

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta**

**Analýza vybraných W obohacených repetic u  
předivky brslenové *Yponomeuta cagnagella*  
(Lepidoptera)**

Bakalářská práce

**Aneta Pilíková**

Školitelka: RNDr. Martina Dalíková, Ph.D.

České Budějovice 2019

**Pilíková, A.**, 2019: Analýza vybraných W obohacených repetitivních sekvencí u předivky brslenové *Yponomeuta cagnagella* (Lepidoptera). [Analysis of selected W-enriched repetitive sequences in the spindle ermine moth *Yponomeuta cagnagella* (Lepidoptera). Bc. Thesis, in Czech.] – 54 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **Annotation**

This thesis focuses on the repetitive sequences located in the W chromosome of the spindle ermine moth (*Yponomeuta cagnagella*) (Lepidoptera). The copy number of the selected repeats was established in male and female genomes from two geographic populations using real-time PCR (qPCR). Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was used to localize these sequences in female pachytene nuclei. The satellite tandem repeat and the transposon *Maverick* are present in the W chromosome in high copy numbers. In contrast to previously conducted bioinformatical analyses, the rDNA cluster is probably localized in an autosome in *Y. cagnagella*. The *Maverick* transposon was detected in both extensive terminal regions of the W chromosome.

### **Čestné prohlášení**

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

České Budějovice, 11. 12. 2019

.....

Aneta Pilíková

## **Poděkování**

Velice děkuji vedoucí mé bakalářské práce Martině Dalíkové za její laskavou pomoc, podporu, trpělivost a čas, který mi věnovala, za její ochotu sdílet své odborné znalosti a provázet mě studiem.

Za dodání studijního materiálu, tedy předivek zastupující českou přírodní populaci vděčím RNDr. Petru Nguyenovi, Ph.D. Vzorke z nizozemské populace mi poskytl dhr. dr. Peter Roessingh působící na University of Amsterdam, kterému také patří srdečné poděkování.

Kolegům z naší fakultní laboratoře a stejnou měrou také spřátelenému kolektivu cytogenetiků při Entomologickém Ústavu AVČR děkuji za milé rady, příjemnou pracovní atmosféru, motivaci a veškerou jejich pomoc.

Jsem také vděčná všem svým kamarádům za jejich povzbuzující humor a vlídná slova.

V neposlední řadě na tomto místě také děkuji celé své rodině – především všem čtyřem prarodičům, mé drahé mamince a bratrovi, že mi umožnili studium na univerzitě, poskytli mi zázemí a péči, věnovali svůj čas a byli ke mně shovívaví. Domnívám se, že sem také patří vzpomínka na mého tatínka, který mě naučil lásce k přírodě. Díky tati.

## **Finanční podpora**

Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky z grantu 17-17211S

# Obsah

1	Úvod.....	3
1.1	Pohlavní chromosomy motýlů .....	1
1.2	Repetitivní sekvence .....	3
1.2.1	Tandemové repetice .....	4
1.2.2	Rozptýlené transponovatelné repetice.....	5
1.3	Analýza RepeatExplorer a vybrané sekvence .....	6
1.4	<i>Yponomeuta cagnagella</i> .....	8
2	Cíle práce .....	11
3	Materiál a metody.....	12
3.1	Pokusný organismus.....	12
3.2	Izolace DNA .....	12
3.2.1	Izolace pomocí kitu NucleoSpin .....	12
3.2.2	Izolace pomocí metody CTAB.....	12
3.3	PCR .....	13
3.4	Elektroforetická separace .....	15
3.5	Klonování a sekvenování .....	15
3.6	Příprava chromosomálních preparátů.....	16
3.7	<i>In situ</i> hybridizace .....	17
3.7.1	Příprava sond pro <i>in situ</i> hybridizace .....	17
3.7.2	Nepřímá FISH .....	19
3.7.3	TSA-FISH .....	21
3.7.4	GISH .....	22
3.7.5	Analýza preparátů .....	23
3.8	Kvantitativní PCR.....	23
3.9	Southernova hybridizace .....	26
4	Výsledky .....	28
4.1	Lokalizace studovaných sekvencí .....	28
4.2	Srovnání počtu kopií vybraných repetic v genomu.....	32
4.3	Charakteristika vybrané tandemové repetice .....	34
5	Diskuze.....	37
5.1	Hybridizace <i>in situ</i> .....	37
5.2	Průběh qPCR.....	38
5.3	Geny ribosomální DNA .....	39
5.4	Transpozon <i>Maverick</i> .....	40
5.5	Satelitní tandemová repetice .....	41
6	Závěr .....	44
7	Seznam použité literatury .....	45
8	Přílohy .....	51

# 1 Úvod

Tato práce se zabývá studiem repetitivních sekvencí na pohlavním chromosomu W u předivky brslenové (*Yponomeuta cagnagella*, Hübner 1813). Předivky patří do čeledi předivkovití (Lepidoptera: Yponomeutidae) a jsou to významní herbivorní škůdci s holoarktickým rozšířením, kteří budí pozornost vědecké komunity kvůli zajímavým speciálním událostem a neobvyklé konstituci pohlavních chromosomů. Důležitou roli v procesech evoluce a speciace hrají právě pohlavní chromosomy, o jejichž sekvenčním obsahu ale máme prozatím kusé informace. Mezi českou a nizozemskou populací předivky *Yponomeuta cagnagella* byl bioinformatickou analýzou predikován rozdíl v četnosti některých repetitivních sekvencí korelující s pohlavím. Vybrané repetyce byly v této bakalářské práci ověřovány cytogenetickými a molekulárními metodami.

## 1.1 Pohlavní chromosomy motýlů

Typickým znakem systematické skupiny Amphiesmenoptera, kterou tvoří motýli (Lepidoptera) a jejich sesterská skupina chrostíci (Trichoptera), jsou chromosomy bez primární konstrikce nazývané holokinetické. Kinetochor, k němuž se připojují mikrotubuly dělicího vřeténka, pokrývá téměř celou délku chromosomů (Wolf a kol. 1997). Ve srovnání s ostatními šestinohými (Hexapoda) je genom motýlů tvořen velkým množstvím chromosomů, za ancestrální a modální karyotyp je považováno  $n = 31$  (Lukhtanov 2000). Většina zkoumaných druhů má počet chromosomů blízký ancestrálnímu (Prins a Saitoh 2012; Blackmon a kol. 2017), ale existuje zde i řada výjimek. Například motýli *Hypothyris thea* a *Agathylamus aryxna* mají v haploidním jádře pouhých 5 chromosomů (shrnuto v Marec a kol. 2010). Nejvyšší počet chromosomů nejen mezi motýly, ale v rámci všech živočichů byl nalezen u modráška *Polyommatus atlantica* a to  $n = 224-226$  (Lukhtanov 2015). Chromosomy motýlů jsou tvarem uniformní, těžko od sebe odlišitelné a malé (Marec a kol. 2010).

Heterogametickým pohlavím jsou u Amphiesmenoptera samice, které mají konstituci pohlavních chromosomů WZ nebo Z0, zatímco samec má dva chromosomy Z. Tento systém určení pohlaví se nazývá *Abraxas*, podle skvrnopásníka angreštového *Abraxas grossulariata* (Kaiser a Bachtrog 2010). Vyskytuje se také u ptáků, hadů a některých dalších plazů, obojživelníků a ryb (shrnuto v Schartl a kol. 2016). Způsob determinace pohlaví s heterogametickými samicemi je u motýlů evolučně konzervovaný už 180 milionů let

(Sahara a kol. 2012), zároveň je ale mezi hmyzem výjimečný – vyskytuje se dále jen u dvoukřídlých čeledi Tephritidae (Blackmon a kol. 2017).

V rámci řádu Lepidoptera se vyskytují rozmanité odchylky v konstituci pohlavních chromosomů, a proto jsou motýli vhodnou skupinou pro studium mechanismu jejich evoluce. Pohlavní určení ♀Z0/♂ZZ se vyskytuje u chrostíků (Trichoptera), bazálních čeledí motýlů, pravděpodobně také společného předka všech zástupců Lepidoptera (Lukhtanov 2000; Traut a Marec 1996) a sekundárně se objevuje i u odvozenějších druhů, například u některých populací martináče *Samia cynthia* (Yoshido a kol. 2005). Nejčastější konstituce pohlavních chromosomů u motýlů ♀WZ/♂ZZ byla nalezena i u modelového organismu bource morušového (*Bombyx mori*) (Tanaka 1916; Kawamura a Niino 1991). Jsou známy i druhy s více chromosomy W, příkladem budiž samice obaleče *Bactra lacteana*, která má tři pohlavní chromosomy W<sub>1</sub>W<sub>2</sub>Z (Suomalainen 1969). Objevují se i motýli s násobným počtem Z chromosomu, například některé druhy předivek (Yponomeutidae) mají konstituci pohlavních chromosomů ♀WZ<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>/♂Z<sub>1</sub>Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>2</sub> (Nilsson a kol. 1988). Stejný způsob byl objeven i u fylogeneticky vzdáleného motýla *Trabala vishnou* (Lasiocampidae) (Rishi a kol. 1999). Samice bělásků rodu *Leptidea* mají unikátní karyotyp s extrémními počty pohlavních chromosomů, které tvoří v meióze multivalent – W<sub>1</sub>W<sub>2</sub>W<sub>3</sub>Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>3</sub>Z<sub>4</sub> u druhu *L. juvernica*, W<sub>1</sub>W<sub>2</sub>W<sub>3</sub>Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>3</sub> u *L. sinapis* a W<sub>1</sub>W<sub>2</sub>W<sub>3</sub>W<sub>4</sub>Z<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>Z<sub>3</sub>Z<sub>4</sub> u *L. reali* (Šichová a kol. 2015).

**Chromosom Z** motýlů se podobá autosomům, je tvořen především euchromatinem a bývá často největším chromosomem v komplementu. Z chromosom nese také řadu pohlavně vázaných genů, které jsou exprimovány především v testes. Tyto geny jsou evolučně poměrně konzervovány (Sahara a kol. 2012), až na výjimky panuje v rámci motýlů syntenie (Dalíková a kol. 2017a).

**Chromosom W** se vyskytuje asi u 98 % všech druhů motýlů (Traut a kol. 2007) a jeho evoluční původ je nejasný. Dlouho převládající hypotézou byl vznik W chromosomu u společného předka Ditryisia a Tischeriidae odhadem před 100 miliony let (Sahara a kol. 2012). Současné poznatky ovšem ukazují spíše na nezávislý vznik W u těchto skupin. U Tischeriidae došlo nejspíše k fúzi chromosomu Z a autosomu za vzniku tzv. neo-Z, přičemž bývalý homologní autosom párující se s neo-Z se stal chromosom W. W chromosom pokročilých Dytrisia (po oddělení čeledí Psychidae a Tineidae) pravděpodobně vznikl z nadbytečného B chromosomu, který se začal párovat se Z chromosomem (Dalíková a kol. 2017a).

Chromosom W je často z velké části tvořen konstitutivním heterochromatinem (Traut 1999) a v interfázních jádrech tvoří heterochromatinové tělísko, tzv. sex chromatin (Traut a Marec 1996), což ale není, na rozdíl od savců, důsledkem kompenzace genové dávky. Od partnerského chromosomu Z se W často liší tvarem nebo velikostí a je bohatý na repetitivní DNA – hromadí se na něm satelity, mobilní elementy a inserty mitochondriální DNA (Traut a kol. 2007; 2013).

Obtížnost studia repetitivních sekvencí DNA zapříčiňuje, že W chromosom bývá opomíjen při sekvenačních projektech a je prozatím málo prozkoumán (Sahara a kol. 2012; Traut a kol. 2013). Doposud bylo na W nalezeno pouze málo protein-kódující genů. Jedním z nich je například gen *period* (*per*) u martináče *Antheraea pernyi*, který je důležitý pro funkci cirkadiálních hodin. Gen má funkční kopii na chromosomu Z, avšak několik homologů *per* se nachází na W a jsou transkripčně aktivní. Absence v homogametickém pohlaví však dokazuje, že *per* na chromosomu W není pro organismus esenciální (Gotter a kol. 1999). Dalším genem, jehož sekvence byla prokázána na W, je *laminin A* u drsnokřídlece březového (*Biston betularia*), jež se na W dostal ektopickou rekombinací, tedy výměnou částí DNA mezi nehomologními chromosomy (Van't Hof a kol. 2013). Dlouho diskutovaným byl *Feminizer* (*Fem*) neboli feminizační faktor, což jsou piwi-interacting RNA (piRNAs) tandemově řazené v malém regionu určujícím pohlaví na W chromosomu. U bource morušového (*B. mori*) se v ovariích exprimuje *Fem* jakožto signál pro samičí pohlaví v zárodečné linii. *Fem* piRNA tlumí mRNA genu *Masculiner* (*Masc*), čímž je ovlivněn sestřih *doublesex* transkriptu a embryo se dále vyvíjí jako samice (Kiuchi a kol. 2014).

U samic motýlů nedochází v meióze k rekombinaci, neformují se chiasmata a probíhá tzv. achiasmatická meióza. Chromosomy WZ se v meiotické profázi I úplně párují, přestože nejsou homologní. Chromosomy se navzájem délkově přizpůsobí a vzniká plný synaptonemální komplex po celé délce chromosomů (Marec a Traut 1993) a tento WZ bivalent (u některých druhů trivalent či multivalent) je držen pohromadě až do anafáze I, kdy se chromosomy rozejdou (Traut a Marec 1996).

## 1.2 Repetitivní sekvence

Repetitivní DNA tvoří významnou frakci genomu mnoha eukaryot. Dělí se na dvě základní skupiny – tandemové repetice a mobilní elementy (Charlesworth a kol. 1994).

### 1.2.1 Tandemové repetice

Tandemové repetice jsou úseky DNA, které se řadí jeden těsně za druhým, přičemž počet opakování monomerů a délka jednotlivých motivů je variabilní. Patří sem takzvané satelitní repetitivní sekvence, které se dělí na mikrosatelity, jejichž jednotlivé monomery mají do 10 bazí, dále minisatelity, které se opakují v úsecích po 10-100 bazích, a pravé satelity, kde je monomer tvořen z více než 100 nukleotidů. Zatímco nejdelší známý úsek chromosomu tvořený jediným satelitem je kolem 100 Mb, jeden opakující se motiv může dosahovat délky až 40 kb (King a Cummings 1997). Satelity bývají umístěny v oblastech tvořených heterochromatinem, kde mají významnou strukturální funkci (Plohl a kol. 2008; Ferreira a kol. 2015). Přestože se nalézají v heterochromatinových oblastech, může docházet k jejich expresi. Transkripty satelitů u kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* slouží k udržování centromerického heterochromatinu pomocí RNA interference, což je důležité pro funkci centromery při buněčném dělení (Volpe a kol. 2002). Exprese satelitní DNA u myši způsobuje přestavby heterochromatinu (Casanova a kol. 2013).

U motýlů není satelitní DNA příliš prostudována. Příkladem satelitu známého u motýlů budiž CpSAT-1, který je transkribován ve všech tkáních všech stádií obaleče jablečného (*Cydia pomonella*), ale nemá v organismu jasnou funkci. Přestože W chromosom je největším heterochromatinovým blokem v genomu obaleče, CpSAT-1 není obohacen na W a více kopií se nachází na chromosomu Z (Věchtová a kol. 2016). Opačná situace je u PiSAT1 – satelitní repetice zavíječe paprikového (*Plodia interpunctella*), jehož tandemové kopie jsou abundantní na chromosomu W. PiSAT1 se exprimuje v různých vývojových stádiích a vzniká polyadenylovaný transkript, jehož funkce nebyla zatím odhalena (Dalíková a kol. 2017b).

Tandemově uspořádané jsou často i sekvence genů, které je třeba exprimovat rychle a ve velkém množství. Tuto repetitivní povahu mají například geny kódující ribosomální DNA (tzv. rDNA). Vyskytují se v genomu v desítkách až tisících kopií shromážděných v konzervovaných klastrech, které vytváří region organizátoru jádérka („nucleolus organiser region“; NOR) (Nelson a kol. 2019). rDNA jsou přepisovány do rRNA a společně s proteiny tvoří strukturu ribosomů. Hlavní ribosomální rDNA transkripční jednotka eukaryot obsahuje geny pro 18S, 5,8S a 28S, které jsou pojmenovány podle sedimentační konstanty.

