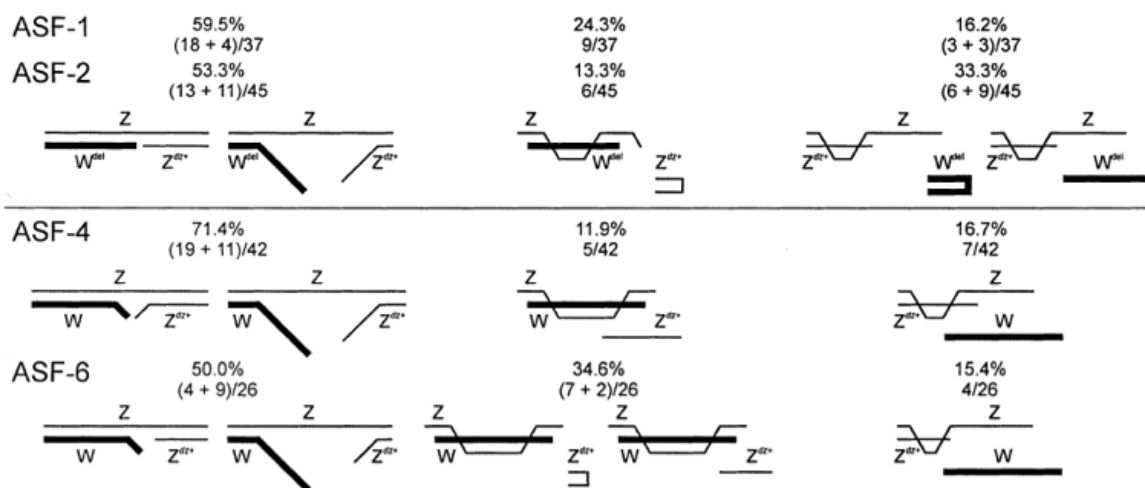
Popis přípravy ASF-linií a jejich udržování je uveden na následujícím obrázku (**Obr. 1**). U genu *dz* odlišujeme dvě alely – recesivní mutantní alelu *dz* (na obrázku šedá) a standardní dominantní alelu $dz+$ (na obrázku bílá). Při udržování ASF-linií se pro další generaci vybírají jen samice s fenotypem $dz+$ (tedy nositelky fragmentu Z^{dz+}) a samci s fenotypem *dz* (čili bez fragmentu Z^{dz+}). Tímto krokem je zabezpečeno, že ve filiální generaci budou z hlediska přítomnosti fragmentu Z^{dz+} jen čtyři typy potomků: samice s divokým fenotypem (tyto samice mají fragment Z^{dz+}), samice s tmavým blokem na křídlech (tyto samice nemají fragment Z^{dz+}), samci s divokým fenotypem (tito samci mají fragment Z^{dz+}) a samci s tmavou skvrnou na křídlech (tito samci nemají fragment Z^{dz+}), ovšem u dvou z těchto linií (ASF-1 a ASF-2) se samci s fragmentem Z^{dz+} nelíhnou.



Obr. 1 Tvorba a udržování ASF-linií *E. kuehniella*. Samice divokého fenotypu dz^+ byly ozářeny paprsky gamma a následně kříženy ony i jejich dcery se samci z linie dz . V současnosti jsou pro parentální generaci vybírány samice s fragmentem Z^{dz^+} , které lze poznat dle typického divokého fenotypu, a samci bez fragmentu Z^{dz^+} , tedy s tmavou oblastí na křídlech. Samci označení červeně se líhnou pouze v liniích ASF-4 a ASF-6, protože v liniích ASF-1 a ASF-2 (tzv. male-killing linie) nepřežijí embryonální fázi. Zeleně jsou pak označeni jedinci vybíráni pro páření k získání potřebného genotypu. Modře je vyznačen chromosom Z nebo fragment Z^{dz^+} , černě chromosom W. Šedivý proužek na chromosomu Z označuje recesivní alelu dz způsobující tmavé zbarvení křídel, bílý proužek dominantní standardní alelu dz^+ způsobující šedé zbarvení křídel. Obrázky poskytl Magda Zrzavá, informace z Marec & Mirchi 1990.

Tyto linie nemají klasickou mendelovskou dědičnost fragmentu Z^{dz^+} , a tím pádem rovnoměrné rozložení fenotypů dz^+ a dz ve fialiální generaci. To je způsobeno různým

párováním chromosomů W a Z spolu navzájem a s fragmentem Z^{dz+} , což vede k odlišným poměrům výsledných zděděných kombinací těchto tří komponent mezi potomky. Pro tuto práci byly použity čtyři ASF-linie. Linie ASF-1 a ASF-2 se vyznačují fragmentem Z^{dz+} složeného ze 40% chromosomu Z a části chromosomu W, přičemž samotný chromosom W je deletovaný asi o 20% oproti normálnímu chromosomu W. Ve více než polovině případů bylo pozorováno, že v těchto liniích tvoří tyto tři elementy (tedy chromosom Z, chromosom W a fragment Z^{dz+}) trivalenty (**Obr. 2**). Tyto dvě linie jsou embryonálně letální pro samce nesoucí Z^{dz+} fragment (Marec et al. 2001), tedy je zde předpoklad, že na Z^{dz+} fragmentu v těchto liniích se nachází faktor, který způsobuje smrt samčích embryí. V linii ASF-4 tvoří celý obsah Z^{dz+} fragmentu přibližně 50% chromosomu Z, chromosom W zde není deletovaný a chromosomy Z a W a fragment Z^{dz+} tvoří trivalenty v naprosté většině pozorovaných případů. Fragment Z^{dz+} v linii ASF-6 je tvořen přibližně 35% chromosomu Z a částí chromosomu W, přičemž samotný chromosom W není deletovaný a přestože i zde převládá procentuálně tvorba trivalentů, má tato linie největší počet pozorovaných univalentů fragmentu Z^{dz+} ze všech uvedených linií (Marec 1990, Marec & Traut 1993, Marec et al. 2001).



Obr. 2 Procentuální zastoupení variant kombinací párování chromosomálních elementů napříč ASF-liniemi, převzato z Marec et al. 2001

2. Cíle práce

Jedinci obou pohlaví ASF-linií zavíječe moučného nesou Z^{dz+} fragment, který je ovšem ve dvou z těchto linií (ASF-1 a ASF-2) příčinou letality samčích embryí (odsud název male-killing faktor), tedy u těchto linií nelze najít dospělé samce nesoucí tento fragment. V dalších zkoumaných liniích nemá tento fragment na životaschopnost samčích jedinců vliv (Marec et al. 2001). Cílem této práce je mapovat genetický obsah fragmentu Z^{dz+} ve vybraných liniích a přispět tak k odhalení podstaty samčí letality. Vlastní práce zahrnuje identifikaci ortologů pohlavně vázaných genů podle modelu bource morušového v osekvenovaném genomu zavíječe moučného, mapování vazby genů metodou qPCR (Nguyen et al. 2013), fyzické mapování genů metodou TSA-FISH (Carabajal Paladino et al. 2014) a mapování velikosti části chromosomu W ve fragmentu Z^{dz+} metodou FISH s W-specifickou sondou připravenou laserovou mikrodisekcí (Vítková et al. 2007).

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

K veškerým pokusům byli použiti jedinci z linií WT-C02, ASF-1, ASF-2, ASF-4 a ASF-6 zavíječe moučného, kteří byli chováni na umělé dietě za specifických podmínek (teplota 20 – 22 °C, fotoperioda 12 hodin „den“ / 12 hodin „noc“) dle Marec (1990) v laboratorních chovech.

3.2. Izolace DNA

K získání DNA pro další potřebu byly využity kukly nebo dospělí jedinci zavíječe moučného. Tato DNA byla využita jak pro qPCR tak pro přímou FISH. Pro izolaci potřebné DNA byly použity následující dvě metody.

3.2.1. Izolace pomocí NucleoSpin DNA Insect kit

Takto získaná DNA byla využita pro qPCR. K získání 50 µl DNA tímto způsobem byli z ASF-linií využiti dva dospělí samečci s fenotypem *dz* (s tmavým blokem na křídlech, tedy ti, kteří nemají fragment Z^{dz+}) nebo tři dospělé samičky divokého fenotypu (tedy ty, které mají fragment Z^{dz+}). U divoké linie WT-C02 byli přirozeně vybíráni jedinci s divokým fenotypem. V zadečcích samiček se nacházejí vajíčka s vysokým obsahem cytoplazmy na malé množství DNA, což by mělo za následek nižší čistotu DNA. Zároveň bylo potřeba mít jistotu, že nedojde ke kontaminaci samčí DNA, ke které by zpravidla došlo po oplodnění. Pro tyto důvody bylo potřeba většího množství samiček. Těmto samičkám byly odebírány zadečky a ke zpracování byl použit jen zbytek těla. Jako protokol postupu sloužil návod od výrobce NucleoSpin DNA Insect kit (Macherey-Nagel, Německo) s výjimkou použití sterilní MiliQ vody namísto komerčně dodávaného elučního pufu. Tento způsob izolace byl preferován zejména pro rychlost a jednoduchost. Po dokončení izolace byl vzorek získané DNA vizualizován pomocí gelové elektroforézy, přičemž bylo hodnoceno, zda je ve vzorku přítomno větší množství RNA a jestli není DNA fragmentovaná. Koncentrace a čistota získané DNA byla následně měřena na

spektrofotometru Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), případně na Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, Německo). K dalšímu použití sloužily vzorky s výslednou koncentrací vyšší než 5ng/μl skladované při -20°C.

3.2.2. Izolace DNA pomocí CTAB

Izolace DNA pomocí CTABu (Winnerpennickx et al. 1993) (Cetyl trimethylamonium bromid) byla metodou volby v případě potřeby vyšší. Takto byla získávána DNA ze samčích kulek divoké linie WT-C02 zavíječe moučného, která byla následně upotřebena jako kompetitivní DNA při FISH s W-specifickou malovací sondou ke snížení pravděpodobnosti vazby sondy na jiné chromosomy.

Kukly byly homogenizovány pomocí sterilních plastových tyčinek a byly inkubovány při 60°C přes noc v 0,8 ml extrakčního pufru. Složení extrakčního pufru bylo následující: 100mM Tris, 40mM EDTA o pH = 8,0, 2% CTAB, 0,2% merkaptoetanolu, 0,1 mg/ml Proteinázy K a 1,4M NaCl a sterilní MiliQ voda. Po inkubaci byla směs dvakrát přečištěna stejným objemem (0,8 ml) chloroformu, zcentrifugována nejvyšší možnou rychlostí (14 000 g) 10 minut při 4°C a vodná fáze byla přenesena do čisté mikrozkuhavky. Dále byla směs inkubována s 0,8 μl RNázy o koncentraci 100 mg/ml po dobu 30 minut při 37°C. Po přidání 2/3 objemu izopropanolu byla DNA nechána precipitovat dvě hodiny při pokojové teplotě dokud nebyla vidět bílá sraženina. Směs byla zcentrifugována maximální rychlostí 15 minut při 4°C, aby se pelet usadil na dně mikrozkuhavky, po čemž byl odstraněn supernatant. Pelet se poté dvakrát promyl chladným etanolem a po oschnutí byl resuspendován v množství sterilní vody adekvátním velikosti peletu (mezi 20 μl a 100 μl). DNA byla opět skladována při -20°C.