Distribuce rDNA genů byla u motýlů studována s myšlenkou odhalení potenciálních chromosomálních přestaveb. Ukázalo se však, že lokalizace rDNA je napříč řádem



Lepidoptera variabilní a liší se i mezi fylogeneticky příbuznými druhy (Nguyen a kol. 2010; Šíchová a kol. 2013; Hladová 2015). Jeden terminální klastr rDNA na autosomálním bivalentu je u Amypiesmenoptera pravděpodobně ancestrální stav, který byl nalezen mimo jiné u chrostíka *Glyphotaelius pellucidus* (Hladová 2015). Bourec morušový (*B. mori*) má jeden intersticiální NOR. Pokud má organismus dva regiony organizátoru jadérka, bývají na terminálních koncích jednoho autosomu. Tento stav byl nalezen například u obaleče jablečného (*Cydia pomonella*) (Fuková a kol. 2005). Předivka brslenová (*Yponomeuta cagnagella*) má stejně jako předivka zhoubná (*Y. evonymella*) dva terminální rDNA klastry na dvou různých bivalentech. U předivky menší (*Y. plumbella*) byl odhalen jeden intersticiální klastr na jediném autosomálním bivalentu (Hladová 2015). Blízkými příbuznými předivek jsou zástupci z čeledi Plutellidae (Sohn a kol. 2013), z nichž byl testován západníček polní (*Plutella xylostella*) a byl u něj nalezen jeden terminální klastr (Hladová 2015). Pro motýly netypický stav byl objeven u obalečika jednopásného (*Eupoecilia ambiguella*). Jediný rDNA klastr se u tohoto druhu nachází na konci nejdelšího bivalentu a to jak na preparátu pachytenních spermatocytů, tak pachytenních oocytů. NOR je tedy lokalizován na terminálním konci obou pohlavních chromosomů (Šíchová a kol. 2013). Podobně tomu je u okáče *Bicyclus anynana*, který má dva NOR – jeden na kruhovém bivalentu WZ a druhý na autosomálním bivalentu (Van't Hof a kol. 2008).

### 1.2.2 Rozptýlené transponovatelné repetice

Mobilní neboli transponovatelné elementy jsou roztroušeny po celém genomu, mají schopnost se replikovat a pohybovat, čímž navozují mutagenezi a mají tak významný evoluční potenciál (Slotkin a Martienssen 2007; Schaack a kol. 2010; Symonová a kol. 2013). Značná část repetitivní DNA na W chromosomu je tvořena právě mobilními elementy u *Cydia pomonella* (Fuková a kol. 2007), u *Bombyx mori* (Abe a kol. 2005; 2010) a také u *Ephestia kuehniella* (Traut a kol. 2013).

Transpozony jsou klasifikovány do dvou hlavních tříd (Wicker a kol. 2007). První z nich jsou retrotranspozony, které mají schopnost se množit kopírováním sebe sama. Jejich šíření začíná expresí retrotransposonu, podle RNA transkriptu jsou syntetizovány proteiny v něm kódované a dále je využito k syntéze komplementární DNA, která vzniká reverzní transkripcí a je inkorporována na nové místo v genomu. Mobilní elementy druhé třídy se nazývají DNA transpozony a rozdělují se na dvě podtřídy. Většina ze známých DNA

transpozonů patří do podtřídy 1, pro něž je typické šíření mechanismem „cut and paste“. Jejich sekvence je ohraničena terminálními invertovanými repeticemi („terminal inverted repeats“; TIR), které jsou rozpoznávány enzymem transportázou. V místě TIR regionů dochází k přestřižení DNA dvoušroubovice na obou stranách elementu a následně je celý vystřižený úsek přemístěn do jiné části DNA řetězce (Wicker a kol. 2007; Kim a kol. 2012). DNA transpozony podtřídy 2 jsou elementy, které jsou schopny transpozice bez sestřihu dvouřetězcové DNA. Šíří se mechanismem excise jednořetězcového vlákna, extrachromosomální amplifikací a integrací do nového chromosomálního lokusu. Na rozdíl od retrotranspozonů tedy nevytváří RNA meziproduct (Dupuy a kol. 2011). Jednou ze skupin DNA transpozonů, které využívají tuto strategii, jsou transpozony *Maverick*, známé také pod názvem *Polinton*. Tyto transpozony se běžně vyskytují mezi bezobratlými a byly nalezeny i u jiných skupin eukaryot, nikoli však u rostlin (Pritham a kol. 2007). Jsou zpravidla mnohem větší než ostatní známé mobilní elementy. Mívají 10-20 kb a jsou ohraničeny dlouhými TIR (400 – 700 bp) (Wicker a kol. 2007). V transposonu *Maverick* je zakódováno 5 až 11 různých proteinů, jedním z nich je C-integráza podobná integráze retroelementů. Postrádají ovšem reverzní transkriptázu a ostatní otevřené čtecí rámce („open reading frame“; ORF) typické pro retrotranspozony (Wicker a kol. 2007; Pritham a kol. 2007; Krupovic a Koonin 2015). Některé proteiny *Maverick* transpozonů jsou homologní s proteiny virálních kapsid, a proto se zdá, že fylogeneticky zapadají mezi invazní DNA viry a eukaryotické lineární plasmidy (Pritham a kol. 2007; Krupovic a Koonin 2015).

### 1.3 Analýza RepeatExplorer a vybrané sekvence

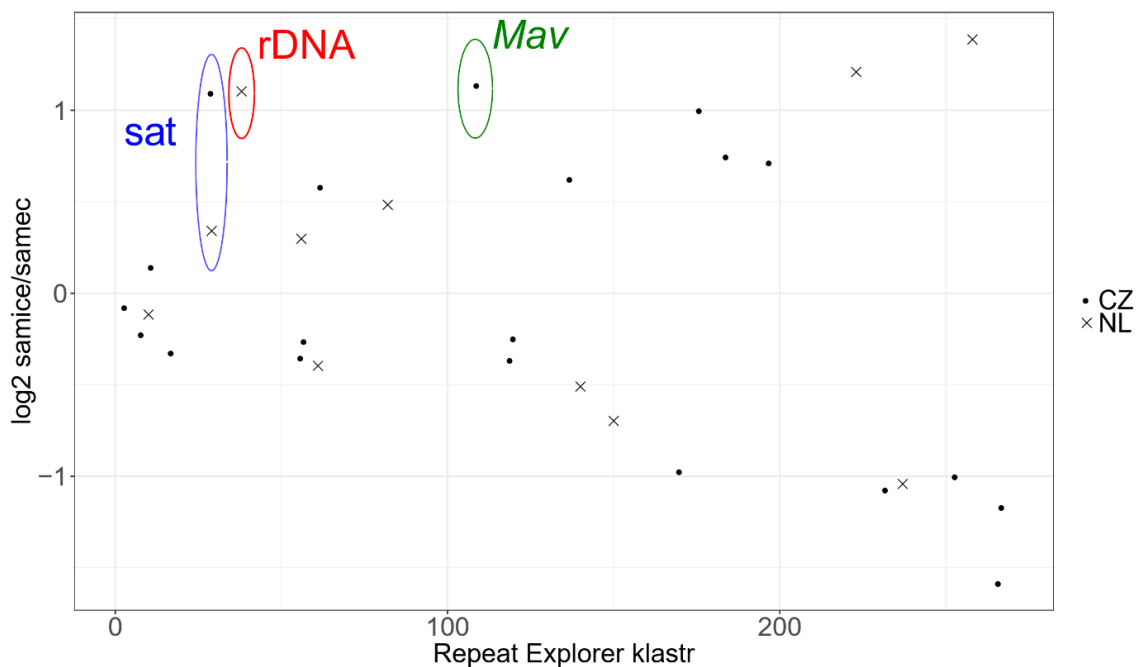
Tato práce ověřuje nepublikované výsledky analýz, které provedla Martina Dalíková s pomocí bioinformatického nástroje RepeatExplorer (<http://repeatexplorer.org/>, Novák a kol. 2013). Tento program umožňuje studium repetitivní složky genomu z neposkládaných sekvencí.

Analyzovány byly Illumina sekvence genomu dvanácti jedinců předivky brslenové (*Yponomeuta cagnarella*) – tři samic a tři samců z české populace a paralelně tři samic a tři samců zastupujících nizozemskou populaci. U některých repetitivních sekvencí byl detekován nápadný rozdíl v počtu kopií mezi samci a samicemi (**Obr. 1**). Jelikož se genom samce a samice liší právě chromosomem W, lze z rozdílů v počtu kopií dedukovat, že se dané repetice nacházejí na samičím chromosomu W.

První vybranou repeticí je satelit, který se zdá obohacen u samic obou geografických populací, nicméně výsledky RepeatExplorer analýz mohou naznačovat jeho hojnější přítomnost na chromosomu W u českých samic. Předpokládaná délka monomeru je 744-764 bp.

Další studovanou repetitivní sekvencí byl klastr genů pro rDNA. Podle bioinformatických dat nemají samci a samice nizozemské populace *Yponomeuta cagnagella* stejné množství ribosomálních genů, přičemž největší rozdíl vykazuje sekvence 28S rDNA.

Poslední repeticí potenciálně obohacenou na chromosomu W je transpozon *Maverick*, který se jeví namnožen v genomu českých samic. Obvyklá délka *Maverick* je přes 10 kb (viz kapitolu 1.2.2). Klastr z RepeatExplorer analýz však obsahoval jen několik konsensus sekvencí, z nichž nejdelší byly dva částečné úseky tohoto transpozonu v práci označované jako *Mav1* (2318 bp) a *Mav2* (2073 bp), které byly při experimentech testovány zvlášť, s předpokladem, že budou vykazovat obdobné výsledky.



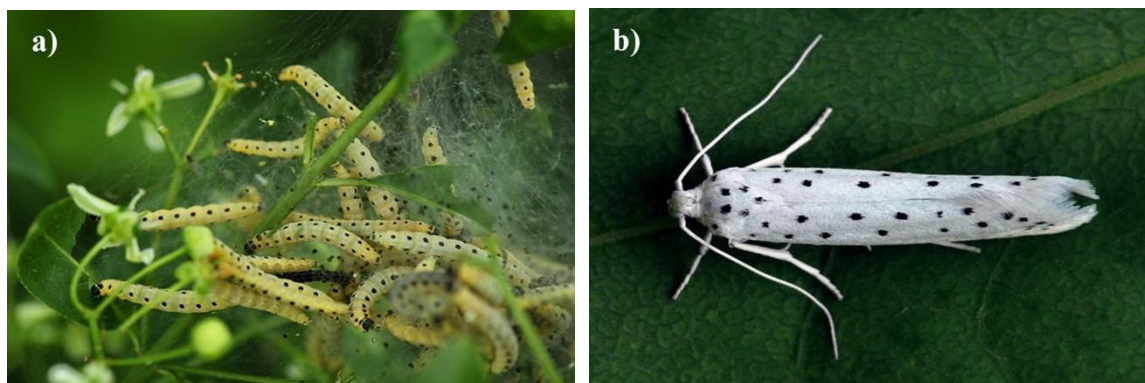
**Obrázek 1:** Graf znázorňující výsledky analýzy RepeatExplorer. Na ose x jsou zastoupeny detekované klastry repetitivních sekvencí v genomu předivky brslenové, osa y zobrazuje logaritmovaný poměr průměrného počtu čtení („Illumina reads“) ze samic a samců v jednotlivých klastrech. Vynesené jsou pouze hodnoty se statisticky významným rozdílem mezi pohlavími (*t-test*, *p-hodnota* < 0,05). **CZ** – česká populace, **NL** – nizozemská populace. Pokud se symboly nachází nad hodnotou 0, je vybraná sekvence obohacena v genomu samic. Vybrané sekvence jsou vyznačeny elipsami. Satelit je obohacen u samic obou geografických populací (modrá), rDNA je abundantní v genomu nizozemských samic (vyznačen červeně) a transpozon *Maverick* se hojně vyskytuje u samic české populace (zelená).

#### 1.4 *Yponomeuta cagnagella*

Předmětem studia této práce byl drobný motýl předivka brslenová (*Yponomeuta cagnagella*, Hübner1813), běžný škůdce vyskytující se napříč Evropou včetně Británie, v Malé Asii, na Středním východě i na Sibiři (Carter a Spencer 1986). V šedesátých letech byl druh zavlečen do Severní Ameriky (Turner a kol. 1975).

Předivka brslenová obývá řídké listnaté lesy s křovinným podrostem, křovinaté stráně, ruderální biotopy podél silnic a také parky s výsadbou brslenu. Vyskytuje se lokálně ale hojně a má jednu generaci za rok (Menken a kol. 1992). Samice kladou vajíčka na větve živné rostliny od poloviny do konce července. Larvy se líhnou zhruba po dvou týdnech, ale

zůstávají pod ztvrdlými vaječnými obaly a přezimují. Na konci dubna či začátku května se objeví první instary housenek, které minují v čerstvých listech. Starší larvy žijí pospolitě, koloniálně, opřádají svými vlákny hustě celé keře (viz **Obr. 2a**) a požírají jejich listy. Od poloviny června se kuklí do kokonů volně spojených s hedvábnou sítí na rostlině. Zhruba po dvou týdnech vylétají dospělci (viz. **Obr. 2b**), krátce nato se páří.



**Obrázek 2:** Předivka brslenová (*Yponomeuta cagnagella*). **a)** Housenky v zápředku na živné rostlině. Larvy posledního instaru mají 20-23 mm, jsou zelenožluté se dvěma řadami černých teček na dorzální straně těla (foto: Stanislav Krejčík). **b)** Přední křídla dospělého jsou světlá s černými tečkami, zadní křídla jsou šedá s bílými třásněmi na koncích. Tykadla jsou nitkovitá. (foto: František Šaržík).

**a) i b)** staženo z webové stránky: <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id45763/>; 17. 11. 2019

Rod *Yponomeuta* zahrnuje 76 popsaných druhů (Ulenberg 2009) mezi nimiž jsou někteří závažní škůdci. Housenky žijí koloniálně, mohou lokálně způsobit kompletní odlistění a následný úhyn stromů, což z nich činí ekonomicky významnou skupinu (Menken a kol. 1992; Kavčíč a Kolšek 2016). *Y. cagnagella* patří do komplexu pěti druhů kolem předivky ovocné (*Y. padella*), mezi nimiž je velká morfologická podobnost, žijí sympatricky a lze je křížit v laboratorních podmínkách (Löfstedt a kol. 1991; Hora a kol. 2005; 2019). Živnou rostlinou společného předka druhů rodu *Yponomeuta* byl pravděpodobně brslen evropský (*Euonymus europaeus* L.) náležící do čeledi jesencovitých (*Celastraceae*) (Gerrits-Heybroek a kol. 1978). U části druhů včetně komplexu předivek příbuzných *Y. padella* došlo ke změně hostitelské rostliny na některé zástupce čeledi *Rosaceae* (Gerrits-Heybroek a kol. 1978; Raijmann a Menken 2000; Turner a kol. 2010). Pozoruhodné je, že

tuto změnu hostitelské rostliny prodělal i druh *Y. cagnagella*, který se ovšem druhotně vrátil k původní živné rostlině *Euonymus europaeus*. Důkazem je zvýšený počet receptorů na makadlech larev, a tudíž zvýšená senzitivita na benzaldehyd přítomný u *Rosaceae* ale chybějící u hostitelského brslenu (Roessingh a kol. 2007).

Předivky jsou již od sedmdesátých let dvacátého století hojně užívaným modelem pro studium speciace a evoluce na úrovni hmyz-hostitelská rostlina. Změny hostitelské rostliny jsou důsledkem speciálních událostí (Menken a kol. 1992), které bývají spojené s evolucí pohlavních chromosomů (Howard a Berlocher 1998). Radiační speciace předivek rodu *Yponomeuta* je studována skrze mezidruhovou hybridizaci a analýzu rozdílů v chromosomální struktuře (Bakker a kol. 2011; Hora a kol. 2019).

Většina předivek disponuje neobvyklým počtem chromosomů, který je odlišný u samce a samice  $2n = \text{♂}62/\text{♀}61$ . Samice mají 29 párů autosomů a tři pohlavní chromosomy, které v meióze tvoří trivalent, zatímco samci disponují 31 chromosomálními páry. Pohlaví předivek je tedy určeno  $\text{♀}WZ_1Z_2/\text{♂}Z_1Z_1Z_2Z_2$  (Nilsson a kol. 1988; Veselá 2012). W chromosom se fúzí spojil s autosomem za vzniku neo-W, který se nadále pároval s chromosomem  $Z_1$ , ale také s homologem autosomu, ze kterého se stal chromosom  $Z_2$ . Samice produkují dva typy vajíček, první nese pohlavní chromosom neo-W a druhý má v haploidní sadě  $Z_1Z_2$  (Hladová a kol. 2017).

## 2 Cíle práce

Ačkoli se pohlavní chromosomy vyvinuly nezávisle u mnoha skupin živočichů i rostlin, sdílejí řadu společných vlastností. Častým jevem spojujícím chromosomy W a Y je hromadění satelitů a mobilních elementů. V poslední době dochází navíc k akumulaci důkazů, že i tato složka pohlavních chromosomů navzdory předchozím předpokladům může hrát významnou regulační roli (například Lemos a kol. 2008). Motýli (Lepidoptera) představují druhově nejbohatší skupinu živočichů s heterogametickými samicemi, přesto o složení jejich pohlavních chromosomů W máme většinou jen kusé informace. Příčinou jsou zejména těžkosti spojené se skládáním repetitivních oblastí genomu. Díky nástroji RepeatExplorer je však možné predikovat repeticity obohacené u jednoho pohlaví přímo z nesložených sekvencí, což otevírá nové možnosti pro analýzu satelitů a mobilních elementů na chromosomu W. Předběžná bioinformatická analýza sekvenačních dat ze dvou populací předivky brslenové ukázala nejen přítomnost potenciálních W obohacených repetitivních sekvencí, ale i jejich zajímavé mezipopulační rozdíly (kapitola 1.3).

Cílem této bakalářské práce byla analýza vybraných W obohacených sekvencí u české a nizozemské populace předivky brslenové. Dílčími cíli bylo:

- a) ověřit přítomnost, abundanci a lokalizaci těchto vybraných repetitivních sekvencí na chromosomu W pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH),
- b) porovnat množství vybraných sekvencí mezi pohlavími a mezi českou a nizozemskou divokou populací předivky brslenové za využití kvantitativní polymerázové řetězové reakce (tzv. qPCR),
- c) ověřit tandemový charakter vybrané satelitní sekvence pomocí Southernovy hybridizace.