3.3. Izolace RNA

Sondy genů *tan* a *apterous* na TSA FISH byly vytvořeny z cDNA, která byla získána reverzní transkripcí z RNA. RNA byla vyizolována z larev a kulek (lepší výsledky byly získány z larev) pomocí RNazol[®] RT (Sigma-Aldrich) dle pokynů výrobce. V prvním kroku byl vzorek tkáně homogenizován v RNazolu (1 ml na 100mg tkáně). K takto připravenému vzorku bylo přidáno 0,4 ml MiliQ vody na každý ml RNazolu RT

použitého k homogenizaci. Směs byla řádně promíchána, ponechána 15 minut v pokojové teplotě a následně zcentrifugována 15 minut při 12 000 g při 4°C. Tímto krokem byly odděleny složky DNA a proteinů, které klesly ke dnu, od RNA obsažené v supernatantu, který byl přenesen do čisté zkumavky. K přenesenému supernatantu bylo přidáno stejné množství 100% isopropanolu k precipitaci RNA. Směs byla ponechána 10 minut při pokojové teplotě a posléze byla zcentrifugována 10 minut při 12 000 g, což umožnilo precipitaci bílého peletu RNA na dně zkumavky. Tento pelet byl dvakrát promyt 600 µl 75% etanolu na každý mililitr použitého supernatantu. Směs byla centrifugována tři minuty při 8 000 g a poté byl odstraněn přebytečný alkohol. Závěrem byl RNA pelet rozpuštěn ve 100 µl sterilní MiliQ vody. Takto připravená RNA byla skladována při -20°C.

3.3.1. Příprava cDNA

Z RNA vyizolované pomocí předchozího postupu byla vytvořena cDNA kitem ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) dle pokynů výrobce. Nejprve byla připravena směs získané RNA (méně než 1 µg) s 0,5 µl RNasin® o koncentraci 40 U/µl, 1,5 µl primeru Oligo(dT)₁₅ o koncentraci 500 µg/ml a MiliQ vodou na doplnění do objemu 5 µl. Reakční směs byla inkubována 5 minut při 70°C a následně ponechána nejméně 5 minut na ledu.

Reakce pro transkripci obsahovala 4 µl reakčního pufru 5x ImProm-II, 4,8 µl 2,5mM MgCl₂, 1 µl 10mM dNTPs, 1 µl reverzní transkriptázy o koncentraci 160 U/µl, MiliQ vodu na doplnění do objemu 15 µl. K této reakci bylo přidáno 5 µl směsi z předchozího kroku. Reakční inkubace proběhly v následujícím pořadí: nasedání primeru pět minut při 25°C, transkripce a elongace produktu 60 minut při 42°C, inaktivace enzymu 15 minut při 70°C. Takto připravenou cDNA nebylo třeba nijak ředit ani rozpouštět, mohla být rovnou amplifikována pomocí PCR a skladována při -20°C do dalšího použití.

3.4. Příprava preparátů

3.4.1. Chromosomální preparáty

Na preparáty znázorňující jádra v meióze byla použita ovaria u samiček a testes u samečků. Jádra v meióze jsou vhodnější pro prohlížení morfologie chromosomů, zatímco jádra v mitóze jsou vhodnější pro zjišťování počtu chromosomů. Pro tvorbu preparátů mitotických jader byly používány imaginální křídlní disky.

Materiál byl získán pitvou larev 4.–5. instaru ve fyziologickém roztoku (0,9% NaCl, 0,042% KCl, 0,025% CaCl₂, 0,02% NaHCO₃). Orgány byly (v případě testes a imaginálních křídlních disků) přeneseny na 10 minut do hypotonického roztoku (75mM KCl) nebo přímo na 15 minut do fixačního roztoku Carnoy, tedy etanol: chloroform: kyselina octová v poměru 6: 3: 1 (v případě ovarii). Po zafixování byl materiál přenesen na čisté sklo vytažené z kyselého etanolu (1% HCl v 96% etanolu pro lepší rozptýlení chromosomů) a pomocí wolframové jehly homogenizován v kapce 60% kyseliny octové. Poté byl preparát přenesen na histologickou plotýnku předeřátou na 45°C a rozptýlen po ploše skla. Takto přichystaná skla byla odvodněna ve vzestupné etanolové řadě (tedy jednu minutu v každém 70%, 80% a nakonec 100% etanolu) a do dalšího použití byla skladována při teplotě -20°C.

3.4.2. Preparáty interfázních jader z Malpighiho žláz

Preparáty pro vizualizaci pohlavního heterochromatinu se získávají z Malpighiho žláz, které jsou připojeny k distálnímu konci trávicí trubice. Buňky Malpighiho žláz obsahují vysoce polyploidní jádra. Heterochromatinové tělísko by mělo být přítomno jen u samičích buněk, protože je tvořeno mnohonásobnými kopiemi chromosomu W (Traut et al. 1978) typického pro samičí genom.

Oddělené žlázy byly přeneseny na podložní sklo s kapkou fyziologického roztoku a opatrně převrstveny fixačním roztokem Carnoy maximálně na dvě minuty, jehož přebytek byly následně odsáty filtračním papírem a na preparát byla nanášena kapka 1,25% laktoacetoorceinu. Takto připravený preparát byl přikryt krycím sklem, filtračním papírem byl odsát přebývající barvicí roztok a sklo bylo utěsněno lakem. Preparáty byly skladovány

ve 4°C po dobu maximálně dvou týdnů, prohlíženy byly pak pomocí světelného mikroskopu.

3.5. Příprava hybridizačních sond

3.5.1. Klonování

Procesem klonování byly získány části genů *tan* a *apterous* zaligované v plasmidu, které byly dále poslány na sekvenaci a posléze využity jako sondy pro TSA FISH. Prvním krokem byla amplifikace materiálu pomocí PCR v termocyleru T professional TRIO (Biometra, Göttingen, Německo). Reakce obsahovala 1x ExTaq pufr, 0,5 U ExTaq DNA polymeráza (TaKaRa, Otsu, Japonsko), 0,2mM každého dNTP, 100 ng templátové DNA, 1μM primery (**Tab. 1**) a MiliQ vodu na doplnění objemu do 20 μl. Proces byl zahájen 3 minutami denaturace při 94°C, následovalo 30 cyklů o 30 sekundách 90°C, 30 sekundách nasedání primerů při 60°C a 90 sekundách elongace při 72°C. Reakce byla zakončena třemi minutami elongace. Produkty byly separovány za pomoci elektroforézy (1% agarózový gel v TAE pufru). Produkty o očekávané velikosti byly vyříznuty z gelu a izolovány pomocí Wizard SV Gel and PCR Clean-Up systém (Promega, Madison WI, USA), postupováno bylo dle pokynů výrobce.

Tab. 1 Sekvence pro primery genů použitých při TSA FISH (cDNA)

Gen	Forward	Reverse
<i>apterous</i>	CTGTAGGGCGGACTGTGC	ATGGGAGTTTACGAGGAGC
<i>tan</i>	ACCATCATTTTTCGCAGCTGT	AAGTCGTTCCCGCTGGTG

Vyizolované produkty byly zaligovány do vektorů prostřednictvím pGEM[®]-T Easy Vector (Promega) dle pokynů výrobce. Reakce obsahovala 3 U T4 DNA ligázy, ligační pufr, 50 ng pGEM[®]-T Easy Vector, PCR produkt vyizolovaný z gelu, MiliQ voda na doplnění objemu do 10 μl a byla inkubována přes noc při 4°C. Potřebné množství PCR produktu v mikrolitrech bylo vypočteno pomocí vzorce poskytnutého výrobcem:

$$\frac{50\text{ng vektoru} \times \text{velikost PCR produktu v kb}}{\text{koncentrace PCR produktu v ng/}\mu\text{l}}$$

Transformace produktů do kompetentních buněk *E. coli* kmene DH5 α (skladovaných při -80°C) proběhla teplotním šokem, tedy buňky z ledu byly vystaveny teplotě 42°C po dobu 90 sekund a pak opět ihned přesunuty zpět na led. Buňky byly vysety a kultivovány na pevném LB mediu s 2% agarem s 100 μ g/ml ampicilinem, 350 μ M IPTG (isopropyl β -D-thiogalactosid) a 35 mg/ml X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid) přes noc při 37°C. Pomocí modro-bílé selekce byli zástupci kolonií nesoucích insert přeneseni na nově připravenou Petriho misku s agarovým LB mediem, délka zaklonovaného produktu byla ověřena pomocí PCR s univerzálními vektorovými primery M13-26 (5'-CAG GAA ACA GCT ATG AC-3') a M13-24 (5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3') a vybrané kolonie byly inokulovány do 3 ml tekutého LB media s Ampicilinem a inkubovány přes noc při 37°C ve třepačce.

Plazmidy s insertem byly z bakterií vyizolovány pomocí kitu NucleSpin Plasmid (Macherey-Nagel) dle pokynů výrobce. Výsledné koncentrace byly měřeny pomocí Nanodropu 2000 nebo Qubit 3.0 a odeslány na sekvenaci Sangerovou metodou firmě SEQme s.r.o. (Dobříš, ČR).

3.5.2. Značení pomocí nick translace

Příprava sondy pomocí nick translace spočívá v začlenění značených nukleotidů v procesu nahrazování původního vlákna DNA pomocí DNA polymerázy I do DNázou naštípaného templátu. V tomto postupu bylo využito „high dNTPs“, tedy směs nukleotidů, kdy bylo přidáno větší množství značeného dUTP v poměru k dTTP s ostatními nukleotidy (pro 20 μ l takto připravených nukleotidů jsou třeba 2 μ l 2,5mM dATP, dCTP, dGTP, 0,72 μ l 2,5mM dTTP, 3,2 μ l 1mM fluorescenčně značeného Aminoallyl-dUTP-Cy3 (Jena Bioscience) a 10,08 μ l PCR vody). Celková značící směs pak tedy obsahovala 2 μ l 0,1M β -merkaptoetanolu, 2,4 μ l výše zmíněné směsi dNTPs, 0,5 μ l 100x zředěné DNázy I (výchozí koncentrace 1 U/ μ l), 2 μ l DNA polymerázy I o koncentraci 10 U/ μ l, 1 μ g DNA templátu, 2 μ l 10x NT pufr (0,05M Tris-HCl o pH=7,5, 5mM MgCl₂, 0,005% BSA), a vodu na doplnění do celkového objemu 20 μ l. Reakce probíhala 60 minut při 15°C a ukončena byla deseti minutami při 70°C a takto připravená sonda byla otestována pomocí elektroforézy (kde se ukázala její délka přibližně 200bp) a nadále skladována při -20°C. Tímto způsobem byla značena telomerická sonda. Templát pro tuto

sondu byl připraven jinými členy laboratoře pomocí beztemplátové PCR dle protokolu uvedeného v Sahara et al. 1999.

3.5.3. Značení pomocí kitu WGA

Pro značení malovací sondy pro chromosom W pomocí WGA (celogenomové amplifikace) byl v této práci použit GenomePlex® Reamplification Kit WGA3 (Sigma-Aldrich, USA). Zapotřebí bylo 10-20 ng DNA chromosomu W (získaných laserovou mikrodisekcí pohlavního chromatinu z preparátů Malpighiho trubic samic *E. kuehniella* a následně amplifikovaných pomocí GenomePlex® Single Cell Whole Genome Amplification Kit WGA4 dle pokynů výrobce), 5 µl 10x amplifikačního mixu, 3,33 µl WGA DNA polymerázy o koncentraci 10 U/µl, 2 µl 10mM dNTPs (kromě dTTP, který měl koncentraci 8,4 mM), 2 µl 1mM značeného dUTP (zelený (Fluorescein-12-dUTP, Jena Bioscience, Německo), červený (Aminoallyl-dUTP-Cy3 Jena Bioscience)) a sterilní MiliQ vody do celkového objemu 50 µl. Reakční směs byla vložena do termocycleru, kde byla inkubována tři minuty při 95°C a následně 14 cyklů složených z 15 sekund při 94°C a pět minut při 65°C. Délka sondy byla ověřena pomocí elektroforézy a hotová sonda byla skladována při -20°C.

3.5.4. Random priming

Tímto způsobem byly značeny sondy genů *tan* a *apterous*, které byly využity při TSA FISH a ke značení byl použit DecaLabel DNA Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). Nejprve je připravena směs 500 ng DNA templátu (plasmidová DNA s insertem konkrétního genu), 10 µl 5x pufru a MiliQ voda na doplnění do objemu 42,25 µl. tato směs je dále denaturována při 95°C ve vodní lázni a následně ihned zchlazena alespoň na tři minuty na ledu. Dále je do směsi přidáno 5 µl 0,25mM nukleotidů, 1,75 µl Fluorescein-12-dUTP (Jena Bioscience) nebo Digoxigenin-11-dUTP (Roche Diagnostics) a 1 µl 5U/µl Klenowova enzymu a celková směs je inkubována při 37°C přibližně 20 hodin. Reakce je ukončena přidáním 1 µl 0,5M EDTA.

Následujícím krokem je přečištění pomocí illustra Sephadexu G-50 (GE Healthcare, UK). Na jednu reakci je potřeba 0,025 g Sephadexu, 400 µl MiliQ vody, která je

inkubována 45 minut ve 4°C. Po této inkubaci je odstraněna vodná fáze a nanesena připravená sonda, která se přes Sephadex přefiltruje pomocí dvouminutové centrifugace při 2 000 g. Výsledná sonda je pak skladována při teplotě -20°C.

3.6. qPCR

Kvantitativní real-time PCR (qPCR) je metoda založená na pozorování vzrůstající fluorescence reakce v čase. Principem PCR je mnohanásobná amplifikace malého množství vzorku v krátkém čase, kvantitativní varianta PCR je kinetická, tedy není pozorován pouze konečný výsledek, ale průběh reakce za pomoci vzrůstající intenzity fluorescenčního signálu společně s amplifikovanou DNA.

V této práci byla pro qPCR použita genomová DNA (gDNA) dospělých samců i samic zavíječe moučného v biologických a technických tripletech (**Obr. 3**). Na 10µl reakci byly použity 2 µl gDNA o koncentraci 10 ng/µl, 5 µl SYBR Xceed qPCR SG 2X Lo-ROX (IAB a.s., Praha, ČR), 2,2 µl MiliQ vody, 0,4 µl forward primeru a 0,4 µl reverse primeru konkrétního genu o koncentraci 10 µM, jejichž sekvence byly navrženy na základě osekvenovaného genomu *E. kuehniella* pomocí programu Geneious 7.1.5 (<https://www.geneious.com>) (**Tab. 3**). Pro reakci byly využity PCR destičky o 96 jamkách, kde v každé využitě jamce (**Obr. 3**) bylo právě 10 µl reakční směsi. Destičky byly přikryty průhlednou folií (qPCR seal, 4titude, UK) a vloženy do termocycleru CFX Connect Real-Time system (Bio-Rad, California, USA) s protokolem začínajícím třemi minutami o teplotě 95°C následovanými 40 cykly o 30 sekundách při teplotě 94°C, 45 sekundách o teplotě 60°C a po těchto 40 cyklech dochází k postupnému zvyšování teploty o 0,5°C z teploty 65°C na 95°C (pro získání křivky tání).

Referenční gen <i>Ace</i>		Konkrétní gen		Referenční gen <i>Ace</i>			Konkrétní gen		
0x	9x	0x	9x	♀ 1a	♀ 1b	♀ 1c	♀ 1a	♀ 1b	♀ 1c
0x	9x	0x	9x	♀ 2a	♀ 2b	♀ 2c	♀ 2a	♀ 2b	♀ 2c
0x	9x	0x	9x	♀ 3a	♀ 3b	♀ 3c	♀ 3a	♀ 3b	♀ 3c
3x	27x	3x	27x	♂ 1a	♂ 1b	♂ 1c	♂ 1a	♂ 1b	♂ 1c
3x	27x	3x	27x	♂ 2a	♂ 2b	♂ 2c	♂ 2a	♂ 2b	♂ 2c
3x	27x	3x	27x	♂ 3a	♂ 3b	♂ 3c	♂ 3a	♂ 3b	♂ 3c

Obr. 3 Schématické vyobrazení PCR destičky použité při qPCR

0x, 3x, 9x a 27x = ředící řady směsi gDNA všech použitých vzorků, které sloužily pro výpočet účinnosti reakce, které byly nutné pro výpočet relativního počtu kopií

Triplikáty na sobě nezávislých vzorků samců (♂) a samic (♀). Technické repliky (a-c) pro eliminaci pipetovací chyby a biologické repliky (1-3)

Výsledky byly analyzovány pomocí programu CFX Bio-Rad Manager Software 3.1 (Bio-Rad, California, USA) a byly využity pro výpočet relativního počtu kopií ze vzorce:

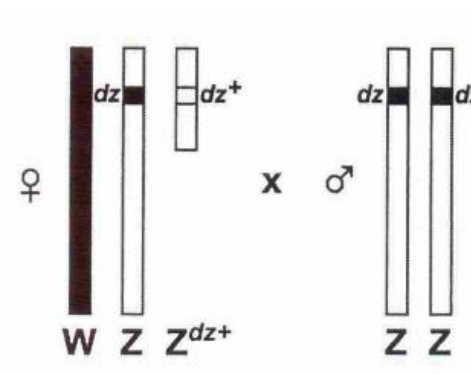
$$R = \frac{(1+E_{Ref})^{Ct_{Ref}}}{(1+E_{Gen})^{Ct_{Gen}}}$$

kde R je relativní počet kopií genu, E je účinnost („efficiency“) reakce a Ct je číslo cyklu, kde křivka amplifikačního signálu překročila „threshold“ (prahová hodnota), index Ref pak značí hodnoty referenčního genu (*Ace*) a Gen hodnoty pro jednotlivé zkoumané geny. Ve výsledku se kontroloval poměr relativních počtů kopií u samic a samců (Nguyen et al. 2013). Aby mohla být testována přítomnost zkoumaného genu na Z^{dz+} fragmentu u ASF-linií, bylo nejprve potřeba ověřit jeho vazbu na chromosom Z u zavíječů divoké linie.

Tab. 2 Sekvence pro primery genů použitých při qPCR (gDNA)

Gen	Forward	Reverse
<i>apterous</i>	CTCAGTAGCATCTCCAGGCAG	CGTCGGGGTTTTGGTTGATTG
<i>kettin</i>	TGACGACTAGTTTTGCCGAGG	GATTCACGAGGGCAATAACGC
<i>Shaker</i>	CGATTTTAGTGCCGTTGGTGG	ACGCGTAGTTGCCATCATCTC
<i>Ace</i>	CCC GCAACACCTAAGAGTCC	TGTACAAGTCGAGTGTGGCC
<i>6-PGD</i>	CCCAAGATCCGCGACACAG	AGAGCTGACAGACACCTAGC
<i>Henna</i>	CCAAAGCCGCACCGAAATC	AAGCATCTTCTCCTCCCACG
<i>tan</i>	ATCTTGCTTGACGAAGGCCT	AGACCTATCGGCCTTGAGGT

U divoké linie byl relativní poměr počtu kopií genů na chromosomu Z 1:2 (samice: samci). Pokud by tento poměr vyšel 1:1, jednalo by se o autosomální gen. V ASF-liniích se v poměru 1:2 (samice: samci) vyskytovaly geny, které se nacházely na chromosomu Z, ale ne na fragmentu Z^{dz+} . V poměru 1:1 se vyskytovaly geny, nacházející se jak na chromosomu Z tak na fragmentu Z^{dz+} (**Obr. 4**).



Obr. 4 Ilustrační schéma pohlavních chromosomů u ASF-linií zavíječe moučného (Marec et al. 2001)

Ověřování pomocí dvouvýběrového nepárového t-testu bylo pak provedeno výpočtem v programu Microsoft Office: Excel na základě relativního počtu kopií genu u samic a samců. Při testování hypotézy lokalizace daného genu na chromosomu Z, tedy poměru počtu kopií daného genu 1:2 (samice: samec), byly nejprve hodnoty relativního počtu kopií genu u samic vynásobeny dvěma. Nulová hypotéza, tedy zda se jednalo o gen vázaný na chromosom Z, autosom nebo fragment Z^{dz+} byla zamítnuta, pokud hladina významnosti byla nižší než 5%.

3.7. FISH

FISH je zkratka pro Fluorescenční in situ hybridizaci, tedy vizualizace místa v jádře komplementárního k sondě. Typy sond použitých v této práci jsou od genových, přes telomerické až po chromosomové.