## **3 Materiál a metody**

### **3.1 Pokusný organismus**

Jedinci *Yponomeuta cagnagella* pocházeli ze dvou geograficky oddělených divokých populací a byli sbíráni během pozdního jara v letech 2018 a 2019. Vzorky z nizozemské populace pochází z Amsterdamu a předivky zastupující českou přírodní populaci byly pořízeny v jihočeské obci Levín. Zvířata byla chována po několik dní s přístupem k živné rostlině, kterou je brslen evropský (*Euonymus europaeus*).

### **3.2 Izolace DNA**

K získání DNA byly použity zbytky larválních tkání po přípravě chromosomálních preparátů nebo kukly, které byly prudce zmrazeny v tekutém dusíku a do dalšího použití uchovávány při -20 °C. Pro izolaci DNA byly využity dvě následující metody.

#### **3.2.1 Izolace pomocí kitu NucleoSpin**

Celková DNA byla z organismu získána pomocí kitu NucleoSpin DNA Insect (Macherey-Nagel, Německo). Pokyny výrobce byly dodrženy s výjimkou počáteční homogenizace tkáně. Zmrzlá tkáň byla sterilně přemístěna do zkumavky se 100 µl pufru Elution Buffer BE a 40 µl pufru Buffer MG, pomocí plastového tloučku rozmělněna a po přidání 10 µl dodané proteinázy K ponechána 20 minut inkubovat při pokojové teplotě. Následoval postup dle protokolu od výrobce. Stanovení koncentrace získané DNA proběhlo na fluorometru Qubit 3.0 (ThermoFisher Scientific, USA). Pouze vzorky s koncentrací vyšší než 5ng/µl byly použity k dalším experimentům. Získaná DNA byla skladována při -20 °C a následně využita při běžné a kvantitativní PCR. Použití komerčního kitu bylo rychlejší než využití metody CTAB, popsané v kapitole 3.2.2, nicméně získaná DNA měla nižší koncentrace.

#### **3.2.2 Izolace pomocí metody CTAB**

Pro získání více koncentrované DNA byl využit postup založený na extrakci DNA díky hexadecyltrimethylamoniumbromidu, zkráceně CTAB (Murray a Thompson 1980).

Tkáň byly rozmělněny sterilním tloučkem v 1 ml homogenizačního pufru (2% CTAB, 100 mM TrisHCl, 1,4 M NaCl, 40 mM EDTA, 0,2% 2-merkptoethanol, 0,1 mg



proteináza K (Sigma-Aldrich); pH 8) a ponechány inkubovat přes noc ve 37 °C za stálého míchání s intenzitou 300 rpm.

Směs byla druhý den přečištěna přidáním stejného objemu chloroformu a následnou centrifugací 10 minut při 4 °C při maximálních otáčkách. Horní vodná fáze byla odebrána do finální zkumavky a po přidání 10 µg RNázy A (Sigma-Aldrich) byla inkubována ve 37 °C 30 min. Následně bylo přidáno 2/3 objemu isopropanolu a směs byla ponechána srážet 2-4 hodiny při pokojové teplotě. Vznikla bílá sraženina, která po centrifugaci 15 min ve 4 °C na maximální otáčky vytvořila pelet na dně zkumavky. Po odstranění supernatantu byl pelet 2x promyt 70% ethanolem a po oschnutí byl rozpuštěn v TE pufru (10 mM Tris, 1 mM EDTA; pH 8) v množství úměrném velikosti peletu v rozsahu 30-70 µl. Rozpuštění bylo krátce urychleno teplotou 60 °C a mícháním na termobloku, poté byla izolovaná DNA umístěna do 4 °C přes noc.

Koncentrace a čistota DNA byla měřena jak na Qubit 3.0, tak na spektrofotometru Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, USA), kterým byla ověřována případná kontaminace proteiny a RNA. CTAB izolací byly získány vzorky s vyšší koncentrací DNA, což umožnilo jejich další využití při genomové *in situ* hybridizaci (viz kapitolu **3.7.4**) a Southernově hybridizaci (kapitola **3.9**). Také tato DNA byla uchovávána v -20 °C.

### **3.3 PCR**

Polymerázová řetězová reakce byla používána pro amplifikace potřebných DNA sekvencí. Jako templát sloužila buďto celogenomová DNA různých jedinců nebo plasmidová DNA se zaklonovanou sekvencí pro výrobu hybridizačních sond. Primery byly navrženy pomocí softwaru Geneious 11.1.4 (Biomatters, Auckland, Nový Zéland), vyrobeny firmou Generi Biotech s.r.o. (Hradec Králové, Česko) a jejich přehled je uveden v **Tabulce I**. Jejich optimální nasedací teplota byla vždy nejprve testována gradientem teplot v termocycleru.

Příprava PCR reakcí vždy probíhala na ledu. Každá reakce o objemu 20 µl obsahovala 5-50 ng DNA, 1x ExTaq pufr, 1 µM forward a 1 µM reverse primeru, 20 µM od každého nukleotidu (New England BioLabs, USA) a 1 U ExTaq polymerázy (TaKaRa, Japonsko). V některých případech byla pro PCR použita polymeráza OneTaq. V takovém případě 20µl reakce obsahovala DNA v množství nejméně 5-50 ng, 1x OneTaq pufru, od každého primeru 1 µM, 20 µM každého ze čtyř nukleotidů a 1 U OneTaq polymerázy Quickload (New England BioLabs, USA). Při každé PCR byla provedena negativní kontrola bez templátové DNA.

Amplifikace probíhala v termocycleru Biometra TAdvanced, teplotní profil reakce byl následující: DNA byla nejprve zdenaturována 1-3 minuty při 94 °C, následovalo 30 cyklů opakujících denaturaci v 94 °C 30 sekund, dále nasedání primerů za teploty uvedené v **Tabulce I** po dobu 30 sekund. Dalším krokem při PCR byla elongace probíhající při 72 °C při použití polymerázy ExTaq, elongační teplota pro polymerázu OneTaq byla 68 °C. Doba elongace se odvíjela dle délky PCR produktu, bylo počítáno s 60 sekundami na 1000 nukleotidů. Na závěr proběhla finální elongace za teploty vhodné pro použitou polymerázu 3-5 minut (podle délky produktu) a přístroj ochladil reakce na 4 °C.

**Tabulka I:** Přehled primerů použitých pro amplifikaci.

Název sekvence	Velikost PCR produktu	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Nasedací teplota	Původ
18S	2129 bp	TCTTTTGTGCGCG TGTTGAG	CGCGGATTTTG AACCCATCG	63 °C	tato práce
28S	3337 bp	GCAGATCTTGGT GGTAGTAGCA	GATGTACCGCC CCAGTCAAA	60 °C	Carabajal Paladino, nepublikován o
satelit	variabilní délka monomeru	TTGTTTACCGGCC GATTTGG	TCGGCTTCATA GGATGGCTG	63 °C	tato práce
<i>Maverick 1</i>	1927 bp	ACCCGGCTAAAC ACCTGAAG	TCACCGGAATC GTTGACCAC	63 °C	tato práce
<i>Maverick 2</i>	1933 bp	TGTCCTTTCGCCT GCATGAT	AGAAGGGATTG CTTCAGTGTGT	63 °C	tato práce
M13 universální	dle insertu	CGCCAGGGTTTT CCCAGTCACGAC	CAGGAAACAGC TATGAC	57 °C	dostupné v naší laboratoři

Po elektroforetické separaci (kapitola 3.4), při které došlo k ověření délky vzniklého produktu, byly PCR reakce přečištěny pomocí kitu Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, USA). Byl dodržen postup uveden v návodu výrobce, pouze v případech, kdy bylo pro další účely zapotřebí získat větší koncentrace DNA, byl produkt eluován do menšího objemu vody. Koncentrace byla měřena na fluorometru Qubit 3.0.

### 3.4 Elektroforetická separace

Kontrola velikosti PCR produktů, ověření funkčnosti primerů, nepřítomnosti RNA či efektivita nick translace, byly prováděny metodou elektroforetické separace na 1% agarózovém gelu v 1x TAE pufru (Tris-Acetate-EDTA; 40 mM Tris, 20 mM kyseliny octové, 1 mM EDTA; pH 8). Příslušné množství agarózy bylo v mikrovlnné troubě rozpuštěno v TAE pufru, po ochlazení byl přidán ethidium bromid v množství 0,2-0,5  $\mu\text{g}$  na 100 ml gelu, díky němuž mohla být DNA později vizualizována. Gel byl nalit do plastové vaničky a na kraj byly umístěny hřebínky, které v gelu vytvořily jamky. Po ztuhnutí byla vanička vložena do elektroforetického zařízení a zalita TAE puftrem. Do vzniklých jamek byl nanášen velikostní standart – Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (ThermoFisher Scientific, USA), v některých případech PCR BIO Ladder I (PCR Biosystems, Velká Británie). Pokud byla pro PCR upotřebena OneTaq polymeráza, byl do jamek aplikován přímo získaný PCR produkt, při použití ExTaq bylo nutné vzorky obarvit pomocí Gel Loading Dye Blue (New England BioLabs, USA). Gelová elektroforéza probíhala při napětí 110 V a rozdělila PCR produkty podle velikosti. Gel byl vyfocen na UV fotodokumentačním zařízení.

### 3.5 Klonování a sekvenování

Metoda klonování byla využita za účelem zisku kopie dané sekvence, nutné pro výrobu sond na *in situ* hybridizace. Do bakteriálního vektoru byly zavedeny PCR produkty získané amplifikací s pomocí specifických primerů polymerázou ExTaq (viz kapitolu 3.3). Vneseny byly zvláště sekvence pro satelitní repetici a pro transpozon *Maverick*. rDNA (18S a 28S) nebyla zaklonována, její sekvence je velmi konzervována, a proto byly pro další experimenty využity sekvence přímo izolované z genomové DNA.

Přečištěné PCR produkty byly dle návodu ligovány do vektoru za využití kitu pGem-T Easy Vector systems (Promega, USA). Počet insertů vůči počtu vektorů byl v poměru 3:1, ligační směs tedy měla 10  $\mu\text{l}$  a skládala se z 50 ng vektoru, odpovídajícího množství přečištěného PCR produktu, 3 U T4 ligázy a 1x ligačního pufru. Následovala inkubace přes noc ve 4 °C.

Druhý den byly plasmidy vneseny do kompetentních buněk *Escherichia coli* kmene DH5 $\alpha$ , který je v naší laboratoři kultivován. K 50  $\mu\text{l}$  bakteriálních buněk bylo přidáno 2,5  $\mu\text{l}$

ligační reakce a tato směs byla nejprve udržována 30 minut na ledu, poté 90 sekund zahřívána na 42 °C a ihned na to prudce ochlazena na ledu na 90 sekund. Vzápětí bylo přidáno 800 µl SOC média (ThermoFisher scientific, USA) a buňky byly inkubovány 45 minut ve 37 °C ve třepačce.

Souběžně byly připravovány Petriho misky s 1,5% bacto agarem (VWR Life Science, USA) v LB médiu (Duchefa Biochemie, Nizozemsko). Po autoklávování a ochlazení byl přidán ampicilin na finální koncentraci 100 µg/ml. Směs byla nalita po cca 20 ml na sterilní misky a po ztuhnutí bylo na každou plotnu naneseo 70 µl 100 mM IPTG (isopropyl β-D-1-thiogalactopyranosid) a 20 µl 122 mM X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside). Posléze byly na takto připravené Petriho misky sterilně vysety buňky skleněnou hokejkou a proběhla kultivace ve 37 °C přes noc.

Další den byly v kultuře dva typy buněk jasně odlišitelné díky modro-bílé selekci. Bílé kolonie buněk, u kterých byl insertem narušen gen kódující schopnost štěpit X-Gal, byly přeočkovány na Petriho misky s LB médiem a ampicilinem, inkubovány přes noc v 37 °C a poté skladovány ve 4 °C. Pro ověření délky zaklonovaného produktu byla provedena PCR amplifikace s OneTaq polymerázou (viz kapitolu 3.3) s universálními vektorovými primery M13, jejichž sekvence je uvedena v **Tabulce I**.

Vybrané kolonie byly inokulovány do 3 ml tekutého LB média s 300 µg ampicilinu a za stálého míchání inkubovány ve 37 °C přes noc. Z narostlé kolonie byl po odstředění izolován plasmid s využitím kitu NucleoSpinPlasmid (Macherey-Nagel) dle protokolu výrobce. Byly vybrány 2-3 klony od každé repetitivní sekvence a namíchány sekvenační reakce dle pokynů poskytovatele sekvenačních služeb SEQme s.r.o. (Dobříš, Česko). Získané údaje byly následně zpracovávány pomocí programu Geneious a pomocí online nástroje BLASTn na webu <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> byla ověřena jejich totožnost. Získané sekvence klonů jsou uvedeny v **Příloze I**.

### **3.6 Příprava chromosomálních preparátů**

Za využití roztírací (tzv. „spreading“) metody (Traut 1976) byly připraveny chromosomální preparáty z gonád housenek posledního instaru. Z ovarí a testes byly získány preparáty s chromosomy nacházejícími se ve fázi pachytene meiotického dělení. Bylo také připraveno několik preparátů z křídelních disků, na kterých byly pozorovány mitotické chromosomy.

Orgány byly vypitvány ve vychlazeném fyziologickém roztoku (0,9% NaCl, 0,042% KCl, 0,025% CaCl<sub>2</sub>, 0,02% NaHCO<sub>3</sub>), v případě disekce testes a křídelních disků byly následně přemístěny do hypotonizačního roztoku (0,075 M KCl) na 10 minut.

Dále byl materiál po dobu 15 minut fixován v čerstvém roztoku Carnoy, tedy ethanolu, chloroformu a kyseliny octové, v poměru 6:3:1. Podložní sklička byla vyčištěna 1% roztokem kyseliny chlorovodíkové v ethanolu. Vypitvaný materiál po fixáži byl homogenizován a macerován v 10 µl 60% kyseliny octové. Poté bylo skličko umístěno na histologickou plotnu vyhřátou na 45 °C a materiál byl pomalým tahem wolframovou jehlou rovnoměrně rozetřen, zatímco kyselina octová se vypařila. Vzniklé preparáty byly následně odvodněny tzv. vzestupnou ethanolovou řadou, tedy roztoky 70%, 80% a 100% ethanolu ve vodě, přičemž v každém z nich byly ponechány jednu minutu a přemístěny do dalšího. Preparáty byly uskladněny v -20 °C až do použití při *in situ* hybridizacích.

### 3.7 *In situ* hybridizace

FISH neboli fluorescenční *in situ* hybridizace je metoda umožňující lokalizovat zájmové sekvence přímo na chromosomech. V rámci této bakalářské práce bylo provedeno několik způsobů hybridizací *in situ*, jejichž postup je uveden níže. Experiment byl pokaždé proveden alespoň na dvou preparátech.

#### 3.7.1 Příprava sond pro *in situ* hybridizace

Sondy jsou fragmenty DNA nesoucí detekovatelnou značku navržené za účelem vizualizace cílového lokusu. V této práci byly použity dvě varianty značení sond – přímo a nepřímo, které byly následně detekovány pomocí protilátek. Templátem pro výrobu sond byl v případě sekvence *Maverick* a satelitu insert z plasmidové DNA (viz kapitolu 3.5) amplifikovaný polymerázovou řetězovou reakcí s využitím ExTaq (kapitola 3.3) a přečištěný kitem Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, USA). Pro výrobu sond cílených na rDNA sekvence 18S a 28S byl použit PCR produkt přímo z genomové DNA s využitím specifických primerů uvedených v **Tabulce I** (kapitola 3.3), přečištěn tímž kitem. Značený nukleotid dUTP může být do sekvence vnesen několika způsoby. V této práci bylo využito značení dvěma metodami a to nick-translací a tzv. random primingem.

Reakční směs **nick-translace** měla 20 µl a obsahovala: 1x Nick Translation pufr (5 mM Tris-HCl, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,0005% BSA (hovězí sérový albumin); pH 7,5), 10 mM

2-merkaptoethanolu, dNTP mix o složení 0,05 mM dATP, dCTP, dGTP a 0,01 mM dTTP, 0,02 mM značené-dUTP, 20 U DNA polymerázy I (ThermoFisher Scientific, USA), 0,01 U DNázy I (ThermoFisher Scientific, USA) a 1 µg templátové DNA. Jako značný nukleotid dUTP byl při přímém značení použit Cy3-dUTP (Jena Bioscience, Německo). Nepřímo značená sonda byla vyráběna zavedením biotin-16-dUTP (Roche Diagnostic GmbH, USA) případně digoxigenin-11-dUTP (Jena Bioscience, Německo). Reakce probíhaly při 15 °C po dobu úměrnou délce značené sekvence. Při značení celého genomu trvala reakce 210 minut, kratší úseky byly značeny 60-90 minut. Vždy bylo vyzkoušeno několik časů. Pokusy ukončit reakci zvýšením teploty na 70 °C pro deaktivaci enzymů nedopadly úspěšně a sonda byla naštěpena na příliš krátké fragmenty. Lepším řešením se ukázalo být ukončení reakce přidáním 2 µl 10x „loading bufferu“ (50% glycerol, 250 mM EDTA, 5,9 mM bromphenol blue). Velikost produktu byla ověřována elektroforetickou separací (viz kapitolu 3.4). Finální koncentrace sond byla 45,45 ng/µl a byly uchovávány v -20 °C.