3.7.1. TSA FISH

TSA (Tyramide Signal Amplification) je druh FISH se zesílením signálu pomocí enzymatické reakce s tyramidem (Carabajal Paladino et al. 2014). Skla nejprve prošla odvodněním vzestupnou řadou alkoholů (70%, 80% a 100% ethanol) a ošetřením 10mM roztokem HCl po dobu deseti minut při 37°C, 30 minut v 1% roztoku peroxidu vodíku v PBS při pokojové teplotě. Dále byly preparáty inkubovány s 200 µl RNázy A v PBS (výsledná koncentrace 100µg/ml) jednu hodinu ve vlhké komůrce při 37°C. Poté byla skla inkubována v 5x Denhardtově roztoku (0,1% polyvinylpyrolidol, 0,1% BSA, 0,1% Ficoll 400) 30 minut při 37°C před nanesením 50 µl hybridizační směsi obsahující 25 µl deionizovaného formamidu, 10 µl 50% dextran sulfátu, 5 µl 20x SSC, 15 ng sondy a MiliQ vody do celkového objemu 50 µl. Po sedmi minutách denaturace při 68°C byla skla inkubována při 37°C přes noc ve vlhké komůrce. Druhý den byla skla promyta třikrát pět minut v 50% formamidu ve 2x SSC při 46°C, dále pětkrát dvě minuty v roztoku 2x SSC při 46°C a třikrát pět minut v 0,1x SSC při 62°C, poté pět minut v 1x TNT (0,1 M Tris-Cl, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) při pokojové teplotě. Dále byla skla inkubována 30 minut ve vlhké komůrce s 200 µl blokujícího TNB pufru (0,1 M Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,5% blokovací činidlo (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)) při pokojové teplotě a poté jednu hodinu s 200 µl protilátky (protilátka proti fluoresceinu konjugovaná s křenovou peroxidázou, PerkinElmer v poměru 1: 500 s TNB) při 37°C. Po třikrát pět minutách promytí v TNT při pokojové teplotě bylo naneseno 100 µl 2% roztoku tyramidu (konjugovaný s fluoresceinem nebo Cy3) v 1x amplifikačním rozpouštědle (TSA Plus Cyanine 3 and Fluorescein system, PerkinElmer), s nímž byla skla inkubována 15 minut v zatemněné vlhké komůrce při pokojové teplotě. Dále skla opět prošla promytím třikrát pět minut v TNT při pokojové teplotě a nakonec byl nanesen antifade DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]oktan)(pro delší výdrž preparátu po expozici světlu) s modrým fluorescenčním barvivem DAPI o koncentraci 500 ng/ml (4',6-diamidin-2-fenylindol) (Sigma-Aldrich, USA). Takto zhotovený preparát je přikrytý krycím sklem, které se zalakuje lakem na nehty pro delší životnost.

Tento druh hybridizace byl využit hlavně z počátku této práce pro vizualizaci genů *tan* a *apterous*. Vzhledem k velkému množství signálů ve výsledných preparátech byl tento protokol několikrát optimalizován – zvýšená koncentrace protilátky z 1:1000 na 1:500 a 1:100 nebo snížení množství použité sondy na polovinu.

3.7.2. Přímá FISH

Přímá FISH spočívá v hybridizaci fluorescenčně značené sondy, která je vidět pod fluorescenčním mikroskopem bez pomoci protilátky. Tento typ hybridizace byl uplatněn hlavně při vizualizaci telomer a chromosomu W. Nejprve byla použita sonda značená zeleným fluoresceinem, ale signál se rychle vysvítal a špatně se zachycoval na fotografiích. Abychom získali lepší obrázky chromosomu W, zkoušeli jsme kromě zelené barvy i červenou a následně i přidávání samčí soutěžící složky (male competitor). Nejlepší výsledky byly získány z kombinace červeně značené W sondy a samčího kompetitoru.

Přímá FISH s W sondou začíná odvodněním skel vzestupnou řadou etanolu (70%, 80% a 100%) a přípravou hybridizační směsi. Na směs pro precipitaci sondy je potřeba 5 µl sondy chromosomu W, 25 µg DNA z lososích spermií, 1/10 objemu 3M octanu sodného a 2,5x objem chladného 100% etanolu.

Kromě FISH s pouze W sondou byla pro tuto práci použita i FISH s W a telomerickou sondou, kdy pro přípravu hybridizačního mixu bylo přidáno k původní směsi 35 ng telomerické sondy. Telomerická sonda se zpravidla barví červeně a užívá se v kombinaci se zeleně značenou W-specifickou sondou.

Hybridizační směs byla nejprve centrifugována, posléze byl odpipetován supernatant a pelet byl přečištěn 70% chlazeným ethanolem a opět zcentrifugován. Po dokonalém odstranění supernatantu bylo k peletu přidáno 5 µl deionizovaného formamidu. Směs byla inkubována 30 minut ve vodní lázni předehřáté na 37°C. Do zkumavky pak bylo přidáno 5 µl 20% dextran sulfátu ve 4x SSC a směs byla denaturována pět minut při 90°C a pak prudce zchlazena přenesením na led.

Skla byla mezitím zdenaturována pomocí 70% roztoku formamidu v 2x SSC tři a půl minuty při 68°C a odvodněním ve vzestupné etanolové řadě, kde 70% etanol je chlazený na -20°C. Na zdenaturovaná skla se přidá 10 µl hybridizační směsi a preparáty se přikryjí krycím sklem a utěsní lepidlem Rubber cement a vloží do vlhké komůrky s 2x SSC do 37°C na tři dny. Po uplynutí inkubační doby tří dnů pinzetou odstraníme lepidlo s krycím sklem a skla promyjeme 5 min v 1% Tritonu X-100 v 0,1x SSC předehřátém na 62°C. Následuje promývání pět minut v 1% Triton X-100 v 1x PBS při pokojové teplotě, barvení pomocí DAPI v 1% Tritonu X-100 s PBS (200 µl DAPI o koncentraci 500 ng/ml),

promytí dvě až pět minut v 1% KODAK PhotoFlo v 1x PBS a jednu minutu v 1% KODAK PhotoFlo v MiliQ vodě při pokojové teplotě. Nakonec bylo na skla přidáno 20 μ l 0,2M antifade DABCO, skla byla přikryta krycím sklem a byla vytlačena přebytečná tekutina. Výsledný preparát byl přelakován lakem na nehty pro prodloužení životnosti skla.

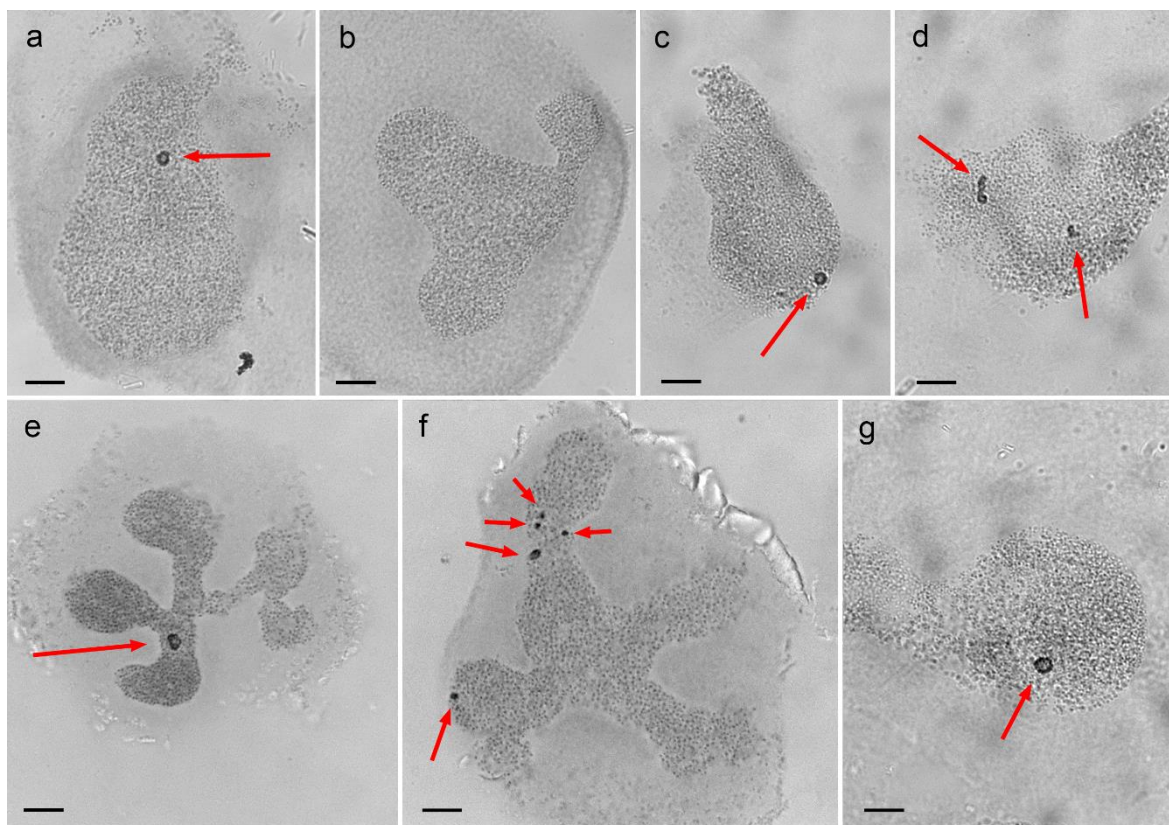
Preparáty byly prohlíženy pomocí fluorescenčního mikroskopu Zeiss Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss Jena, Německo) za použití vždy jednoho ze tří filtrů (červený, zelený, modrý) a přenášeny do počítače pomocí CCD kamery Olympus XM10 do programu CellSens 1.9 (Olympus, Německo) k dalšímu zpracování v programu Adobe Photoshop CS6 verze 13.0.1.

4. Výsledky

4.1. Sex chromatin

Pohlavní chromatin (sex chromatin), pozorovatelný v preparátech polyploidních jader buněk Malpighiho žláz, je tvořen mnohočetnými kopiemi chromosomu W, a měl by se tedy nacházet jen u samic. Zároveň je zde možnost, že samice linií ASF nesoucí fragment Z^{dz+} , případně samci linie ASF-6 (kde se na fragmentu Z^{dz+} nachází část chromosomu W, ovšem na rozdíl od male-killing linií samci s fragmentem Z^{dz+} přežívají) by mohly mít kromě klasického pohlavního heterochromatinu i tělísko tvořené fragmentem Z^{dz+} . Výjimku by tvořila linie ASF-4, jejíž fragment Z^{dz+} neobsahuje část chromosomu W. U samic divoké linie WT-C02 se vyskytovalo jen jedno heterochromatinové tělísko (**Obr. 5a**), u samců nebylo tělísko přítomno (**Obr. 5b**). U linií ASF byla nalezena jádra jak s jedním malým, velkým nebo deformovaným tělískem, tak i s vícerymi, většinou malými, tělísky (**Obr. 5c-g**).

K získání výsledků bylo vyšetřeno celkem 22 jedinců zavíječe moučného (8 samců a 14 samic) z linií WT-C02, ASF-1, ASF-2 a ASF-6. Sex chromatin se vyskytoval pouze u samic, v ASF-liniích 1 a 2 ve formě klasické (**Obr. 5c**), ale převážně deformované nebo vícečetné v porovnání s divokou linií WT-C02 (**Obr. 5d-f**). V linii ASF-6 byl sex chromatin nalezen pouze ve formě velice podobné k divoké linii (**Obr. 5g**), nikoli s více tělísky, jak tomu bylo u linií ASF-1 a ASF-2 (**Obr. 5d, f**).