Druhým způsobem značení sond byl tzv. **random-primed labeling**. Nejprve bylo smícháno 300-500 ng DNA, náhodné dekanukleotidy v 5x reakčním pufru (ThermoFisher Scientific, USA) a voda, proběhla denaturace 10 minut při 95 °C ve vodní lázni s prudkým ochlazením na ledu. Poté byla přidána směs nukleotidů dNTPs, které měly v konečné reakci koncentraci 0,05 mM dATP, dCTP, dGTP a 0,01 mM dTTP, 0,02 mM digoxigenin-11-dUTP (Jena Bioscience, Německo), a 5 U enzymu Klenow Fragment,  $exo^-$  (New England BioLabs, USA). Celkový objem reakce byl 50 µl, inkubace probíhala přes noc ve 37 °C. Druhý den byla reakce zastavena přidáním EDTA na výslednou koncentraci 9,8 mM. Naznačenou sondu bylo potřeba přečistit za využití Sephadexu G-50 (GE Healthcare, USA) na kolonce zhotovené z pipetovací špičky. Sephadex byl nejprve ponechán hodinu inkubovat s vodou ve 4 °C. Poté bylo na každou kolonku postupně naneseno 25mg Sephadexu ve 400 µl vody, přebytečná voda byla vytlačena improvizovanou pumpou vytvořenou z pipety a ustřížené špičky. Po centrifugaci (2 minuty, 1000 g) byla na vzniklou Sephadexovou kolonku nanesena sonda, to celé bylo centrifugováno při stejných otáčkách, a tím byly přebytečné složky reakce zachyceny v Sephadexu, zatímco značená sonda protekla filtrem do zkumavky. Přečištěné sondy dosahovaly koncentrací kolem 20 ng/µl a byly skladovány v -20 °C.

### 3.7.2 Nepřímá FISH

Nepřímá fluorescenční *in situ* hybridizace je metoda vhodná pro detekci kratších chromosomálních úseků, neboť signál je zesílen několikerým navázáním protilátek a je proto jasnější. Hybridizační mix byl připraven smícháním 30-50 ng sondy s 25 µg sonifikované DNA z lososích spermií (Sigma-Aldrich, USA). Dále bylo přidáno 0,1x objemu 3 M octanu sodného a 2,5x objemu 100% ethanolu vychlazeného na -20 °C. V některých případech byla směs ponechána hodinu percipovat v -80 °C. Poté byla směs centrifugována 20 minut při 4 °C a otáčkách 15 000 rpm. Supernatant byl odsán a pelet byl dvakrát promyt 500 µl 70% ethanolu a mezitím centrifugován 5 min za stejných podmínek. Posléze byla vysrážená DNA 30 minut rozpouštěna v 5 µl 100% deionizované formamidu při 37 °C. Po přidání 5 µl 20% dextran sulfátu ve 4x SSC (saline-sodium citrate; 600 mM NaCl, 60 mM citronan trisodný; pH 6,8) byla směs denaturována 5 minut ve vodní lázni o 90 °C. Následovalo prudké ochlazení na ledu a aplikace na připravené preparáty.

Preparáty nejprve prošly odvodněním standartní ethanolovou řadou (po minutě v 70%, 80% a 100% ethanolu). Následně bylo na každé sklíčko nanášeno 100 µl RNázy A (100 µg/ml RNázy A ve 2x SSC). Preparáty přikryté krycím sklíčkem byly umístěny do vlhké komůrky a uloženy do termoboxu o 37 °C na 60 minut. Tímto bylo z preparátu odstraněna případná RNA. Následovalo promývání v 2x SSC, přičemž byla sklíčka umístěna do skleněných kyvet a za využití vodních lázní se 3x 5 minut promývala. Toto promývání probíhalo buďto při pokojové teplotě, nebo při 37 °C.

Pro odstranění cytoplasmy byla sklíčka ošetřena 10 mM HCl po dobu 20 minut ve 37 °C a následně opět promyta v 2x SSC (3x 5 min). Alternativním způsobem při některých opakováních experimentu bylo odstranění proteinů působením proteinázy K. Tehdy byly chromosomy nejprve hodinu zafixovány na preparátu působením tepla na kovové plotýnce při 65 °C, následně přemístěny do kyvety s roztokem 1 µg/ml proteinázy K v 2x SSC a ponechány inkubovat 20 minut při 37 °C.

Dále byla sklíčka ponechána 30 minut v 5x Denhardtově roztoku (0,1% polyvinylpyrolidol, 0,1% BSA a 0,1% Ficoll 400) ve 37 °C. Denaturace DNA na preparátech proběhla nanášením 100 µl 70% formamidu v 2x SSC, následovalo zakrytí krycím sklíčkem a působení teploty 68 °C na kovové plotně po dobu 3,5 minuty. Poté byla sklíčka okamžitě ochlazená v -20 °C 70% ethanolu na jednu minutu. Ethanolová řada byla dokončena působením 80% a 100% ethanolu při pokojové teplotě po 30 vteřinách. Po uschnutí bylo

naneseno 10  $\mu\text{l}$  připravené hybridizační směsi. Preparát byl přikryt krycím sklíčkem, okraje zalepeny lepidlem Fixogum rubber cement (Marabu, Německo) a hybridizace probíhala ve 37 °C ve vlhké komůrce přes noc (15-20 hodin).

Další den probíhalo odmyváání nespecificky navázané sondy. Přísnost podmínek byla stanovena podle teploty tání sondy ( $T_m$ ) a předpokládané homologie mezi sondou a kopiemi repetit v genomu.  $T_m$  byla stanovena podle vzorečku:

$$T_m = 81,5 \text{ }^\circ\text{C} + 16,6 (\log_{10} [\text{Na}^+]) + 41 (\text{molární zastoupení } [\text{G+C}]) - 0,63 (\% \text{ formamidu}) - 500/n,$$

kde  $n$  je délka sondy v nukleotidech (Sambrook 2001). Preparáty byly po odstranění lepidla promyty 3x 5 minut v 50% roztoku formamidu v 2x SSC ve stanovené teplotě 42 °C (u jiných sekvencí 46 °C), ve stejné teplotě 3x 5 minut ve 2x SSC a následně třikrát v 0,1x SSC při 62 °C. Závěrečné mytí proběhlo při pokojové teplotě působením detergentu 0,1% Tween 20 (polyoxyethylen-20-sorbitan-monolaurát, Sigma Aldrich) ve 4x SSC po dobu 5 minut.

Prvním krokem detekce a zesílení signálu bylo blokování při pokojové teplotě blokovacím činidlem 2,5% BSA ve 4x SSC půl hodiny ve vlhké komůrce. Kroky zahrnující práci s fluorochromy probíhaly v přítmí. Při *in situ* hybridizaci za použití sondy značené biotinem bylo na preparát nejprve naneseno 100  $\mu\text{l}$  streptavidinu s navázaným cyaninem 3 (Cy<sup>TM</sup>3 Streptavidin, Jackson ImmunoResearch), ředěným v blokovacím roztoku v poměru 1:1000 a preparát byl inkubován při pokojové teplotě 30 minut ve vlhké komůrce. Posléze byly preparáty 3x 5 minut promyty 0,1% Tween ve 4x SSC ve 37 °C a znovu blokovány BSA roztokem 10 minut. Dále bylo aplikováno 50  $\mu\text{l}$  antistreptavidinu (Biotinylated Anti-Streptavidin, Vector Laboratories) ředěného v poměru 1:25, tentokrát inkubace probíhala ve 37 °C 30 minut. Protilátka byla znovu odmyta 3x 5 min a preparát byl naposledy blokován. Následně se opakoval krok inkubace se streptavidin-Cy3 za stejných podmínek jako poprvé včetně následného promytí. Na závěr byly preparáty na 30 sekund inkubovány v roztoku 1% roztoku detergentu Ilfotolu (Ilford Photo, Velká Británie). Výsledný preparát byl barven DAPI (4'-diamidin-2-fenylindol) v „antifade“ DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]oktan) (1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , obojí Sigma-Aldrich, USA), přikryt krycím sklíčkem, přebytečný roztok byl vytlačen a okraje krycího skla natřeny lakem na nehty. Uchován byl ve 4 °C bez přístupu světla.



### 3.7.3 TSA-FISH

„Tyramide signal amplification“ (TSA-FISH) je způsob *in situ* hybridizace, při kterém je protilátka konjugována s křenovou peroxidázou. Tento enzym po přidání substrátu způsobí navázání fluorescenčně značeného tyramidu na okolní proteiny a tím amplifikuje signál. TSA-FISH byla provedena s drobnými úpravami podle protokolu uvedeného v práci Carabajal Paladino a kol. (2014), ve které byla tato metoda optimalizována pro práci s holokinetickými chromosomy můr a motýlů (Lepidoptera).

Nejprve byly preparáty odvodněny ethanolovou řadou (po minutě v 70%, 80% a 100% ethanolu), následně ošetřeny RNázou a HCl podle postupu uvedeného v kapitole 3.7.2. Dalším krokem při přípravě sklíček na TSA-FISH byla inkubace v kyvetě s 1% roztokem peroxidu vodíku na 30 minut v pokojové teplotě. Po promytí 3x 5 min v 2x SSC byly preparáty v lázních vyhřátých na 37 °C ošetřovány v 5x Denhardtově roztoku 30 minut.

Během inkubace chromosomálních sklíček byla připravena hybridizační směs obsahující sondu naznačenou digoxigeninem připravenou metodou random primed labeling, viz kapitolu 3.7.1. Hybridizační mix o objemu 50 µl se skládal z 50 ng značené sondy, 50% deionizovaného formamidu, 2x SSC a 5% dextran sulfátu. Směs byla aplikována na preparát, který byl přikryt krycím sklíčkem, a společná denaturace DNA proběhla na plotně o 70 °C po dobu 5 minut. Ve vlhké komůrce preparáty hybridizovaly přes noc ve 37 °C.

Druhého dne byly preparáty promývány za účelem odstranění nenavázané nebo nespecificky navázané sondy. Stringence byla stanovena podle vzorečku uvedeného v kapitole 3.7.2. Nespecificky navázaná sonda byla odmývána nejdříve 3x 5 minutách ve vodní lázni o teplotě 42 °C v 50% formamidu v 2x SSC, poté 3x 5 minut v samotném 2x SSC ve 42 °C. Následovalo 5 minut vymývání při pokojové teplotě v 1x TNT (0,1 M Tris-HCl, 150 mM NaCl a 0,1% Tween 20).

Dalším krokem bylo blokování TNB puřem (0,1 M Tris-HCl, 150 mM NaCl a 0,5% blokovacího činidla TSA Blocking reagent (Perkin Elmer)), který byl nanesen po 200 µl na každý preparát, přikryt krycím sklíčkem a ponechán 30-45 minut ve vlhké komůrce za pokojové teploty. Poté bylo na každé sklíčko naneseo 100 µl protilátky konjugované s křenovou peroxidázou Anti-Digoxigenin-POD, Fab fragments (Roche Diagnostic, USA) naředené v poměru 1:200 s TNB puřem. Po přikrytí krycím sklíčkem byly preparáty ve vlhké komůrce ponechány hodinu při pokojové teplotě nebo v termoboxu o 37 °C.

Po uplynutí inkubační doby byly preparáty opět promývány 3x 5 minut v TNT za pokojové teploty. Tyramid (TSA Plus Fluorescein system, PerkinElmer) – látka, po které je TSA-FISH pojmenována, byl naředěn dodaným „dilutant buffer“ v poměru 1:50, nanesen po 100 µl na sklíčka a ponechán inkubovat 15 minut. Poté byla sklíčka opět promyta v TNT 3x 5 minut za pokojové teploty a posléze umístěna na 1 minutu do kyvety s roztokem 1% Ilfotolu. Nakonec bylo na sklíčka aplikováno 25 µl DAPI v DABCO o koncentraci 1 µg/µl. Po zakrytí krycími sklíčky byl přebytek směsi tlakem vytlačen, okraje zalakovány lakem na nehty a sklíčko uchováváno ve tmě ve 4 °C.

Ve snaze vyhnout se přílišnému pozadí na preparátu byl při dalších opakováních TSA-FISH experimentů přidán jeden odmyvací krok. Preparáty byly po trojím omytí formamidem a 2x SSC ještě 3x 5 minut promývány ještě v 0,1x SSC při 56 °C.

### 3.7.4 GISH

Genomová *in situ* hybridizace (GISH) je obdobou výše popsané FISH, při které je jako sonda využit celý samičí genom. Po denuraci chromosomů dochází k hybridizaci, při které se odehrává kompetice značené samičí sondy s nadbytkem neznačené samčí DNA. Ve výsledku značená sonda vizualizuje sekvence obohacené v samičím genomu, zejména části chromosomu W. Pro značení sond byla využita nick translace s Cy3-dUTP (Jena Bioscience, Německo).

Jako kompetitor bylo na každé sklíčko použito 3 µg samčí DNA, které nejprve prošlo fragmentací v 99 °C po dobu dvaceti minut. K naštěpené samčí DNA bylo přidáno 450 ng samičí značené sondy a 25 µg DNA z lososího spermatu. Příprava hybridizačního mixu byla dokončena přidáním 0,1x objemu 3 M octanu sodného a 2,5x objemu 100% ledového ethanolu. Směs byla precipitována 60 minut v -80 °C a posléze centrifugována 20 minut při 4 °C na maximální otáčky. Po odstranění supernatantu byl pelet dvakrát promyt 70% ethanolom, centrifugován a vysrážená DNA byla rozpouštěna v 5 µl předehřátého 100% deionizovaného formamidu 30 min v termoboxu o teplotě 37 °C. Poté bylo přidáno 5 µl 20% dextran sulfátu ve 4x SSC předehřátého na 37 °C a následovala denaturace ve vodní lázni. Po 5 min v 90 °C byly sondy okamžitě ochlazeny na ledu.

Příprava sklíček a nanesení hybridizačního mixu bylo provedeno stejně jako u metody nepřímé FISH, viz kapitulu 3.7.2. Hybridizace probíhala za teploty 37 °C dva dny (více než 48 hodin).

Třetí den byly preparáty po odstranění krycího sklíčka opláchnuty v 1% roztoku Tritonu x-100 v 0,1x SSC 5 minut v 62 °C. Následně byla sklíčka ponořena do 1% Ilfotolu a po částečném uschnutí bylo na každé sklíčko aplikováno 1 µg/µl DAPI v DABCO a zalakovány okraje, stejně jako u předchozích FISH metod.

### 3.7.5 Analýza preparátů

Preparáty po *in situ* hybridizacích byly pozorovány na dvou fluorescenčních mikroskopech, prvním byl Zeiss Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss Jena, Německo) s přidruženou černobílou kamerou Olympus CCD XM10 s programem cellSens Standard 1.9 (Olympus, Německo). Druhým byl stejný mikroskop, na němž byly pozorované preparáty fotografovány barevnou kamerou Olympus DP73 s programem cellSens Standard 1.18, ale posléze převedeny do černobílého zobrazení. Výsledný obraz byl získán složením a pseudoobarvením snímků v programu Adobe Photoshop CC 2019 nebo Adobe Photoshop Elements 2020. Při pozorování GISH preparátů byly zaznamenávány pozice focených pachytenních jader pro případné pozdější značení dalšími sondami (tzv. „reprobing“).

## 3.8 Kvantitativní PCR

Metoda kvantitativní neboli „real-time“ PCR (v literatuře označována jako qPCR) je metoda podobná běžné polymerázové řetězové reakci, ale využívající speciální cycler, který je schopen v průběhu každého cyklu zaznamenat množství DNA. Počet kopií byl detekován díky přítomnosti fluorochromu SYBER Green, který se na DNA váže. V této práci byla qPCR užitá s cílem odhadnutí relativního počtu kopií jednotlivých repetic napříč jedinci, mezi pohlavími a mezi populacemi. Templátem pro real-time PCR byla DNA izolovaná kitem NucleoSpin, výběr jedinců byl náhodný. Primery pro qPCR byly pro každou ze studovaných repetic navrženy v programu Geneious, tak, aby měly co nejpodobnější optimální nasedací teplotu a aby tvořily produkty o velikosti cca 150 párů bazí. Zvolené primery byly vyhotoveny firmou Generi Biotech s.r.o. (Hradec Králové, Česko) a jejich přehled je uveden v **Tabulce II**. Jejich funkčnost byla ověřena běžnou PCR reakcí s polymerázou OneTaq (viz kapitolu **3.3**).