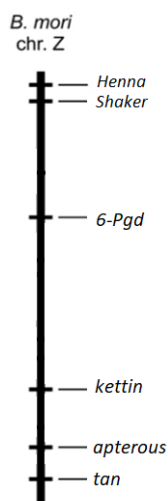


Obr. 5 Preparáty polyploidních jader získané z Malpighiho žláz. **a)** Jedno kulaté, hladké tělíčko sex chromatinu přítomné v samicím jádře divoké linie WT-C02. **b)** Samčí jádro divoké linie WT-C02 bez viditelného heterochromatinového tělíška, podporující tvrzení, že se heterochromatinová tělíška nenachází na preparátech samčích jader. **c)** Heterochromatinové tělíčko v jádře linie ASF-1, které má obvyklý vzhled jako tělíčko divoké linie. **d)** Více deformovaných heterochromatinových tělíšek v jádře linie ASF-1. **e)** Větší a mírně deformované heterochromatinové tělíčko v jádře linie ASF-2. **f)** Více menších heterochromatinových tělíšek v jádře linie ASF-2. **g)** Jedno větší heterochromatinové tělíčko v jádře linie ASF-6. Měřítko = 10 μm .

4.2. qPCR

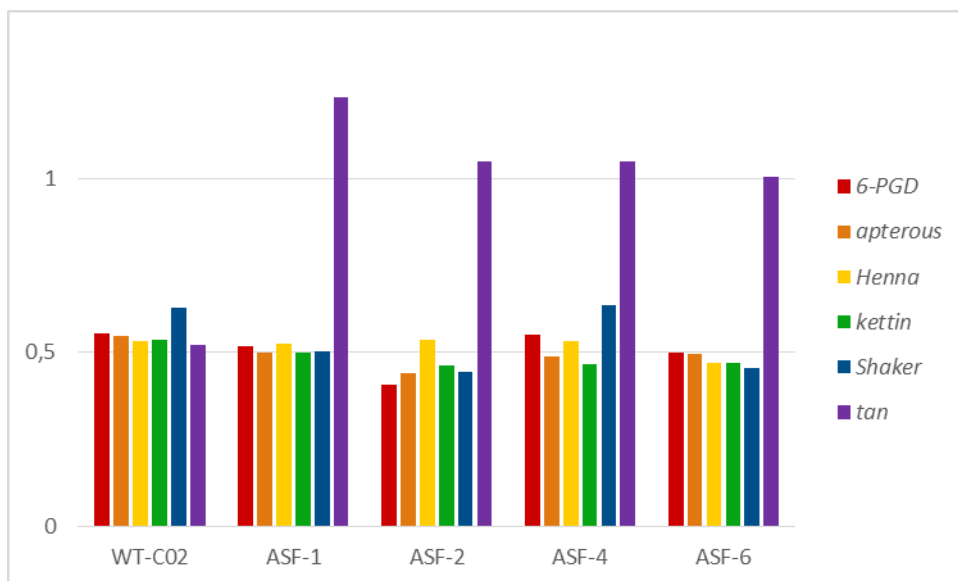
Pomocí qPCR byl zjišťován poměr počtu kopií vybraných genů samců k samicím, u nichž se předpokládalo, že se nacházejí na chromosomu Z. Tyto geny byly vybírány ze známých genů bource morušového (*Bombyx mori*) (Bombycidae) lokalizovaných na chromosomu Z (**Obr. 6**), což bylo umožněno díky tomu, že obsah chromosomu Z bývá u řádu Lepidoptera vysoce konzervovaný (Fraïsse et al. 2017). Protože je bourec morušový od zavíječe moučného fylogeneticky poněkud vzdálený (Regier et al. 2013), byly sekvence ortologů těchto genů v genomu zavíječe moučného hledány pomocí sekvencí z příbuznějších druhů ze stejné podčeledi Phycitinae čeledi Pyralidae – *Amyelois transitella* a *Plodia interpunctella*. Jako referenční gen byl použit gen *Ace*, který se nachází na

autosomu (Dalíková et al. 2017), měl by se tedy nacházet ve dvou kopiích ve všech testovaných vzorcích nezávisle na pohlaví.



Obr. 6 Schéma rozložení genů vybraných pro qPCR na chromosomu Z bource morušového, upraveno z Nguyen et al. 2013

Pro testování rozdílů počtu kopií pohlavně vázaných genů mezi pohlavími byly nejprve vybrány čtyři geny: *Shaker*, *kettin*, *apterous* a *6-PGD*. Lokalizace těchto genů na chromosomu Z byla ověřena nejprve na divokém kmeni WT-C02 zavíječe moučného a následně testována u ASF-linií. Ani jeden z těchto genů nebyl přítomný na Z^{dz+} fragmentu, tedy každý se nacházel u samčích vzorků v dvojnásobném počtu v porovnání k samicím u všech kmenů. Proto byly hledány další geny. Protože je pravděpodobnější, že Z^{dz+} fragment vznikl spíše odlomením kraje chromosomu než pomocí dvou zlomů, byly tyto další geny hledány více ke krajům chromosomu Z od již testovaných genů: ke konci chromosomu od genu *apterous* byl nalezen gen *tan* a na druhém konci, za genem *Shaker*, se jednalo o gen *Henna*. Dle výsledků qPCR se gen *tan* nachází na fragmentu Z^{dz+} (**Obr. 7**), všechny výsledky qPCR jsou shrnuté v příloze (**Tab. 3**). Gen *tan* byl přítomen v divoké linii WT-C02 u samců ve dvojnásobném množství než u samic a ve všech ASF-liniích byl počet kopií tohoto genu napříč pohlavími shodný.



Obr. 7 Porovnání poměrů počtů kopií genů u jednotlivých linií zavíječe moučného, kde na ose x jsou seřazené divoká linie WT-C02 a jednotlivé použité ASF-linie a osa y značí poměr relativního počtu kopií konkrétního genu mezi samcem a samicí (u ASF-linií samicí s fragmentem Z^{dz+}), kde hodnota poměru 0,5 odpovídá genu nacházejícím se pouze na chromosomu Z, zatímco hodnota 1 značí, že se daný gen nachází i na fragmentu Z^{dz+} u ASF-linií.

V tabulce v příloze jsou uvedeny kromě výsledků i účinnosti, které byly používány pro výpočty. Tato čísla by se měla nacházet optimálně v rozmezí od 90% do 100%, ovšem zde jsme se setkali s vyššími hodnotami. Tyto hodnoty mohly být způsobeny například primer-dimery (tedy více produkty, než kolik byl předpokládaný počet), což jsme ovšem vyloučili po kontrole křivky tání. Pokud by se jednalo o případ primer-dimerů, měla by tato křivka dva vrcholy. Zde měla křivka tání ovšem pouze jeden vrchol, jak tomu má správně být. Pokoušeli jsme se získat nižší procenta účinnosti opakováním testů pro eliminaci pipetovací chyby, izolací nové DNA, optimalizací koncentrace primerů nebo navrhováním nových primerů. V tabulce jsou uvedeny nejlepší výsledky, jaké se nám podařilo získat. Je možné, že při amplifikaci dochází k tvorbě nespecifických produktů. I to by ovšem měla odhalit křivka tání, protože pravděpodobnost, že teplota tání nespecifického produktu bude stejná se specifickým, je velmi nízká.

4.3. Výsledky hybridizace *in situ*

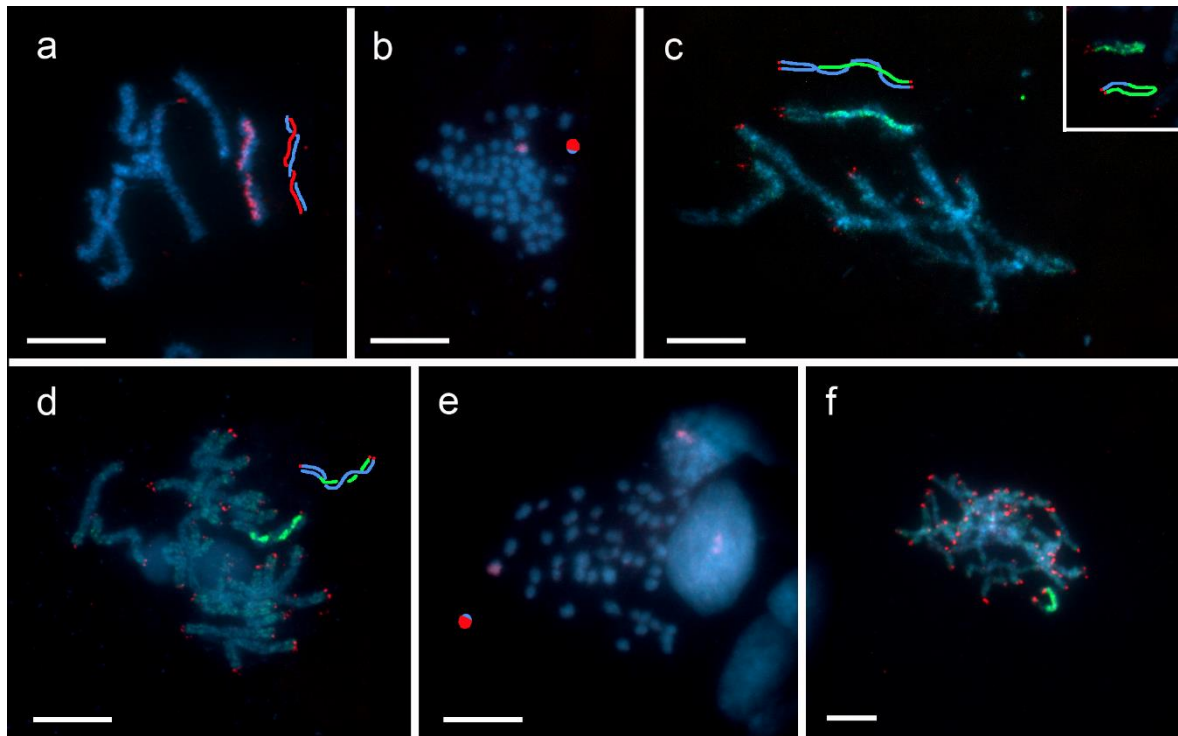
Na rozdíl od qPCR byly u FISH s W-specifickou sondou vybrány kromě divoké linie WT-C02 jen linie ASF-1, ASF-2 a ASF-6. Linie ASF-4 byla vynechána, protože fragment Z^{dz+} u této linie neobsahuje část chromosomu W. TSA-FISH byla prováděna

pouze na preparátech divoké linie WT-C02, protože se nepodařilo protokol optimalizovat natolik, aby ho bylo možné použít na preparátech linií ASF.

4.3.1. Detekce části fragmentu Z^{dz+} tvořené částí chromosomu W

Přítomnost části chromosomu W na fragmentu Z^{dz+} byla ověřována pomocí FISH. Výsledky jsou poněkud překvapivé, protože na žádných preparátech nebyl tento fragment nalezen (**Obr. 8**). Vzhledem ke správnému zobrazení chromosomu W u samic divoké linie WT-C02 (**Obr. 8a**) i u samic ASF-linií (**Obr. 8b-f**) lze usoudit, že pro přípravu preparátů byli využiti jedinci ve správném stádiu a že i sonda fungovala správně. Pro kontrolu byly kromě preparátů z ovarii s jádry v meióze použity i preparáty z larválních křídelních imaginálních disků obsahujících mitotická jádra (**Obr. 8b a 8e**).

Na preparátech s mitózami byl kontrolován počet chromosomů, aby se dalo vyloučit, že část jádra, kde by se mohl fragment Z^{dz+} nacházet, chybí. Na žádném z preparátů nebyl tento fragment nalezen, ovšem u všech testovaných ASF-linií byla W malovací sondou značena jen část chromosomu W, zatímco jeho terminální oblast zaujímající přibližně čtvrtinu, zůstala nenaznačená (**Obr. 8c, 8d a 8f**). Na meiotických preparátech s pachytenními jádry také nebyl fragment Z^{dz+} přítomen.

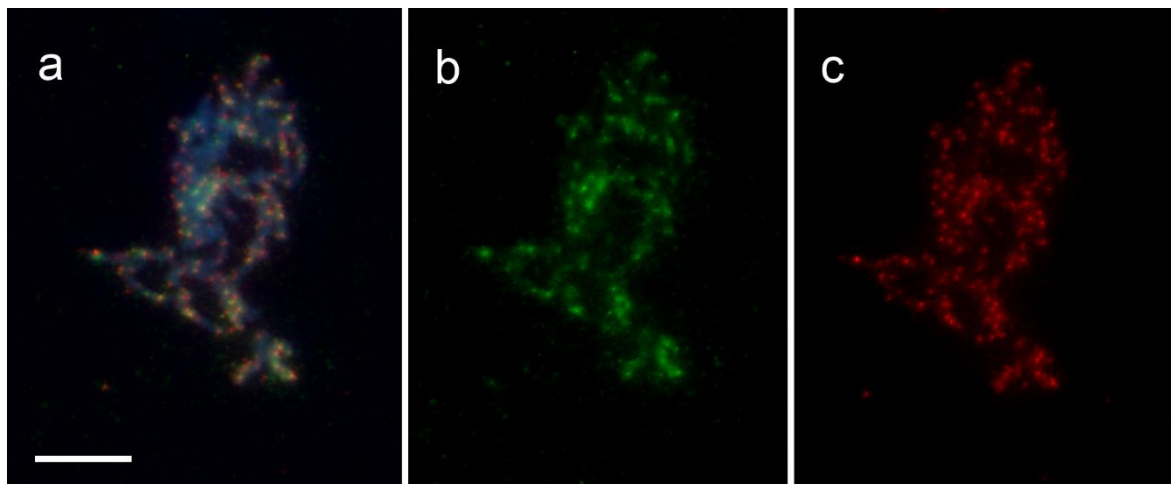


Obr. 8 Chromosomy linií *E. kuehniella* značené W-specifickou a telomerickou sondou pomocí metody FISH se schémata. Hybridizační signály W-specifické sondy na obrázcích **a**, **b** a **e** jsou červené, u obrázků **c**, **d** a **f** zelené. Hybridizační signál telomerické sondy je červený. Chromosomy jsou podbarvené DAPI (modrá). **a**) Část pachytenního jádra s chromosomem W párujícím se s chromosomem Z v linii WT-C02. Chromosom W je značen sondou po celé délce. **b**) Mitotická metafáze linie ASF-1 s W-specifickou sondou (zelená), kde je vidět, že část chromosomu není naznačena. **c**) Část pachytenního jádra značeného telomerickou sondou a W-specifickou sondou, kde je vidět, že část chromosomu párujícího se s chromosomem Z není naznačena. Na části obrázku v pravém horním rohu je vidět chromosom W z jiného jádra párující se sám se sebou. **d**) Pachytenní jádro samice linie ASF-2 s bivalentem pohlavních chromosomů, kde se chromosom Z obtáčí kolem chromosomu W, aby mu přizpůsobil svou délku. Konec chromosomu W není naznačen W-specifickou sondou. **e**) Jádro linie ASF-6 v mitotické metafázi značené W-specifickou sondou, kde je patrná nenaznačená část. **f**) Pachytenní jádro linie ASF-6 značené W-specifickou sondou, kde je zřetelně nenaznačený konec. Schéma zde není uvedeno, protože pro malé zvětšení není možné určit, kudy chromosomy jdou. Schémata v obrázcích **a**, **b** a **e**: červená = oblast chromosomu W značená W-specifickou sondou, modrá = chromosom Z a oblast chromosomu W, která nebyla značená W-specifickou sondou. Schémata v obrázcích **c**, **d** a **f**: zelená = oblast chromosomu W značená W-specifickou sondou, modrá = chromosom Z a oblast chromosomu W, která nebyla značená W-specifickou sondou, červená = signály telomerické sondy. Měřítko = 10 μm .

4.3.2. Lokalizace genů přítomných na Z^{dz+} fragmentu TSA-FISH

Geny, které byly zkoumány pro potenciální přítomnost na Z^{dz+} fragmentu byly nejprve vyhledány u bourče morušového. Protože je to druh od zavijče moučného

evolučně poměrně vzdálený, bylo úkolem nejen zjistit, zda se gen *tan* (který je dle výsledků qPCR přítomný na Z^{dz+} fragmentu) skutečně nachází na Z^{dz+} fragmentu, ale jestli je skutečně, jako u bource, blízko genu *apterous*. Na tyto otázky měla odpovědět FISH s enzymatickou amplifikací signálu (TSA-FISH). Bohužel sondy působily přítomnost příliš mnoha (desítek) signálů na všech chromosomech všech jader (**Obr. 9**). Optimalizace množství sondy, protilátky a ošetřování skel tento problém nedokázaly vyřešit. Z výsledků nelze učinit žádný závěr.



Obr. 9 Pachytenní chromosomy divoké linie WT-C02 *E. kuehniella* značené pomocí TSA-FISH. **a)** Složený obrázek ukazující velké množství signálů, z čehož nebylo možné učinit závěr, kde se geny nachází. **b)** Mnohočetné signály genu *tan* značeného zeleným fluoresceinem – očekáván byl jeden signál (na chromosomu Z). **c)** Mnohočetné signály genu *apterous* značeného červeným Cy3 – očekáván byl jeden signál (na chromosomu Z). Měřítko = 10 μ m

5. Diskuse

5.1. qPCR

Pro mapování genetického obsahu fragmentu Z^{dz+} u ASF-linií zavíječe moučného bylo postupně použito šest genů, které jsou u bource morušového lokalizované na chromosomu Z. V první řadě tak byla potvrzena přítomnost vybraných genů na chromosomu Z divoké linie zavíječe moučného, což podporuje tvrzení o široké syntenii tohoto chromosomu napříč motýly (Dalíková 2017). I přesto, že v průběhu evoluce docházelo k fúzím s autosomy (Traut et al. 2007), zachoval si chromosom Z syntenii napříč širokým spektrem druhů (Van't Hof et al. 2008, Yasukochi et al. 2009) jak ve skupině *Ditrysia* tak mimo ni (Fraïsse et al. 2017, Voleníková 2015). Z genů zvolených pro qPCR v této práci se jen gen *tan* jeví dle výsledků být přítomný na fragmentu Z^{dz+} a to ve všech čtyřech ASF-liniích.

5.2. Sex chromatin

Sex chromatin je soubor kopií chromosomu W, obvykle se tedy nachází pouze u samic v podobě jednoho heterochromatinového tělíska, ale existují výjimky v různých mutantních liniích zavíječe moučného (Marec & Traut 1994). Například fúze chromosomu W s jiným chromosomem má tendenci vyústit v polyploidních jádrech v deformaci, často prodloužení sex chromatinu (Marec & Traut 1994) nebo také ve fragmentaci (Traut & Rathjens 1973). Vysvětlením fragmentace sex chromatinu může být část autosomu nebo chromosomu Z tvořená euchromatinem, která zfúzovala s chromosomem W, protože transkripční aktivita euchromatinu rozvolňuje heterochromatin (Marec & Traut 1994). Fragmentace sex chromatinu v polyploidních jádrech z důvodu chromosomální přestavby zahrnující chromosom W byla pozorována na několika obalečích (Šíchová 2011) i u bělásků (Šíchová et al. 2015). Z delece chromosomu W naopak není příčinou fragmentace sex chromatinu, heterochromatinové tělísko je jen výrazně menší (Traut et al. 1986). V některých mutantních liniích, kde došlo k fúzi chromosomu W s autozomem, může toto tělísko zcela chybět, což může být způsobeno tendencí chromatinu chromosomu W shlukovat se, zatímco autosom, který s ním zfúzoval, má sklon rovnoměrně se rozptýlit v prostoru jádra (Rathjens 1974, Traut et al. 1986).

U ASF-linií zavíječe moučného jsme předpokládali, že, vzhledem k tomu, že fragment Z^{dz+} obsahuje v liniích ASF-1, ASF-2 a ASF-6 část chromosomu W, se na preparátech z Malpighiho žláz bude vyskytovat jedno nebo dvě hetrochromatinová tělíska. Zároveň jsme očekávali tento sex chromatin i u samců linie ASF-6, jelikož i ti, i když jen v méně než polovičním zastoupení, mají fragment Z^{dz+} . Na rozdíl od male-killing linií ASF-1 a ASF-2 v linii ASF-6 se samci dožívají dospělosti. Nicméně na žádných samčích preparátech (tedy ani ASF-6) nebyl sex chromatin přítomný.

Na samičích preparátech linií ASF-1 a ASF-2 pak bylo skutečně pozorovatelné jedno většinou deformované tělísko, nebo i více (až sedm, častěji však dvě nebo tři) menších, roztroušených tělísek, za což může být zodpovědná část chromosomu Z, s níž chromosom W zfúzoval. Fragmentovaný sex chromatin byl pozorován už i u dalších linií nesoucích fúzi chromosomu W s chromosomem Z (Marec & Traut 1994). V neposlední řadě zde ovšem byla patrná i obyčejně vyhlížející tělíska, obzvláště pak u linie ASF-6. Tyto případy se nerůznily jen mezi liniemi nebo jedinci, ale i v rámci jednoho preparátu.

5.3. Fúze fragmentu

Přestože výsledky qPCR potvrdily přítomnost druhé kopie Z-vázaného genu u samic, které by ji kvůli absenci druhého chromosomu Z měly postrádat, samostatný fragment se pomocí FISH nepodařilo lokalizovat u žádné z testovaných ASF-linií. Pomocí FISH s W-specifickou malovací sondou bylo ovšem možné sledovat rozdíl mezi bivalenty pohlavních chromosomů u zástupců linie WT-C02 a jednotlivých ASF-linií, kde u linie WT-C02 je chromosom W jednotně označen hybridizačním signálem po celé délce, zatímco u ASF-linií lze pozorovat nenaznačený konec chromosomu W. Je tedy pravděpodobné, že se jedná o část chromosomu Z nacházející se na Z^{dz+} fragmentu, který se spojil s chromosomem W. K této fúzi mohlo dojít ektopickou rekombinací, ke které je sice potřeba homologie, ale tu mohlo zajistit množství repetitivních sekvencí (Abe et al. 2005b), obzvláště v případě, že k fúzi s chromosomem W došlo koncem fragmentu Z^{dz+} tvořeným právě částí chromosomu W. Další možností je dvoubodový zlom, což by vysvětlovalo i chybějící telomery (Lamarache et al. 2010) v předělu mezi koncem chromosomu W a začátkem domnělého fragmentu.