Jako referenční autosomální gen, který se v genomu vyskytuje u všech jedinců pouze v jediné kopii, byl použit gen *acetylcholinesteráza-1 (Ace-1)*. Primery navržené na tento gen mi věnovala kolegyně Irena Provazníková, za což jí děkuji. Specificita těchto primerů na gen

*Ace-1* u předivky brslenové byla ověřena softwarem Geneious (sekvence primerů se nacházejí jen na jednom místě v genomu v odpovídající vzdálenosti) a totožnost tohoto genu byla testována nástrojem BLAST na webu <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

**Tabulka II:** Primery použité při kvantitativní PCR.

Název sekvence	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Nasedací teplota	Původ
18S	ACCACATCCAAGGAA GGCAG	TGCCCTCCAATTGTT CCTCG	57	tato práce
28S	ATGTGGTGTTCGGGA GGTTC	CTCAAGCAACCCGA CTCTGA	57	tato práce
satelit	AAAGCGGTGTTTGT CGGC	TGACAACCCGATGC CGTTA	57	tato práce
<i>Maverick1</i>	ACCCGGCTAAACACC TGAAG	GGTCCGCACACTAA ACAACG	57	tato práce
<i>Maverick2</i>	ATGAGCTGCCTTTCG CCTG	GAACCGTTGTGACA GTTGCG	57	tato práce
<i>Ace</i>	GATACCCGAGACTG GCAAC	CCACCTCCTCTGGCG AATAAT	57	Provazníková nepublikováno

Na každé 96-ti jamkové destičce byly dvě zóny, v jedné probíhaly reakce na test účinnosti PCR reakce a v druhé pro samotný experiment. Účinnost PCR reakce byla měřena na směsi celkové DNA šesti jedinců dané geografické populace (tři samic a tři samců) a byla provedena v triplicátech. Z této směsi DNA byla namíchaná ředící řada, první koncentrace byla 5 ng/μl, která byla dále naředěna 5x, 25x a 125x.

Relativní počty kopií daných sekvencí byly zjišťovány u třech nezávislých biologických vzorků ve třech opakováních. Pro sekvenci *Maverick* a pro satelitní repetici v každé jamce probíhala PCR reakce o celkovém objemu 10 μl obsahující 5 ng templátové celogenomové DNA, 0,4 μM forward a stejné množství primeru reverse a 1x Xceed qPCR SG 2x mix Lo-ROX (Institute of Applied Biotechnologies, Praha, Česká republika).

Kvůli velikému množství kopií rDNA genů v genomu bylo po několikerém testování složení reakce optimalizováno tak, že do každé jamky byla aplikována poloviční množství DNA a dvojnásobná koncentrace primerů oproti výše uvedenému postupu použitému u sekvence *Maverick* a u satelitu.

Nejprve bylo na destičku nanášeno DNA, zbylé složky reakce byly smíchány a nanášeny do jamek společně. Na každé destičce probíhaly reakce jak s testovanou sekvencí, tak s primery navrženými na referenční gen *Ace 1* (**Obr. 3**).

Testovaná sekvence		Referenční gen <i>Ace 1</i>		Testovaná sekvence			Referenční gen <i>Ace 1</i>		
0x	25x	0x	25x	♀ 1a	♀ 1b	♀ 1c	♀ 1a	♀ 1b	♀ 1c
0x	25x	0x	25x	♀ 2a	♀ 2b	♀ 2c	♀ 2a	♀ 2b	♀ 2c
0x	25x	0x	25x	♀ 3a	♀ 3b	♀ 3c	♀ 3a	♀ 3b	♀ 3c
5x	125x	5x	125x	♂ 1a	♂ 1b	♂ 1c	♂ 1a	♂ 1b	♂ 1c
5x	125x	5x	125x	♂ 2a	♂ 2b	♂ 2c	♂ 2a	♂ 2b	♂ 2c
5x	125x	5x	125x	♂ 3a	♂ 3b	♂ 3c	♂ 3a	♂ 3b	♂ 3c

**Obrázek 3:** Schéma rozložení reakcí na qPCR destičce. V levé části byla testována účinnost reakce, 0x, 5x, 25x a 125x jsou řadící řady smíchané gDNA všech použitých vzorků. V pravé části schématu je vyobrazen samotný experiment, v řádcích bylo nanášeno DNA jednotlivců (♀ = samice; ♂ = samec). Experiment byl prováděn v biologických (**1, 2, 3**) a technických triplikátech (**a, b, c**). V záhlaví je vždy uvedeno, jaké primery byly použity pro danou skupinu, zda to byly primery pro referenční gen, nebo pro zkoumanou sekvenci.

Destička byla po nanášení reakční směsi přelepena krycí fólií a krátce zcentrifugována. Reakce probíhaly ve světelném termocycleru (BioRad Thermal Cycler C1000Touch + CFX96-Real-Time System) dle tohoto protokolu: počáteční denaturace 95 °C po dobu 3 minut, poté 40 cyklů začínajících denurací při 95 °C po dobu 10 sekund, nasedání primerů a elongace při 60 °C 30 sekund, přičemž po každém cyklu bylo změřeno množství DNA (úroveň fluorescence). Následovalo postupné zvyšování teploty z 55 °C na 95 °C v krocích po 0,5 °C, čímž byla získána křivka tání, potřebná pro kontrolu vznikajících produktů. Výsledky byly zpracovány přidruženým programem Bio-Rad CFX Manager 3.0 a v Microsoft Office Excel Professional Plus 2016.

Účinnost qPCR reakcí byla stanovena na základě ředící řady směsi gDNA a byla brána v potaz při závěrečném stanovení počtu kopií. Relativní počet kopií byl vypočten podle vzorce:

$$R = ((1 + E_{ref})^{(Ct_{ref})}) / ((1 + E_{sek})^{(Ct_{sek})}),$$

v němž R odpovídá relativnímu kopii sledované sekvence, E je účinnost reakce a Ct odpovídá cyklu, v němž byla překročena prahová hodnota. „ref“ je index referenčního genu (*Ace*) a „sek“ značí hodnotu pro sledované sekvence. Hypotéza, že relativní počet kopií dané sekvence se mezi pohlavími neliší, byla testována dvouvýběrovým t-testem.

### 3.9 Southernova hybridizace

„Southern blot“ je hybridizační metoda pojmenovaná podle Edwina Southerna a je využívána k přenosu fragmentované DNA z gelu na membránu, na níž následně proběhne hybridizace se značenou sondou. V rámci této práce byla tato technika použita pro ověření tandemového charakteru studované satelitní sekvence.

Celogenomová DNA získaná metodou CTAB (postup uveden v kapitole 3.2.2) od čtyř jedinců – samice a samce z české populace a samice a samce z Nizozemí – byla parciálně štěpena zvláště pomocí dvou restrikčních endonukleáz *DraI* a *Eco32I* (obojí Fermentas, USA). Štěpící reakce obsahovaly 3 µg DNA, 1x příslušný pufr (*Tango* pro restrikční enzym *DraI*, a *R* pro *Eco32I*), 1 U daného enzymu a byly doplněny vodou do 23 µl. Parciální štěpení probíhalo při 37 °C 60 min, enzymatická aktivita byla ukončena působením teploty 65 °C po dobu 10 minut.

Naštěpená genomová DNA byla elektroforeticky separována při 50 V po dobu 150 minut v 1% agarózovém gelu v 1x TBE (1 M Tris, 1 M kyselina boritá, 20 mM EDTA; pH 8,3). Jako velikostní marker byl použit DNA Molecular Weight Marker III, DiG-labeled (Roche Diagnostic), který byl nejprve smíchán s vodou a 10x „loading“ puffrem v poměru 1:3:1 a inkubován 10 minut při 65 °C. Do dalších jamek byla nanášena naštěpená DNA po 3 µg na jamku. Barvením ethidium bromidem a následným focením pod UV světlem byla ověřena úspěšnost štěpení a separace DNA fragmentů.

DNA v gelu byla poté fragmentována desetiminutovou inkubací v 0,25 M HCl při pokojové teplotě za mírného třepání. Posléze byl gel dvakrát po 15 minutách inkubován v denaturačním roztoku (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl). Další promývání proběhlo v neutralizačním roztoku (0,5 M Tris-HCl, 3 M NaCl; pH 7,5) to opět 2x 15 minut. Následně

byl sestavný tzv. „blotovací můstek“ a DNA byla kapilárním přenosem ve 20x SSC navázána na kladně nabitou membránu Amersham Hybond-N+ (GE Healthcare, Velká Británie). Tento přenos probíhal 20 hodin.

Další den byla membrána opláchnuta v 6x SSC 5 minut, následně v 2x SSC také 5 minut a fixována působením UV záření (120 mJ) ve Stralinker UV crosslinker (Stratagene, La Jolla, Kalifornie, USA), přičemž bylo stále hlídáno, aby nedošlo k oschnutí membrány. Poté byla membrána přenesena do skleněného válce, ve kterém byly za stálého otáčení provedeny všechny následující kroky až po detekci. Prvním byla prehybridizace 60 minut za stálého míchání při 42 °C. Prehybridizační roztok se skládal z 1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,6); 1 mM EDTA, 40% formamidu, 0,5% SDS (dodecylsírán sodný) a 5x Denhardtova roztoku. Sonda byla připravena z vektorového klonu *sat4* (sekvence je uvedena v **Příloze I**) nick translací s digoxigeninem značenými dUTPs (kapitola **3.7.1**). Její přečištění bylo provedeno Sephadexem. 100 ng sondy bylo denaturováno pět minut při 95 °C a přidáno do 10 ml prehybridizačního roztoku, čímž vznikl roztok hybridizační. Hybridizace probíhala 16 hodin při 42 °C.

Stringence hybridizačních podmínek neboli přísnost při odmývání nespecificky navázané sondy byla vypočítána podle vzorce uvedeného v kapitole **3.7.2**. Po hybridizaci byla membrána ponechána ve skleněném válci a promyta odmývacím pufrem I (2x SSC, 0,1% SDS) při pokojové teplotě dvakrát pět minut. Další promývání bylo provedeno odmývacím pufrem II (0,2x SSC, 0,1% SDS) 20 minut při 65 °C. Detekční kroky začaly promytím membrány 5 minut v mycím roztoku (0,3% Tween 20, 25 mM Tris-HCl, 0,2M NaCl; pH 7,5). Poté byla membrána na jednu hodinu vystavena blokovacímu roztoku (5% odtučněné sušené mléko (Difco™ Skim Milk, Becton Dickson and company, Francie), 25 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl; pH 7,5). Dalším krokem byla inkubace s protilátkou Anti-Digoxigenin-AP (Roche Diagnostics), což je protilátka proti digoxigeninu konjugovaná s alkalickou fosfatázou. Byla naředěna v blokovacím roztoku v poměru 1:10 000 a ponechána 60 min inkubovat s membránou při pokojové teplotě za stálého otáčení. Následovalo dvojitě promývání ve výše zmíněném mycím roztoku po patnácti minutách. Poté byla membrána na 5 minut vystavena detekčnímu pufru (1M Tris-HCl, 1M NaCl; pH 9,5) a přenesena na fólii, kde byl přidán substrát pro chemiluminiscenční reakci s alkalickou fosfatázou CDP-Star ready to use (Roche Diagnostics, Švýcarsko). Po odstranění přebytečného substrátu byla luminiscence zaznamenána díky CCD kameře Lumi-Imager LAS-3000 (Fujifilm, Japonsko).

## 4 Výsledky

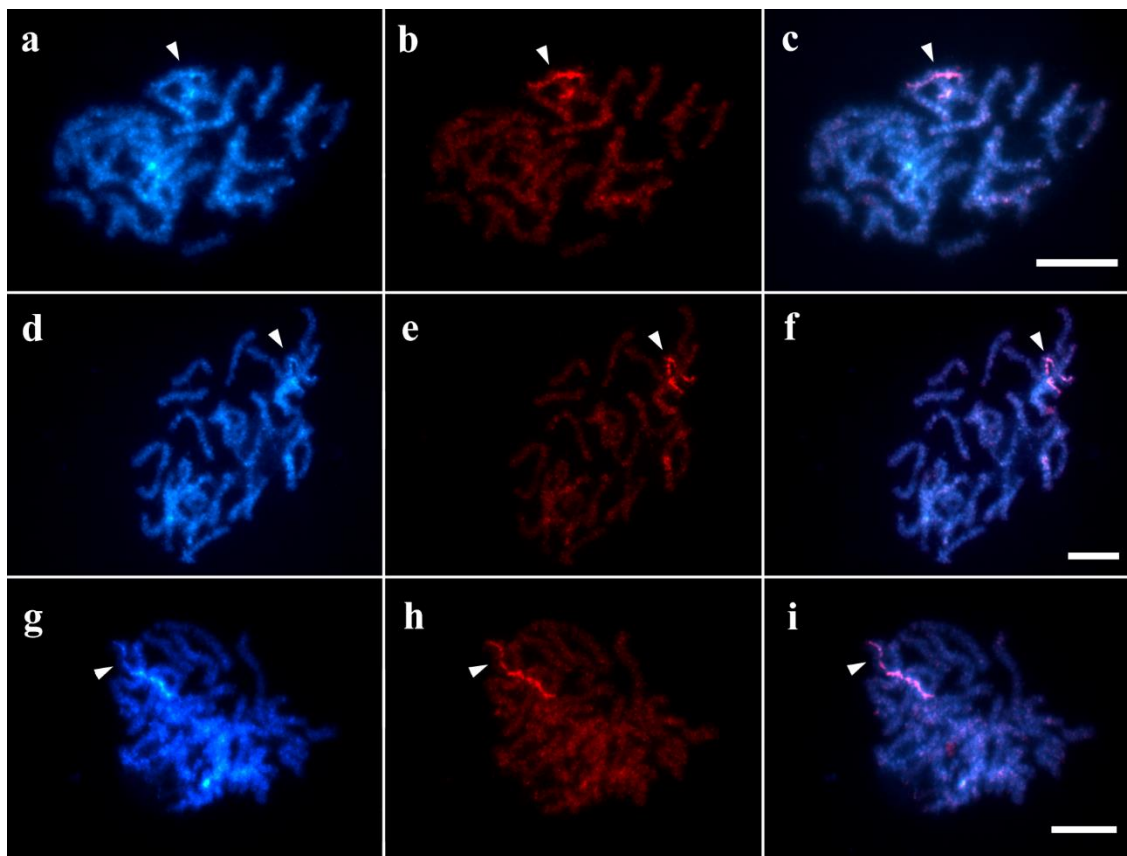
### 4.1 Lokalizace studovaných sekvencí

Genomová distribuce vybraných repetice byla analyzována *in situ* hybridizacemi na chromosomálních preparátech jader v pachytenní fázi meiózy I. Za účelem ověření lokalizace cílových sekvencí na pohlavním chromosomu W bylo potřeba jej na chromosomálních preparátech jednoznačně identifikovat. Byla pro to použita metoda genomové *in situ* hybridizace (GISH), při které se vizualizují části genomu specifické pro samici. Takto byly naznačeny dva preparáty s pachytenními jádry nizozemských samic (viz **Obr. 4**), jeden preparát s ovarii české samice (zobrazeno na **Obr. 5**) a také mitotický preparát z křídelních disků samice z české populace (nezobrazeno). Na všech třech preparátech oocytů byl chromosom W patrný i na snímcích jader obarvených DAPI (**Obr. 4, 5 – a, d, g**). Celogenomová samičí sonda vizualizuje chromosom W (**Obr. 4, 5 – b, e, h**) a značí jej nerovnoměrně. Zatímco v některých jádrech byla sonda výrazná po celé délce chromosomu (například **Obr. 4i**), jinde byla nápadná jeho středová část (**Obr. 5i**) a v jiných jádrech byla jasnější jedna chromosomální polovina (viz **Obr. 5f**). Chromosom W se sondou je samostatně zobrazen na **Obr. 5i**.

Za účelem získání sond byly vybrané repetice (viz kapitolu **1.3**) amplifikovány PCR, zavedeny do bakteriálního vektoru a vybrané klony sekvenovány. Tento postup nebyl úspěšný se sekvencí 28S rDNA, která má ovšem díky mechanismu genové konverze konzervovanou sekvenci. Takže pro výrobu sond 18S a 28S byl nakonec použit přímo přečištěný PCR produkt, jehož identita byla ověřena na webu <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. V **Příloze I** jsou uvedeny částečné sekvence studovaných rDNA genů.

Pro zjištění polohy a počtu rDNA klastrů byla provedena nepřímá FISH se sondou zhotovenou nick translací z části sekvence genu 18S. Sonda značená biotinem (dle postupu uvedeného v kapitole **3.7.2**) ale nebyla na preparátu detekována. Stejný způsob FISH byl proveden při lokalizaci *Maverick* transpozonu, se dvěma sondami zhotovenými ze sekvencí *Mav1* a *Mav2*. Výsledek byl opět negativní a je vyobrazen v **Příloze II**. Proběhla řada pokusů o další značení sond nick translací s biotinem a posléze s digoxigeninem, značené fragmenty se však při detekci elektroforetickou separací ukázaly jako nevyhovující.