Ze všech samců v ASF-liniích přežijí pouze ti bez fragmentu Z^{dz+} , protože u linií ASF-1 a ASF-2 je tento fragment pro samce letální a v ostatních liniích (ASF-4 a ASF-6) jsou eliminováni selekčním systémem chovů (pro tvorbu nové generace jsou vybíráni pouze samci s dz fenotypem, tedy bez fragmentu Z^{dz+}). Samice jsou naopak vybírány právě díky tomuto fragmentu, který jim působí divoký fenotyp, proto fúze s chromosomem W a tedy zajištění přesunu fragmentu Z^{dz+} do genotypu všech samic následující generace představuje velkou selekční výhodu. Zároveň fúzí fragmentu Z^{dz+} s chromosomem W je znemožněn přenos tohoto fragmentu do samčích potomků, všichni samčí potomci tedy budou mít dz fenotyp a nebudou eliminováni (ani male-killing faktorem ani selekčním systémem chovů). Výhodnost této chromosomální fúze ukazuje i fakt, že k její fixaci došlo nezávisle u všech testovaných linií.

6. Závěr

Cílem této práce bylo zmapovat fragment Z^{dz+} , přítomný u ASF-linií zavíječe moučného, a zjistit případné rozdíly mezi male-killing liniemi ASF-1 a ASF-2 a non-male-killing liniemi ASF-4 a ASF-6. Z šesti genů lokalizovaných na chromosomu Z zavíječe moučného, testovaných pomocí qPCR, byl na fragmentu Z^{dz+} přítomen pouze gen *tan* a to shodně u všech linií. Následná FISH s W-specifickou sondou na liniích ASF-1, ASF-2 a ASF-6 ukázala, že fragment Z^{dz+} s největší pravděpodobností zfúzoval s chromosomem W. Rozdíly v obsahu fragmentu Z^{dz+} se mezi ASF-liniemi navzdory intenzivnímu úsilí nalézt nepodařilo, ale podařilo se detekovat chromosomální přestavbu, která vznikla a zafixovala se nezávisle ve všech testovaných ASF-liniích. Díky této fúzi již ale není možné zjistit, zda je u linií ASF-1 a ASF-2 male-killing faktor po chromosomální přestavbě stále přítomen.

Literatura

- Abe H. et al. (1998) Identification of novel random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) on the W chromosome of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, and the wild silkworm, *B. mandarina*, and their retrotransposable element-related nucleotide sequences. *Genes Genet. Syst.* 73, 243-254.
- Abe H. et al. (2005a) Partial deletions of the W chromosome due to reciprocal translocation in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.* 14, 339-352.
- Abe H., Mita K., Yasukochi Y., Ohshiki T., Shimada T. (2005b) Retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*, *Cytogenet. Genome Res.* 110, 144-151.
- Arunkumar K. P., Mita K., Nagaraju J. (2009) The silkworm Z chromosome is enriched in testis-specific genes. *Genetics* 182:493–501.
- Carabajal Paladino L., Nguyen P., Šíchová J., Marec F. (2014) Mapping of single-copy genes by TSA-FISH in the codling moth, *Cydia pomonella*. *BMC Genetics* 15: S15.
- Dalíková M., Zrzavá M., Hladová I., Nguyen P., Šonský I., Flegrová M., Kubičková S., Voleníková A., Kawahara A. Y., Peters R. S., Marec F. (2017) New Insights into the Evolution of the W chromosome in Lepidoptera, *Journal of Heredity*, 108(7): 709-719.
- Ennis T. E. (1976) Sex chromatin and chromosome numbers in Lepidoptera. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* 18: 119-130.
- Fraïsse C., Picard M. A. L., & Vicoso B. (2017) The deep conservation of the Lepidoptera Z chromosome suggests a non-canonical origin of the W. *Nature Communications*, 8(1).
- Fuková I., Traut W., Vítková M., et al. (2007) Probing the W chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin. *Chromosoma* 116:135–145.
- Gotter A. L., Levine J. D., Reppert S. M. (1999) Sex-linked period genes in the silkworm, *Antheraea pernyi*: implications for circadian clock regulation and the evolution of sex chromosomes. *Neuron* 24:953–65.
- Grimaldi D. A., Engel M. S. (2005) *The evolution of the insects*. Cambridge University Press, New York, 408-755.
- Jacob T. A., Cox P. D. (1976) The influence of temperature and humidity on the life-cycle of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae), *Journal of Stored Research*. 13: 107-118.

- Kaiser V. B., Bachtrog D. (2010) Evolution of sex chromosomes in insects. *Annual Reviews of Genetics* 44: 91-112.
- Kiuchi T., Koga H., Kawamoto M., Shoji K., Sakai H., Arai Y., Ishihara G., Kawaoka S., Sugano S., Shimada T., Suzuki Y., Suzuki M. G., Katsuma S. (2014) A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm. *Nature* 509:633-636.
- Kristensen N. P., Skalski A. W. (1999) Phylogeny and palaeontology. In: Kristensen N. P. (ed) *Handbuch der Zoologie, a natural history of the phyla of the animal kingdom. Vol. IV, Arthropoda: Insecta, part 35, Lepidoptera, moths and butterflies, Vol. 1: evolution, systematics and biogeography, vol IV.* Walter de Gruyter, Berlin, pp 7–25.
- Lamarche B. J., Orazio N. I., & Weitzman M. D. (2010) The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Letters*, 584(17), 3682–3695.
- Lukhtanov V. A. (2000) Sex chromatin and sex chromosome systems in nonditrysian Lepidoptera (Insecta). *J Zool Syst Evol Res* 38:73–79.
- Marec F. (1990) Genetic control of pest Lepidoptera: Introduction of sex-linked recessive lethal mutations in *Ephestia kuehniella* (Pyrilidae). *Acta Entomol. Bohemos.* 87: 445-458.
- Marec F., Mirchi R. (1990) Genetic control of the pest Lepidoptera: Gamma-ray induction of translocations between sex chromosomes of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Stored Prod. Res.* 26, 109-116.
- Marec F., Traut W. (1993) Synaptonemal complexes in female and male meiotic prophase of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). *Heredity* 71: 394-404.
- Marec F., Traut W. (1994) Sex chromosome pairing and sex chromatin bodies in W-Z translocation strains of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). *Genome* 37:426–35.
- Marec F., Tothová A., Sahara K., Traut W. (2001) Meiotic pairing of sex chromosome fragments and its relation to atypical transmission of a sex-linked marker in *Ephestia kuehniella* (Insecta: Lepidoptera). *Heredity (Edinb)* 87:659–671.
- Marec F., Sahara K., Traut W. (2010) Rise and fall of the W chromosome in Lepidoptera. In: Goldsmith M. R., Marec F. (eds.) *Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera.* CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp. 49–63.
- Nagaraju J., Gopinath G., Sharma V., Shukla J. N. (2014) Lepidopteran sex determination: A cascade of surprises. *Sex Dev* 8:104–112.
- Nguyen P., Sýkorová M., Šichová J., Kůta V., Dalíková M., Frydrychová R., Neven L. G., Sahara K., Marec F. (2013) Neo-sex chromosomes and adaptive potential in tortricid pests. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: 6931-6936.
- Pomiankowski A., Nöthiger R., Wilkins A. (2004) The Evolution of the *Drosophila* Sex-Determination Pathway. *Genetics* 166:1761–1773.

- Rathjens, B. (1974). Zur Funktion des W-Chromatins bei *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). *Chromosoma*, 47(1), 21–44.
- Regier J. C., Mitter C., Zwick A., et al. (2013) A large-scale, higher-level, molecular phylogenetic study of the insect order Lepidoptera (moths and butterflies). *PLoS One* 8(3):e58568.
- Sahara K., Marec F., Traut W. (1999) *Chromosome Research*, 7(6), 449-460.
- Sahara K., Yoshido A., Traut W. (2012) Sex chromosome evolution in moths and butterflies. *Chromosome Res* 20:83–94.
- Severa F., Novák I. (2005) *Motýli 2. vydání* (Praha) s. 144.
- Šíchová J. (2011) Srovnání molekulární divergence pohlavních chromosomů a autosomů u příbuzných druhů obalečů (Tortricidae). Diplomová práce, 60 p., Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
- Šíchová J., Voleníková A., Dincă V., Nguyen P., Vila R., Sahara K., et al. (2015) Dynamic karyotype evolution and unique sex determination systems in Leptidea wood white butterflies. *BMC Evol Biol* 15:89.
- Šíchová J., Ohno M., Dincă V., Watanabe M., Sahara K., Marec F. (2016) Fissions, fusions, and translocations shaped the karyotype and multiple sex chromosome constitution of the northeast-Asian wood white butterfly, *Leptidea amurensis*. *Biol J Linn Soc* 118:457–471.
- Traut W., & Rathjens B. (1973) Das W-Chromosom von *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera) und die Ableitung des Geschlechtschromatins. *Chromosoma*, 41(4), 437–446.
- Traut W., Scholz D. (1978) Structure, replication and transcriptional activity of the sex-specific heterochromatin in a moth. *Exp Cell Res* 113:85–94.
- Traut W., Weith A., Traut G.. 1986. Structural mutants of the W chromosome in *Ephestia* (Insecta, Lepidoptera). *Genetica*. 70:69–79.
- Traut W., Marec F. (1996) Sex chromatin in Lepidoptera. *The Quarterly Review of Biology* 71: 239–256.
- Traut W., Sahara K., Marec F. (2007) Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sex Dev* 1:332–46.
- Traut W., Vogel H., Glöckner G., Hartmann E., Heckel D. G. (2013) High-throughput sequencing of a single chromosome: a moth W chromosome. *Chromosome Res* 21:491–505.
- Van't Hof A. E., Marec F., Saccheri I. J., Brakefield P. M., & Zwaan B. J. (2008). Cytogenetic Characterization and AFLP-Based Genetic Linkage Mapping for the

- Butterfly *Bicyclus anynana*, Covering All 28 Karyotyped Chromosomes. PLoS ONE, 3(12), e3882.
- Vítková M., Fuková I., Kubíčková S., Marec F. (2007) Molecular divergence of the W chromosomes in pyralid moths (Lepidoptera). *Chromosome Res* 15:917–930.
- Vlašánek P., Bartoňová A., Marec F., Konvička M. (2017) Elusive *Parnassius mnemosyne* (Linnaeus, 1758) larvae: habitat selection, sex determination and sex ratio (Lepidoptera: Papilionidae). *Shil Rev Lepidopterol* 45:561–569.
- Voleníková A., (2012) Aberantní výskyt heterochromatinu u zavíječe moučného *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). Bakalářská práce, 43 p., Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
- Voleníková A., (2015) Analýza pohlavních chromosomů vybraných druhů primitivních motýlů z čeledi hrotnokřídlecovití (Lepidoptera: Hepialoidea). Diplomová práce, 58 p., Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
- Weith A., and Traut W. (1986) Synaptic adjustment, nonhomologous pairing, and non-pairing of homologous segments in sex chromosome mutants of *Ephestia kuehniella* (Insecta, Lepidoptera). *Chromosoma*, 94: 125-131.
- Winnepenninckx B., Backeljau T., De Wachter R. (1993) Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *TIG(Technical Tips)*: 9 (12), 407.
- Yasukochi, Y., Tanaka-Okuyama, M., Shibata, F., Yoshido, A., Marec, F., Wu, C., ... Sahara, K. (2009). Extensive Conserved Synteny of Genes between the Karyotypes of *Manduca sexta* and *Bombyx mori* Revealed by BAC-FISH Mapping. PLoS ONE, 4(10), e7465.
- Yoshido A., Marec F., a Sahara K. (2016) The fate of W chromosomes in hybrids between wild silkmoths, *Samia cynthia* ssp.: no role in sex determination and reproduction. *Heredity*, 116: 424–433.