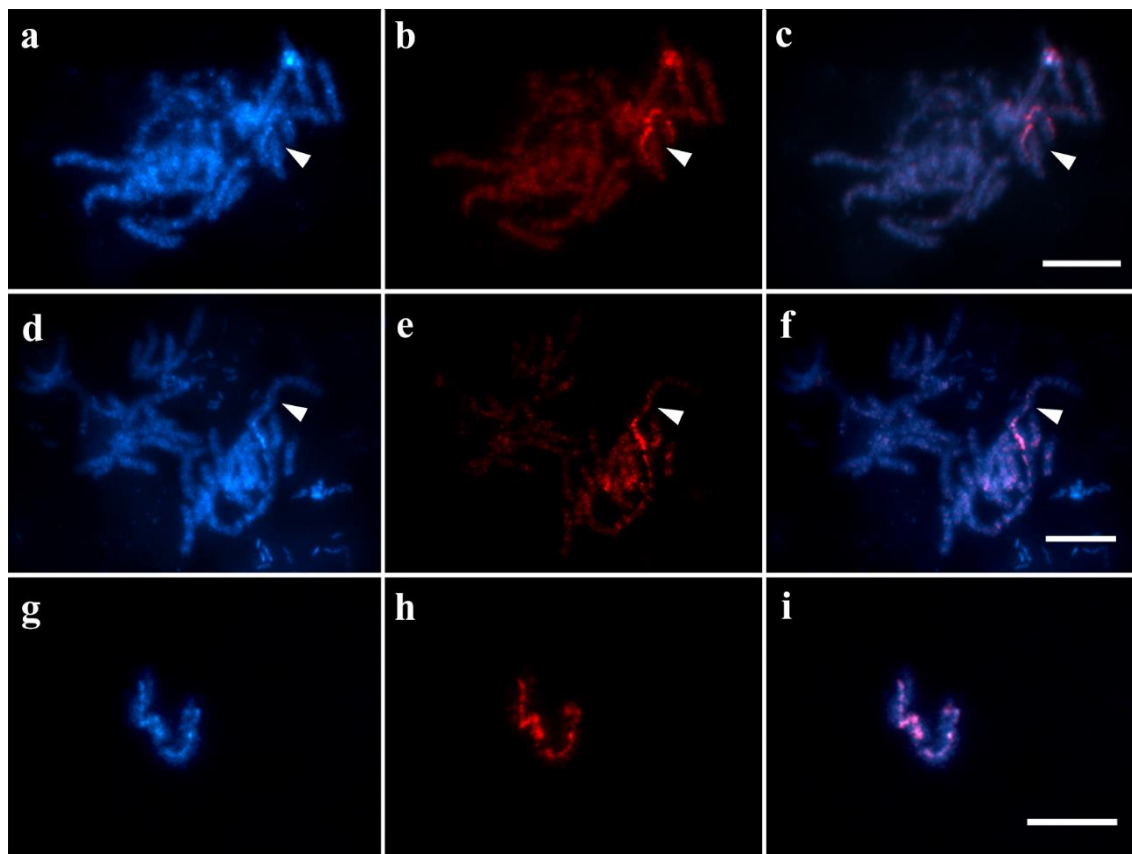




**Obrázek 4:** Genomová *in situ* hybridizace s celogenomovou samičí sondou na preparátech pachytenních oocytů nizozemských samic. **a, d, g** – chromosomy obarvené DAPI s nápadným trivalentem pohlavních chromosomů. **b, e, h** – hybridizační signály samičí celogenomové sondy značené fluorochromem Cy3 byly pseudo-obarveny červeně. **c, f, i** – složený obrázek obarvených chromosomů a samičí sondy. Šipkami jsou vyznačeny pohlavní chromosomy WZ<sub>1</sub>Z<sub>2</sub>. Měřítko odpovídá 10 μm.

Sondy pro další *in situ* hybridizace byly získány metodou random-primed labeling (popsáno v kapitole 3.7.1) s inkorporovaným digoxigenin-11-dUTP. Poloha repetice *Maverick* byla tentokrát kvůli větší sensitivitě při detekci sondy ověřována metodou TSA-FISH. Hybridizace s 50 ng sondy *Mav1* značené touto metodou byla provedena na dvou preparátech z ovarii českých samic předivek. Signál sondy byl detekován na obou koncích chromosomu W (**Obr. 6**) u desítek pozorovaných jader, avšak pouze na jednom z preparátů. Z **Obr. 6a, d, g, j** lze usoudit, že střední část W chromosomu je DAPI pozitivní, a tedy bohatá na AT báze. Sondy nasedají na obě koncové části W chromosomu a značí zhruba čtvrtinu jejich délky, viz **Obr. 6c, f, i, l**. Ze stejných snímků plyne, že signály se v menší míře nachází

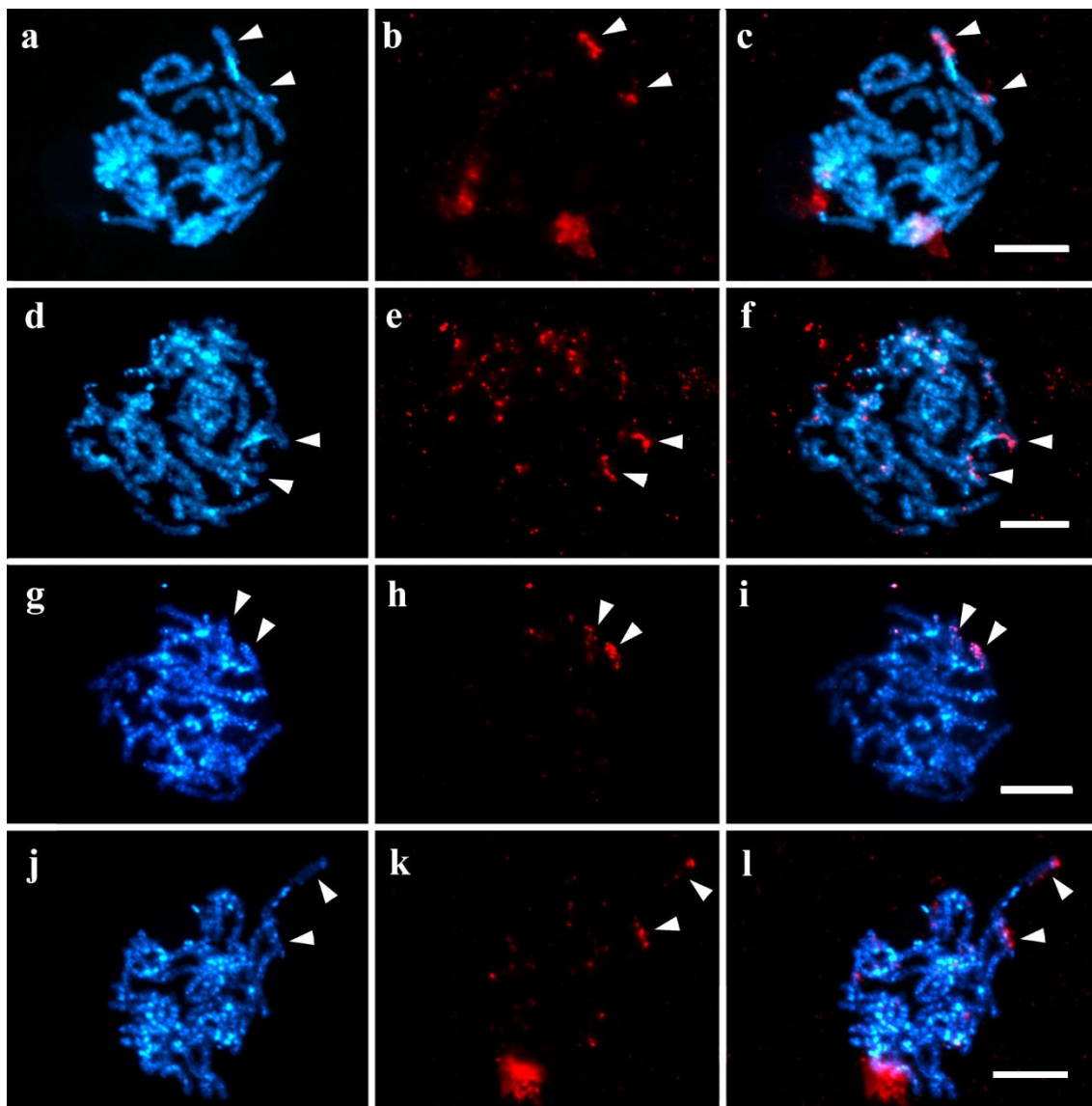
i na autosomech. Druhý preparát vykazoval velmi silné pozadí a chromosomy byly stěží pozorovatelné.



**Obrázek 5:** GISH na chromosomálních preparátech pachytenních oocytů samice české populace. **a, d, g** – chromosomy obarvené DAPI, W chromosom je DAPI pozitivní a na snímcích nápadný. **b, e, h** – červený signál samičí sondy značené Cy3. **c, f, i** – složené snímky. Vrchol šipky ukazuje na trivalent pohlavních chromosomů, který je na obrázku **g-i** zachycen samostatně. Měřítko odpovídá 10  $\mu$ m.

Experiment TSA-FISH byl zopakován se sondami pro detekci *Maverick* transpozonu, satelitní tandemové repetice a také části 18S rDNA genu. Značení sond bylo provedeno technikou „random-primed labeling“. V hybridizační směsi bylo sníženo množství sondy z 50 ng na 40 ng a každá ze zhotovených sond byla aplikována na dva chromosomální preparáty s DNA českých samic. V protokolu nastaly drobné úpravy uvedené v posledním odstavci kapitoly TSA-FISH (3.7.3). Tyto domnělé optimalizační kroky ovšem při detekci nepomohly, pozadí bylo téměř po celé ploše preparátů a sondy nemohly být identifikovány.

Na jednom z preparátů se sondou 18S bylo nalezeno jádro, na kterém se zdá, že je sonda na terminálních koncích jednoho z bivalentů (**Příloha II, Obr. 11a–c**). Signál ale nebyl detekován na dostatečném množství jader, aby bylo možné experiment vyhodnotit.



**Obrázek 6:** Výsledky TSA-FISH se sondou *Mav1* značenou digoxigeninem. **a, d, g, j** – chromosomy pachytenních oocytů obarvené DAPI. **b, e, h, k** – hybridizační signály sondy obarvené červeně se nacházejí převážně na koncové části W chromosomu. **c, f, i, l** – složené obrázky podbarvených chromosomů a sondy. Konce pohlavních chromosomů jsou zvýrazněny šipkou. Měřítko odpovídá 10  $\mu\text{m}$ .

## 4.2 Srovnání počtu kopií vybraných repetitivních sekvencí v genomu

Metoda kvantitativní polymerázové řetězové reakce byla použita s cílem odhadnout relativní počet kopií vybraných repetitivních sekvencí v genomové DNA u vybraných jedinců a ten posléze porovnat mezi pohlavími a populacemi. Po počátečních pilotních pokusech byl experiment navržen jako testování jednotlivých repetitivních sekvencí a účinnosti reakce zároveň na jedné 96 jamkové destičce. Při interpretaci výsledků qPCR byla zohledněna i křivka tání, tedy kontrola, že nevznikaly nespecifické produkty.

Jako vnitřní standart byl vybrán unikátní autosomální gen *Acetylcholinesteráza 1* (*Ace-1*), který se v genomu vyskytuje právě jednou a při qPCR byl již jako referenční gen ověřen (Hladová 2015). Účinnosti qPCR reakcí, které byly používány pro finální výpočet, byly v rozmezí 73,6 % - 107,5 %. Relativní počet kopií byl stanoven podle vzorce uvedeného v kapitole 3.8.

Rozdíly mezi pohlavími v relativním počtu kopií dané sekvence (a tím nepřímo přítomnost této sekvence na chromosomu W) byly testovány dvouvýběrovým t-testem v programu Microsoft Office Excel Professional Plus 2016. Nulová hypotéza, že se počet kopií mezi samcem a samicí neliší, byla zamítnuta, pokud hladina významnosti klesla pod 5 %. Souhrnné výsledky qPCR jsou uvedeny v **Tabulce III** a jsou graficky znázorněny na **Obr. 7**.

U rDNA genů byla oproti ostatním sekvencím snížena koncentrace templátové DNA na polovinu a zdvojnásobena koncentrace primerů (viz kapitolu 3.8). Experimenty ukázaly mezi jedinci značnou variabilitou v počtu genů pro rDNA (18S i 28S sekvencí). Počet klastrů rDNA se podle qPCR výsledků neliší mezi pohlavím (**Obr. 7a, 7b**). Zajímavý je poměr 28S rDNA kopií mezi českou a nizozemskou populací (**Obr. 7b**). Tato sekvence je u jedinců náležících k populaci z Nizozemska namnožena bez ohledu na pohlaví (ANOVA;  $F_{1,8} = 22,004$ ,  $p < 0,05$ ). Účinnost reakce při experimentech s 28S rDNA na vzorcích nizozemské populace byla ale opakovaně nízká (nejvyšší dosažená účinnost odpovídala 73,6 %).

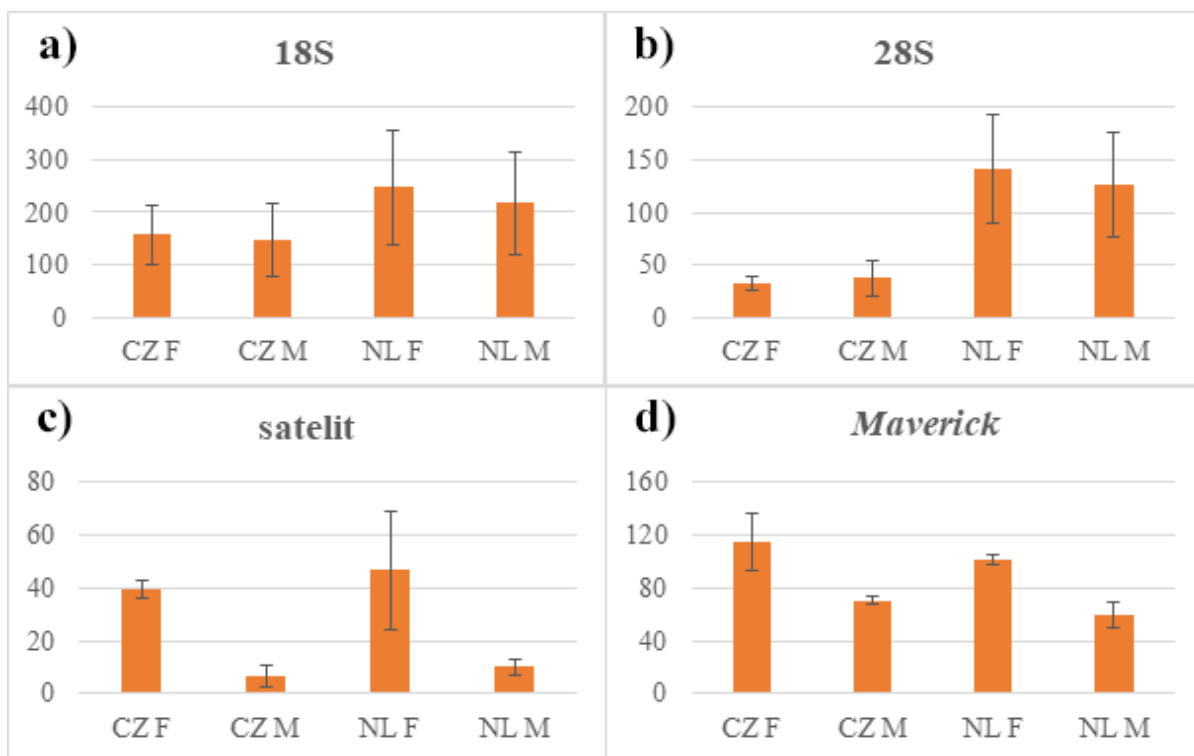
U samic bylo odhaleno markantně větší množství kopií satelitní tandemové repetice, a to jak u české, tak u nizozemské populace (**Obr. 7c**). Samice nizozemské populace vykazovaly největší směrodatnou odchylku.

Experimenty s repetitivní *Maverick* odhalují prokazatelně vyšší počet kopií v genomu samic, viz **Obr. 7d**. Transpozon *Maverick* byl v této práci testován jako dvě oddělené

sekvence *Mav1* a *Mav2* (**Příloha I**), na které byly také při qPCR navrženy dva páry primerů a byly ověřovány každý zvlášť. V reakcích s primery navrženy na úsek *Mav2*, ale opakovaně vnikaly vedlejší produkty, což bylo odhaleno analýzou křivky tání. Proto byl z testu vyloučen.

**Tabulka III:** Výsledky qPCR experimentů srovnávajících relativní počty kopií čtyř vybraných sekvencí (ve sloupci **Sekvence**) předivky brslenové *Yponomeuta cagnagella* u dvou geografických populací. **CZ** = česká populace, **NL** = nizozemská populace, **F** = samice, **M** = samci. Tabulka ukazuje průměrné počty kopií technických triplikátů u tří biologických vzorků (**Vzorek I, II, III**), které byly stanoveny na základě účinnosti reakce s referenčním genem *Ace* (**E<sub>ref</sub>**) a účinnosti s testovanou sekvencí (**E<sub>sek</sub>**). Dále je uveden průměr těchto hodnot a směrodatná odchylka (**S. D.**). Poslední sloupec ukazuje **p-hodnotu** t-testu, kterým byla ověřována hypotéza, že relativní počet kopií vybraných sekvencí se neliší mezi pohlavími. Hodnoty **nižší než 0,05** jsou statisticky průkazné a dokazují, že počet kopií se mezi pohlavími liší.

Sekvence	Populace	Pohlaví	Vzorek I	Vzorek II	Vzorek III	Průměr	S. D.	E <sub>ref</sub>	E <sub>sek</sub>	t-test p-hodnota
18S	CZ	F	217,502	150,044	107,011	158,186	55,693	0,822	0,846	0,852
		M	130,337	224,679	88,913	147,976	69,580			
18S	NL	F	238,180	144,210	358,110	246,833	107,212	0,886	0,879	0,739
		M	323,587	194,898	132,393	216,959	97,487			
28S	CZ	F	38,359	32,557	25,610	32,175	6,382	0,918	0,824	0,604
		M	29,876	56,713	27,036	37,875	16,375			
28S	NL	F	160,738	83,204	180,014	141,319	51,243	0,812	0,736	0,739
		M	173,240	131,471	75,422	126,711	49,082			
<i>Mav1</i>	CZ	F	134,778	91,205	117,322	114,435	<b>21,929</b>	0,955	1	<b>0,026</b>
		M	69,303	68,114	73,882	70,433	3,045			
<i>Mav1</i>	NL	F	103,814	103,902	97,148	101,622	3,874	1,019	1,075	<b>0,002</b>
		M	50,877	69,801	58,254	59,644	9,538			
sat	CZ	F	39,122	36,284	42,643	39,350	3,185	0,935	0,976	<b>0,001</b>
		M	4,084	4,202	10,954	6,413	3,932			
sat	NL	F	65,252	53,228	21,897	46,792	<b>22,382</b>	0,999	1,012	<b>0,047</b>
		M	12,967	7,361	9,894	10,074	2,807			



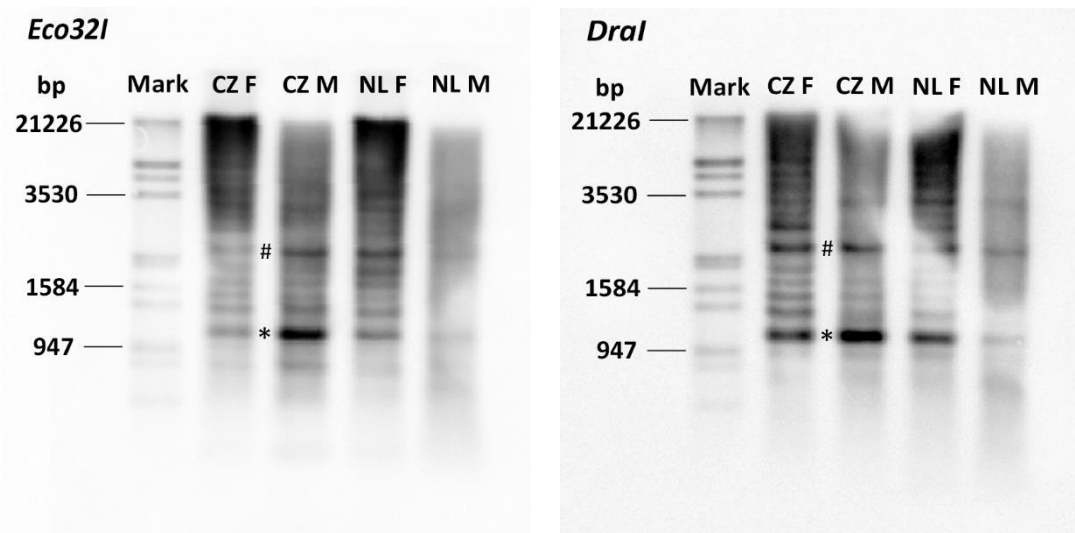
**Obr. 7:** Grafické zobrazení výsledků kvantitativní PCR pro každou testovanou repetitivní sekvenci. Na ose y jsou relativní počty kopií a výška sloupce ukazuje celkový průměr hodnot dosažených třemi jedinci. **CZ** = česká populace, **NL** = nizozemská populace, **F** = samice, **M** = samci. Standartní odchylka je v grafu vynesena jako chybová úsečka na každém ze sloupců. (a) 18S (b) 28S (c) satelit (d) Maverick.

### 4.3 Charakteristika vybrané tandemové repetice

Na základě konsensus sekvencí satelitní tandemové repetice, které pocházejí z RepeatExplorer analýzy, byla očekávaná délka monomeru kolem 740-760 bp. Tři satelitní sekvence, které byly zaklonovány a osekvenovány, měly délku 1144 bp, 944 bp, 944 bp. Lišily se vzájemně i vůči konsensu insercí o délce 152 bp uvnitř sekvence. Pro ověření tandemové povahy vybrané satelitní repetice byla provedena Southernova hybridizace. Celogenomová DNA od jednoho zástupce obou geografických populací a obou pohlaví byla parciálně naštěpena restrikcími enzymy s jedním štěpným místem v předpokládaném monomeru. Neúplné štěpení spočívalo v použití nízkého počtu jednotek endonukleáz, čímž vznikly různě dlouhé fragmenty. Předpokládaný byl vznik typického „žebříčku“ tvořeného z proužků DNA s rozestupy odpovídající délce monomeru.

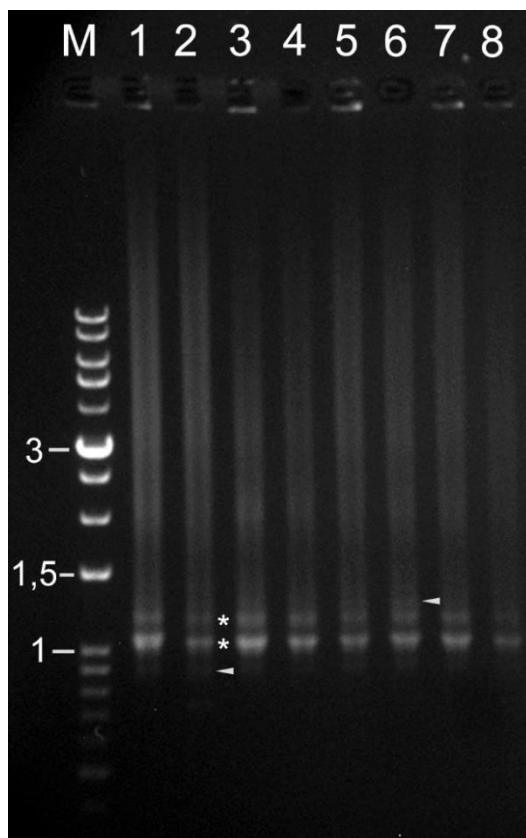
Výsledek Southernovy hybridizace (**Obr. 8**) ukazuje, že nejkratší zřetelné fragmenty tvořily proužek o velikosti zhruba 980 bp (**Obr. 8**, vyznačeno \*). Další výrazný proužek měl velikost 2480 bp (**Obr. 8**, vyznačeno #). Vzdálenost mezi těmito dvěma nejvýraznějšími signály tak odpovídá 1500 bp, tedy dvojnásobku predikovaného monomeru. Mezi těmito nápadnými fragmenty je však řada slabších proužků. Rozestupy mezi nimi byly s ohledem na marker stanoveny na 310, 220, 280 a 280 bp. Tento výsledek by mohl indikovat, že satelit interaguje s dalšími tandemovými repeticemi, což by vysvětlovalo i rozdíl v délce zaklonované DNA oproti predikovanému konsensu.

Štěpení oběma enzymy poskytuje obdobný výsledek. U samic jsou výrazné hlavně delší produkty, zatímco u samce zastupujícího českou populaci je nápadný produkt o velikosti zhruba 980 bp. U samců je signál slabší, a to zejména u samce zastupujícího nizozemskou populaci.



**Obrázek 8:** Provedená Southernova hybridizace ukazuje tandemovou povahu satelitní repetice. „**Mark**“ znamená marker, kterým byl Molecular Weight Marker III, DiG-labeled (Roche Diagnostic), velikosti jednotlivých proužků jsou uvedeny v počtu bp. **CZ** = české populace, **NL** = nizozemská populace, **F** = samice, **M** = samci, \* značí fragment o délce 980 bp, # značí fragment dlouhý 2480 bp. Síla proužku ukazuje na množství produktu dané velikosti. Na obrázku vlevo byla DNA natrávena restrikcí enzymem *DraI*, vpravo byl jako endonukleáza použit *Eco32I*. Expoziční čas při pořizování fotografií byl 30 sekund.

Vybraná satelitní repetice byla podezřelá z jiného než pravidelně tandemového uspořádání již z výsledků PCR amplifikace specifickými primery uvedenými v kapitole 3.3 a následné elektroforetické separace, viz **Obr. 9**. Délka dvou nápadných fragmentů (na **Obr. 9** označených \*) je 1020 a 1170 bp. Méně nápadné proužky na fotografii nesnadno pozorovatelné mají velikost cca 900 bp spodní z nich, 1290 bp horní (**Obr. 9**, vyznačeno šipkou). Rozestup mezi jednotlivými fragmenty je 120, 150 a 120 bp.



**Obrázek 9:** Elektorforéza PCR produktů se specifickými primery pro studovaný satelit v 1% agarózovém gelu. Délka gelu byla 10 cm a do každé jamky bylo nanášeno 5  $\mu$ l PCR reakce. Separace probíhala 45 minut při napětí 110 V. „M“ označuje použitý marker PCR BIO Ladder I (PCR Biosystems, Velká Británie), **číselné hodnoty** ve sloupci vlevo odpovídají počtu párů bazí v kbp. Do jamek 1-2 bylo nanášeno DNA dvou různých českých samic, 3-4 DNA českých samců, 5-6 DNA samic nizozemské samice, 7-8 DNA nizozemských samců. Dva nejvýraznější fragmenty DNA jsou označeny \* a odpovídají cca 1020 a 1170 bp. Šipky ukazují na méně viditelné proužky o délce zhruba 900 bp a 1290 bp.



## 5 Diskuze

### 5.1 Hybridizace *in situ*

Jedním z cílů této práce bylo ověřit přítomnost vybraných repetic na pohlavním chromosomu W, proto bylo nejprve potřeba spolehlivě identifikovat pohlavní chromosomy v pachytenních oocytech předivky brslenové. To bylo v případě většiny jader možné už po nabarvení DAPI (**Obr. 4-6**). Toto fluorescenční barvivo se váže především do AT bohatých oblastí genomu, což bývají často repetitivní sekvence (Ellison a Howard 1981; Flickinger 2015). Nejvýrazněji DAPI pozitivní byla střední část chromosomu W, z čehož lze dedukovat, že je AT bohatší než zbytek genomu. Přestože další oblasti chromosomu W nebyly již tolik nápadné, většinou byl tento chromosom dobře odlišitelný od spárovaných chromosomů Z po celé své délce. To nasvědčuje tomu, že heterochromatin tvoří pravděpodobně celý chromosom W, nejen jeho středovou část. K podobným závěrům došly i další práce zabývající se pohlavními chromosomy u tohoto druhu, např. Veselá (2012) ve své práci ukázala, že při obarvení orceinem se samičí specifický pohlavní chromosom *Yponomeuta cagnagella* výrazně obarví celý nebo s malým středovým přerušením. Také v práci (Hora a kol. 2019) autoři tvrdí, že se W chromosom *Y. cagnagella* zdál celý tvořen heterochromatinem.

Ačkoli je chromosom W většinou identifikovatelný pouze po obarvení DAPI, pro zvýšení spolehlivosti jeho detekce byla použita genomová *in situ* hybridizace. Signál sondy nebyl většinou rovnoměrně jasný. Zatímco v některých jádrech byla sonda výrazná po celé délce chromosomu (například **Obr. 4i**), v jiných jádrech jedna chromosomální polovina (viz **Obr. 5f**) a jinde byla nápadná jeho středová část (**Obr. 5i**) korelující s DAPI pozitivním úsekem. Rozdíl může být způsoben různou mírou kondenzace chromatinu čili stupněm aktuálního rozvolnění. Sekvenční obsah také hraje svoji roli. Silně značené úseky pravděpodobně odpovídají nějaké velmi časté repetici, protože nadbytek sond komplementárních s touto repetitivní sekvencí hybridizuje rychleji, než jsou detekovány méně abundantní repetice. Rozdíly v hybridizaci samičí sondy však nesouvisí s vnitrodruhovou variabilitou chromosomu, neboť se vyskytovaly i v rámci preparátu z jednoho jedince.

Z vybraných repetitivních sekvencí byl úspěšně lokalizován pouze transpozon *Maverick* (viz kapitolu **5.4**). Distribuci satelitu a rDNA genů se nepodařilo v genomu *in situ*

hybridizacemi ověřit. Objevily se neočekávané potíže se značením sond nick translací, při které opakovaně vznikaly produkty nevyhovující délky. Příčiny, které za tím mohly stát, nebyly odhaleny a byl zvolen jiný způsob výroby sond – tzv. random-primed labeling. Ani po získání sond neprobíhaly experimenty FISH úspěšně.

Na preparátech po FISH bylo často silné jednolitě pozadí, kvůli kterému nemohly být chromosomy a signály pozorovány. Tento artefakt může být způsoben pozůstatky cytoplasmy, která by měla být odstraněna ideálně již při výrobě chromosomálních preparátů (viz kapitolu 3.6), případně působením HCl během přípravy sklíček na hybridizaci. Ve snaze nalézt řešení a odstranit potenciální proteiny na preparátu byla v některých experimentech použita proteináza K (viz kapitolu 3.7.2), což ovšem nepřineslo očekávaný výsledek a pozadí vznikalo i na takto ošetřených preparátech. Prostor pro optimalizační kroky by tedy mohl být v prodloužení inkubace či zvýšení koncentrace proteinázy K. Pozadí při TSA-FISH také může vznikat nedostatečným zablokováním všech peroxidáz během ošetřování preparátů peroxidem (viz TSA-FISH metodiku v kapitole 3.7.3). Na preparátu tak mohou zůstat i jiné enzymy než křenová peroxidáza, které poté reagují s tyramidem. Další možností způsobující pozadí může být nedostatečné blokování blokovacími činidly, která by měla saturovat vazebná místa, kam by se mohly protilátky nespecificky navázat.

Během některých FISH experimentů nebylo možné detekovat signál, i když se na sklíčku nenacházelo výše zmíněné pozadí. V průběhu této práce se ukázalo, že stringence odmyváni nespecificky navázané sondy je podle standartních protokolů naší laboratoře poměrně vysoká pro detekci repetitivních sekvencí. Studované repetice měli nadpoloviční obsah AT bází a také byly do jisté míry variabilní, což mohlo vést k odmytí navázané sondy z některých monomerů dané repetice. Po optimalizaci stringence odmyváni (viz vzorec v kapitole 3.7.2) bylo dosaženo úspěšného zmapování sekvence *Maverick*.

Zamýšlený způsob, jak lokalizovat studované repetice, spočíval v detekci jejich sekvence pomocí TSA-FISH. Následovala by identifikace W chromosomu pomocí GISH. Tento postup nebyl z časových důvodů dokončen, protože metodu TSA-FISH se nepodařilo dostatečně optimalizovat u všech studovaných sekvencí.

## 5.2 Průběh qPCR

Metodou kvantitativní PCR bylo porovnáváno relativní množství vybraných kopií v genomu samic vůči genomu samců. Při stanovení počtu kopií byla v potaz brána

účinnost dané reakce, která by se optimálně měla blížit 100 %, v provedených experimentech se však pohybovala v rozmezí 73,6 % až 107,5 %. Na celkovou účinnost má vliv kvalita DNA, specificita primerů i účinnost DNA polymerázy. Pokud účinnost reakce překračovala 100 %, naznačuje to vznik nespecifických produktů, například primer dimerů, která ale křivka tání nedetekovala. Experimenty, při kterých účinnosti reakce dosahovaly hodnot menších než 80 %, byly opakovány s jinými vzorky DNA, ale při testování sekvence 28S u jedinců nizozemské populace byla účinnost opakovaně nízká. Řešením by mohlo být použití jiných primerů, na což v průběhu této práce z časových důvodů nedošlo.

Při ověřování množství sekvence *Maverick* v české populaci byla výrazně vyšší směrodatná odchylka u samic než u samců, a podobně je tomu tak i u satelitu v genomu zástupců nizozemské populace (viz **Tabulku III**, kapitola **4.2**). To ukazuje na zvýšenou variabilitu sekvencí na W chromosomu, na kterém nedochází k rekombinaci.

### 5.3 Geny ribosomální DNA

Analýza RepeatExplorer predikovala zvýšený počet klastrů rDNA v genomu nizozemských samic oproti tamějším samcům. Protože samičí genom se od samčího liší zejména přítomností W chromosomu, lze předpokládat lokalizaci rDNA klastrů právě na něm. Rozdíl v počtu kopií byl ověřován metodou kvantitativní PCR. Výsledky ukázaly na značnou variabilitu, co se týče počtu kopií rDNA genů, ať už v sekvenci 18S nebo 28S napříč jedinci u obou populací (viz **Obr. 7a, 7b**). Vnitrodruhová variabilita v počtu kopií rDNA genů je běžná, jejich počet se dynamicky mění i v rámci několika málo generací (Eickbush a Eickbush 2007; Nelson a kol. 2019), ale jedinci s nedostatečným nebo přílišným množstvím rDNA genů jsou pozorováni vzácně (například Lyckegaard a Clark 1991). Rozdíly mezi výsledky qPCR a předchozí bioinformatické analýzy mohou být tedy způsobeny touto variabilitou, kde pro Illumina sekvenování byly náhodou vybrány nizozemské samice se spíše vyšším počtem kopií genů pro rRNA.

Absence signifikantních rozdílů v počtu rDNA genů mezi pohlavími u obou populací nenaznačuje, že by se NOR mohly nacházet na autosomech. To odpovídá předchozím výsledkům, kde u předivky brslenové byly nalezeny dva NOR regiony na terminálních koncích dvou různých bivalentů (Hladová 2015), v této práci byly ale rDNA geny lokalizovány na samčích preparátech, kde je většinou těžké identifikovat pohlavní

chromosomy. Alternativně by se tedy regiony rDNA genů mohly nalézat na obou pohlavních chromosomech.