Seznam zkratek

6-PGD = 6-phosphogluconate dehydrogenase
ASF = Abnormal segregating females
DABCO = 1,4-diazabicyclo[2.2.2]oktan
DAPI = 4',6-diamidin-2-fenylindol
DNA = Deoxyribonukleová kyselina
cDNA = komplementární DNA, transkribovaná z RNA
gDNA = genomová DNA, získaná izolací
dNTPs = deoxynukleotidová směs
EDTA = 2,2',2'',2'''-(ethan-1,2-diyldinitrilo)tetraoctová kyselina
FISH = Fluorescent in situ hybridization
IPTG = isopropyl β -D-thiogalactosid
PBS = Phosphate-buffered Saline
PCR = Polymerase chain reaction
qPCR = kvantitativní real-time PCR
RNA = ribonukleová kyselina
SSC = Saline-Sodium Citrate
TAE = Tris-Acetate-EDTA
TNB = směs Tris-HCl, NaCl a blokovacího činidla
TNT = směs Tris-HCl, NaCl a Tween 20
TSA = Tyramide Signal Amplification
WT = Wild Type
X-Gal = 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosid

Seznam tabulek

Tab. 1 Sekvence pro primery genů použitých při TSA FISH (cDNA)

Tab. 2 Sekvence pro primery genů použitých při qPCR (gDNA)

Tab. 3 Výsledky qPCR

Seznam obrázků

Obr. 1 Varianty potomků zástupců ASF-linií *E. kuehniella*

Obr. 2 Procentuální zastoupení variant kombinací párování chromosomálních elementů napříč ASF-liniemi

Obr. 3 Schématické vyobrazení PCR destičky použité při qPCR

Obr. 4 Ilustrační schema pohlavních chromosomů

Obr. 5 Orceinové preparáty

Obr. 6 Lokalizace genů na chromosomu Z

Obr. 7 Graf porovnání počtů kopi testovaných genů (qPCR)

Obr. 8 Chromosomy linií *E. kuehniella* značené W-specifickou a telomerickou sondou pomocí metody FISH se schématy

Obr. 9 Příkladné foto TSA-FISH

Přílohy

Tab. 3 Výsledky qPCR. Relativní počty kopií testovaného genu u tří biologických vzorků (Vzorek I, II a III) samic (F) a samců (M) (s jejich průměrem a směrodatnou odchylkou (S. D.)), které byly vypočteny za použití účinnosti referenčního genu *Ace* (E_{Ref}) a testovaného genu (E_{Gen}). V posledních dvou sloupcích se nachází kritická hodnota t-testu, kde v prvním sloupci (A / Z^{dz+}) je testován poměr 1:1 a v druhém sloupci (Z) 1:2. Výsledek kritické hodnoty nižší než 0,05 znamená významnou odlišnost od očekávaného poměru.

Linie	Gen	Pohlaví	Vzorek I	Vzorek II	Vzorek III	Průměr	S.D.	E_{Ref}	E_{Gen}	t-test	
										A / Z^{dz+}	Z
WT-C02	<i>Tan</i>	F	0,3729	0,5240	0,4669	0,4546	0,0763				
		M	0,8260	0,9252	0,8702	0,8738	0,0497	0,94	0,93	0,0013	0,7222
WT-C02	<i>6-PGD</i>	F	1,1550	1,3169	1,1353	1,2024	0,0997				
		M	2,1876	2,1756	2,1204	2,1612	0,0359	1,04	0,96	0,0001	0,1056
WT-C02	<i>Shaker</i>	F	1,1202	0,8052	0,8799	0,9351	0,1646				
		M	1,4749	1,5093	1,4769	1,4870	0,0193	1,00	0,95	0,0045	0,1145
WT-C02	<i>Kettin</i>	F	0,6988	0,5177	0,5128	0,5764	0,1060				
		M	1,0600	1,1874	0,9763	1,0746	0,1063	1,00	0,98	0,0045	0,5982
WT-C02	<i>Henna</i>	F	0,2089	0,2291	0,2332	0,2237	0,0130				
		M	0,4086	0,4115	0,4381	0,4194	0,0163	0,90	0,97	0,0001	0,1885
WT-C02	<i>Apterous</i>	F	0,8273	0,8310	0,8864	0,8482	0,0331				
		M	1,4975	1,5265	1,6277	1,5505	0,0683	0,98	0,94	0,0001	0,0566
ASF1	<i>Tan</i>	F	0,2366	0,3463	0,2779	0,2869	0,0554				
		M	0,2295	0,2001	0,2673	0,2323	0,0337	1,00	1,09	0,2184	0,0069
ASF1	<i>6-PGD</i>	F	0,6636	0,6559	0,7133	0,6776	0,0312				
		M	1,3986	1,1806	1,3424	1,3072	0,1132	1,09	1,05	0,0007	0,5550
ASF1	<i>Shaker</i>	F	0,4689	0,4889	0,5748	0,5109	0,0563				
		M	1,0376	1,0685	0,9462	1,0174	0,0636	1,12	1,10	0,0005	0,9569
ASF1	<i>Kettin</i>	F	0,3977	0,4327	0,6012	0,4772	0,1088				
		M	0,8663	1,0618	0,9411	0,9564	0,0986	1,08	1,06	0,0048	0,9893
ASF1	<i>Henna</i>	F	0,4150	0,4512	0,6054	0,4905	0,1011				
		M	0,7233	1,1008	0,9709	0,9317	0,1918	1,10	1,08	0,0244	0,7743
ASF1	<i>Apterous</i>	F	0,2076	0,2184	0,2061	0,2107	0,0067				
		M	0,3635	0,4434	0,4575	0,4215	0,0507	1,00	1,07	0,0020	0,9992
ASF2	<i>Tan</i>	F	0,4514	0,4850	0,4893	0,4752	0,0207				
		M	0,4603	0,4909	0,4050	0,4521	0,0435	1,00	1,01	0,4524	0,0001
ASF2	<i>6-PGD</i>	F	0,2931	0,2633	0,3324	0,2963	0,0346				
		M	0,7510	0,7778	0,6597	0,7295	0,0619	1,15	1,17	0,0005	0,0631
ASF2	<i>Shaker</i>	F	0,6476	0,6956	0,7304	0,6912	0,0416				
		M	1,6489	1,4456	1,5619	1,5522	0,1020	1,19	1,14	0,0002	0,0891
ASF2	<i>Kettin</i>	F	1,4410	1,3074	1,3119	1,3534	0,0758				
		M	2,9681	2,8186	2,9923	2,9263	0,0941	1,09	1,00	0,0000	0,1002
ASF2	<i>Henna</i>	F	0,3633	0,3707	0,3869	0,3736	0,0121				
		M	0,6511	0,7696	0,6719	0,6975	0,0633	0,97	0,97	0,0010	0,2725
ASF2	<i>Apterous</i>	F	0,7728	0,9169	1,0008	0,8968	0,1153				
		M	2,1408	1,9899	1,9546	2,0284	0,0989	1,19	1,12	0,0002	0,1805

ASF4	<i>Tan</i>	F	0,7256	0,8580	0,8952	0,8263	0,0892				
		M	0,7316	0,7808	0,8469	0,7864	0,0579	1,07	0,84	0,5516	0,0013
ASF4	<i>6-PGD</i>	F	1,6335	1,5125	1,6381	1,5947	0,0712				
		M	3,3387	2,9224	2,4009	2,8873	0,4699	0,94	0,84	0,0092	0,3467
ASF4	<i>Shaker</i>	F	0,4539	0,4684	0,6574	0,5266	0,1136				
		M	0,8198	0,8089	0,8602	0,8296	0,0270	0,94	0,94	0,0109	0,1658
ASF4	<i>Kettin</i>	F	0,4401	0,5147	0,5021	0,4856	0,0399				
		M	1,0952	0,9509	1,0688	1,0383	0,0768	0,95	0,92	0,0004	0,3547
ASF4	<i>Henna</i>	F	1,1809	1,1367	1,1837	1,1671	0,0264				
		M	2,1346	2,1232	2,2936	2,1838	0,0952	1,00	0,90	0,0001	0,0750
ASF4	<i>Apterous</i>	F	0,5287	0,5708	0,4050	0,5015	0,0862				
		M	0,8807	1,0666	1,1391	1,0288	0,1333	1,02	1,01	0,0045	0,8477
ASF6	<i>Tan</i>	F	0,6859	0,8829	0,5911	0,7200	0,1488				
		M	0,7518	0,7363	0,6616	0,7166	0,0482	1,02	1,01	0,9716	0,0142
ASF6	<i>6-PGD</i>	F	0,3366	0,3239	0,3289	0,3298	0,0064				
		M	0,6286	0,6861	0,6607	0,6584	0,0288	1,05	1,08	0,0000	0,9517
ASF6	<i>Shaker</i>	F	0,5468	0,5943	0,5660	0,5690	0,0239				
		M	1,3169	1,2564	1,1753	1,2495	0,0710	1,04	1,02	0,0001	0,0870
ASF6	<i>Kettin</i>	F	0,4273	0,4518	0,4830	0,4540	0,0279				
		M	0,8559	1,0331	1,0186	0,9692	0,0984	1,11	1,09	0,0010	0,4023
ASF6	<i>Henna</i>	F	0,4181	0,4133	0,4555	0,4290	0,0231				
		M	0,8851	0,9225	0,9290	0,9122	0,0237	1,06	1,04	0,0000	0,1442
ASF6	<i>Apterous</i>	F	0,4626	0,4934	0,4892	0,4817	0,0167				
		M	0,8704	1,0266	1,0079	0,9683	0,0853	0,95	0,96	0,0006	0,9310