Autosomální lokalizace se zdá pravděpodobnější, protože u motýlů se vazba rDNA na pohlavní chromosomy vyskytuje vzácně. To může být důsledkem inaktivace W chromosomu v samičích somatických jádrech (Marec a kol. 2010). Na druhou stranu lokalizace na W nutně neznamená, že je klastr inaktivní – například u skvrnopásníků *Abraxas grossulariata* a *A. sylvata*, kde se hlavní rDNA klastry nachází na koncích obou W a Z chromosomů, jsou součástí jaderka a tedy transkripčně aktivní (Zrzavá a kol. 2018). NOR se nalézají na bivalentu pohlavních chromosomů také u obalečika jednopásného *Eupoecilia ambiguella* (Šíchová a kol. 2013) nebo u okáče *Bicyclus anynana* (Van't Hof a kol. 2008). Navíc se rDNA nevyhýbá ani jiným heterochromatinovým oblastem genomu, jak bylo pozorováno například u martináče *Antheraea yamamai* (Yoshido a kol. 2005).

Lokalizace rDNA genů na W chromosomu se nepodařila ověřit nepřímou *in situ* hybridizací z diskutovaných důvodů (5.1). Na jednom z jader při TSA-FISH experimentu byly signály sondy 18S detekovány na terminálních koncích jednoho z blíže neurčených bivalentů (viz **Obr. 11 v Příloze II**). Jiná pachytenní jádra ovšem neposkytla obdobný výsledek, proto lokalizaci 18S genu nelze bez opakování dokázat.

Pozorovaný rozdíl v počtu 18S a 28S genů v rámci jedné populace i pohlaví může souviset s přesunem části rDNA jednotky a jejího namnožení pomocí transposonů. Některé mobilní elementy se preferenčně inkorporují do sekvencí rDNA, například retrotranspozony R1 a R2 v regionu 28S rDNA u členovců (Pérez-González a Eickbush 2001). Také transpozony *Pokey* se váží specificky do 28S rDNA, jak bylo dokázáno u hrotnatky *Daphnia* (Penton a Crease 2004). K případnému přesunu části sekvence rDNA na jiné místo genomu tak mohlo dojít při transpozici společně s mobilním elementem.

Z qPCR výsledků je patrný mezipopulační rozdíl v množství rDNA genu 28S (viz kapitolu 4.2). Vzhledem k nízké účinnosti průběhu reakce (diskutováno v kapitole 5.2) si však netroufám tento výsledek interpretovat.

## 5.4 Transpozon *Maverick*

*Maverick*, DNA transpozon podtřídy 2, je běžný mobilní element eukaryot, který má schopnost se šířit po genomu. Lokalizace tohoto transpozonu v genomu je pravděpodobně náhodná, protože *Maverick* se chová jako sobecký element (Desjardins a kol. 2008).

U bičenky poševní *Trichomona vaginalis* bylo nalezeno zhruba 3000 kopií tohoto transpozonu, což odpovídá 30 % jejího genomu (Pritham a kol. 2007).

V této práci se podařilo tento transpozon lokalizovat v genomu *Yponomeuta cagnagella* (viz kapitolu 4.1). Na preparátu po TSA-FISH byl pravidelně pozorovatelný nápadný heterochromatinový blok ve střední části W chromosomu značený DAPI (viz Obr. 6 a, j). Sonda *MavI* transpozon *Maverick* detekovala mimo tuto DAPI pozitivní oblast, v koncových čtvrtinách W chromosomů (viz Obr. 6 c, f, i, l). Obdobná lokalizace sekvence na obou koncích chromosomu W byla pozorována při využití BAC klonů (umělého bakteriálního chromosomu) z W chromosomu *Bombyx mori* pro identifikaci částí genomu u *B. mandarina*. Jeden z analyzovaných klonů se vázal do obou subterminálních oblastí W chromosomu (Yoshido a kol. 2007).

Chromosom W u předivek má neo-pohlavní původ a vznikl fúzí autosomu a původního W chromosomu (Hladová a kol. 2017). Prokázaná distribuce studovaného elementu na chromosomu neo-W může znamenat, že tato fúze je natolik stará, že obě části chromosomu jsou zdegenerované a hromadí repetitivní sekvence. Transpozon *Maverick* se podle získaných výsledků preferenčně vmezeřuje do méně AT-bohatých oblastí. Jeho přítomnost na chromosomu W není až tak překvapivá, jelikož hlavní složkou tohoto chromosomu u motýlů jsou právě mobilní elementy (Traut a kol. 2007). Nejčastěji to však bývají hlavně retrotransposony (Abe a kol. 2005; 2010; Fuková a kol. 2007). *Maverick* je tedy zástupce méně časté třídy repetice na W, další známý DNA transposon podtřídy 2 je *Helitron* na chromosomu W zavíječe moučného *Epehstia kuehniella* (Traut a kol. 2013).

Z provedené kvantitativní PCR vyplývá, že *Maverick* je obohacen v samičím genomu oproti samčímu u obou populací, což dále potvrzuje jeho vazbu na W chromosom. Částečně tak byla potvrzena predikce analýzy RepeatExplorer, která poukázala na W obohacení v genomu českých samic. U české populace byla zároveň pozorována vyšší směrodatná odchylka u samic než u samců (viz Tabulku III, kapitola 4.2). To ukazuje na zvýšenou variabilitu v množství kopií dané sekvencí na W chromosomu, což pravděpodobně souvisí s celkově vyšší dynamikou sekvencí na tomto chromosomu.

## 5.5 Satelitní tandemová repetice

Studovaná tandemová repetice vykazovala zvláštní chování od prvních experimentů, kdy se PCR nedařilo namnožit fragment očekávané velikosti (kapitola 4.3).

Sekvenování a Southernova hybridizace poukazují na fakt, že tento satelit je pravděpodobně součástí komplexu několika tandemových repetic. Podobná situace, kdy je satelit tvořený několika typy monomerů, je známa například u brouka *Chrysolina carnifex*, který má satelitní komplex tvořený šesti různými monomery o zhruba 200 bp. Ty jsou organizovány do dimerů nebo trimerů a společně tvoří repetitivní tandemovou jednotku (Palomeque a kol. 2005).

Výsledky kvantitativní PCR ukazují velké rozdíly v počtu kopií mezi pohlavími u obou populací (viz Obr. 7c). Přestože se nepodařilo lokalizovat tuto sekvenci přímo na chromosomech, lze přepokládat přítomnost celé řady kopií satelitu na pohlavním chromosomu W, což se shoduje s výsledky předchozích bioinformatických analýz. Další satelity na chromosomu W jsou dosud známy jen u zavíječe paprikového (*Plodia interpunctella*) (Dalíková a kol. 2017b), můry zelné (*Mamestra brassicae*) (Borsatti a Mandrioli 2005) a blýskavky kukuřičné *Spodoptera frugiperda* (Lu a kol. 1994). Tyto případy reprezentují většinu popsaných satelitů se známou distribucí v genomu u zástupců řádu Lepidoptera.

Podobně jako kvantitativní PCR, i Southernova hybridizace potvrdily přítomnost většího množství této repetice u samic v obou studovaných populacích. Zatímco u samců převládaly hybridizační signály odpovídající kratším fragmentům, samičí DNA vykazovala výrazné signály i na velmi dlouhých fragmentech. To pravděpodobně opět souvisí s přítomností této sekvence na chromosomu W, kde dochází k degeneraci sekvencí, a tudíž je zde větší pravděpodobnost mutace cílové sekvence rozpoznávané restriktivním enzymem. Při štěpení tak vznikají delší fragmenty, které lze pozorovat jako „smear“ u samic obou populací (viz **Obr. 8**).

Dalším zajímavým výsledkem je vysoká variabilita v počtu monomerů dané satelitní sekvence u nizozemských samic. To by nasvědčovalo dynamické evoluci počtu kopií satelitu na chromosomu W. Množství satelitní sekvence se sice může vnitrodruhově lišit (Charlesworth a kol. 1994), otázkou ale zůstává, jaký by byl mechanismus změn počtu monomeru satelitu právě na chromosomu W. Často udávaným způsobem změn v tandemových repeticích s delším opakováním je nerovnoměrný meiotický crossing-over (Charlesworth a kol. 1994), to však u samic motýlů nepřichází v úvahu, protože mají achiasmatickou meiózu. Satelity se v genomu také šíří pomocí extrachromosomální kruhové DNA, která se vnoří do řetězce jako intron (Charlesworth a kol. 1994). Další možný mechanismus je ektopická rekombinace, která se v případě chromosomu W uplatnila

například při již zmíněném přesunu části genu *laminin A* u drsnokřídlece březového (*Biston betularia*) (Van't Hof a kol. 2013). V neposlední řadě může docházet ke změnám v počtu kopií studovaného satelitu na chromosomu W transpozicí společně s některým mobilním elementem, které se na tomto chromosomu hromadí, tento mechanismus byl navržen jako možnost šíření satelitů v genomu některých měkkýšů (Satović a kol. 2016).

## 6 Závěr

Tato práce se zabývala studiem tří vybraných repetitivních sekvencí na pohlavním chromosomu W u předivky brslenové (*Yponomeuta cagnagella*), konkrétně se jednalo o novou satelitní sekvenci transposon ze *Maverick* a hlavní rDNA. Tyto sekvence byly vybrány na základě předchozích bioinformatických analýz repetitivní složky genomu *Y. cagnagella* a vykazovaly obohacení u samic alespoň u jedné ze dvou studovaných populací z České republiky a Nizozemska.

Tyto rozdíly mezi pohlavími byly potvrzeny jen v případě satelitní sekvence a transposonu. Ribosomální DNA vykazovala velkou vnitro populační i mezi populační variabilitu, ale pravděpodobně není vázána na pohlavní chromosomy. Transposon *Maverick* byl jako jediný ze studovaných sekvencí úspěšně lokalizován přímo na chromosomech pomocí fluorescenční in situ hybridizace, která ukázala silnou akumulaci této repetice ve velkých koncových oblastech na pohlavním chromosomu W.

Přestože motýli (řád Lepidoptera) představují druhově nejbohatší skupinu živočichů s heterogametickými samicemi, o složení jejich pohlavních chromosomů W máme většinou jen kusé informace. Tato práce tedy přináší další kousek do skládky našich znalostí o tomto pohlavním chromosomu. Zároveň se jako první zabývá vnitrodruhovou dynamikou repetice na chromosomu W. RepeatExplorer se v této práci ukázal jako užitečný nástroj pro studium repetice na pohlavních chromosomech, který je schopen poskytovat kandidátní sekvence pro další studium.



## 7 Seznam použité literatury

- Abe H, Fujii T, Shimada T, Mita K (2010) Novel non-autonomous transposable elements on W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Genet* 89: 375. <https://doi.org/10.1007/s12041-010-0049-3>
- Abe H, Mita K, Yasukochi Y, Oshiki T, Shimada T (2005) Retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Cytogenet Genome Res* 110:144–151 . <https://doi.org/10.1159/000084946>
- Bakker AC, Campos Louçã J, Roessingh P, Menken SBJ (2011) The cost of mating: Influences of life history traits and mating strategies on lifespan in two closely related *Yponomeuta* species. *Int J Zool.* <https://doi.org/10.1155/2011/658908>
- Blackmon H, Ross L, Bachtrog D (2017) Sex Determination, Sex Chromosomes, and Karyotype Evolution in Insects. *J Hered* 108:78–93 . <https://doi.org/10.1093/jhered/esw047>
- Borsatti F, Mandrioli M (2005) Conservation of HP1 and methylated H3 histones as heterochromatic epigenetic markers in the holocentric chromosomes of the cabbage moth, *Mamestra brassicae* (Lepidoptera). *Eur J Entomol* 102:625–632. <https://doi.org/10.14411/eje.2005.088>
- Carabajal Paladino LZ, Nguyen P, Šichová J, Marec F (2014) Mapping of single-copy genes by TSA-FISH in the codling moth, *Cydia pomonella*. *BMC Genet* 15:S15 . <https://doi.org/10.1186/1471-2156-15-S2-S15>
- Carter DJ, Spencer KA (1986) Pest Lepidoptera of Europe With Special Reference to the British Isles. David J. Carter , K. A. Spencer. *Q Rev Biol* 61:278–279 . <https://doi.org/10.1086/414980>
- Casanova M, Pasternak M, ElMarjou F, LeBaccon P, Probst A V., Almouzni G (2013) Heterochromatin Reorganization during Early Mouse Development Requires a Single-Stranded Noncoding Transcript. *Cell Rep* 4:1156–1167 . <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.08.015>
- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371:215–220 . <https://doi.org/10.1038/371215a0>
- Dalíková M, Zrzavá M, Hladová I, Nguyen P, Šonský I, Flegrová M, Kubičková S, Voleníková A, Kawahara AY, Peters RS, Marec F (2017a) New Insights into the Evolution of the W Chromosome in Lepidoptera. *J Hered* 108:709–719 . <https://doi.org/10.1093/jhered/esx063>
- Dalíková M, Zrzavá M, Kubičková S, Marec F (2017b) W-enriched satellite sequence in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae). *Chromosom Res* 25:241–252 . <https://doi.org/10.1007/s10577-017-9558-8>
- Desjardins CA, Gundersen-Rindal DE, Hostetler JB, Tallon LJ, Fadrosch DW, Fuester RW, Pedroni MJ, Haas BJ, Schatz MC, Jones KM, Crabtree J, Forberger H, Nene V (2008) Comparative genomics of mutualistic viruses of *Glyptapanteles* parasitic wasps. *Genome Biol* 9: . <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-12-r183>
- Dupuy C, Periquet G, Serbielle C, Bézier A, Louis F, Drezen JM (2011) Transfer of a chromosomal *Maverick* to endogenous bracovirus in a parasitoid wasp. *Genetica* 139:489–496 . <https://doi.org/10.1007/s10709-011-9569-x>
- Eickbush TH, Eickbush DG (2007) Finely Orchestrated Movements: Evolution of the Ribosomal RNA Genes. *Genetics* 175:477–485 . <https://doi.org/10.1534/genetics.107.071399>
- Ellison JR, Howard GC (1981) Non-random position of the A-T rich DNA sequences in early embryos of *Drosophila virilis*. *Chromosoma* 83:555–561 . <https://doi.org/10.1007/BF00328279>

- Ferreira D, Meles S, Escudeiro A, Mendes-da-Silva A, Adegas F, Chaves R (2015) Satellite non-coding RNAs: the emerging players in cells, cellular pathways and cancer. *Chromosome Res* 23:479–493 . <https://doi.org/10.1007/s10577-015-9482-8>
- Flickinger R (2015) AT-rich repetitive DNA sequences, transcription frequency and germ layer determination. *Mech Dev* 138:227–232 . <https://doi.org/10.1016/j.mod.2015.10.004>
- 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 . <https://doi.org/10.1139/g05-063>
- Fuková I, Traut W, Vítková M, Nguyen P, Kubíčková S, Marec F (2007) Probing the W chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin. *Chromosoma* 116:135–145 . <https://doi.org/10.1007/s00412-006-0086-0>
- Gerrits-Heybroek EM, Herrebout WM, Ulenberg SA, Wiebes JT (1978) Host plant preference of five species of small ermine moths (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Entomol Exp Appl* 24:360–368 . <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1978.tb02794.x>
- Gotter AL, Levine JD, Reppert SM (1999) Sex-Linked period Genes in the Silkworm, *Antheraea pernyi*. *Neuron* 24:953–965 . [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81042-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81042-9)
- Hladová (2015) Nové cytogenetické markery a evoluční dynamika karyotypů motýlů [ New cytogenetic markers and evolution dynamics of lepidopteran karyotypes. Mgr. Thesis, in Czech] p. 68, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Hladová I, Roessingh P, Provazník J, Šlajsová M, Sahara K, Marec F, Nguyen P (2017) Cytogenetic analysis of multiple sex chromosome system and chromosomal rearrangements in small ermine moths of the genus *Yponomeuta*, 16th Congress of the European society for evolutionary biology (ESEB), 20.-25.8.2017, Groningen, Nizozemsko
- Hora KH, Marec F, Roessingh P, Menken SBJ (2019) Limited intrinsic postzygotic reproductive isolation despite chromosomal rearrangements between closely related sympatric species of small ermine moths (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Biol J Linn Soc* 128:44–58 . <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blz090>
- Hora KH, Roessingh P, Menken SBJ (2005) Inheritance and plasticity of adult host acceptance in *Yponomeuta* species: Implications for host shifts in specialist herbivores. In: *Entomologia Experimentalis et Applicata*. s 271–281. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2005.00287.x>
- Howard DJ, Berlocher SH (1998) Sex linkage and speciation in Lepidoptera. In: *Endless Forms: Species and Speciation*. Oxford University Press on Demand
- Kaiser VB, Bachtrog D (2010) Evolution of Sex Chromosomes in Insects. *Annu Rev Genet* 44:91–112 . <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163600>
- Kavčič A, Kolšek M (2016) Namnožitev gosenic trdoleskovega zapredkarja (*Yponomeuta cagnagella*) v Sloveniji v 2016. Novice iz varstva gozdov. <https://doi.org/10.20315/nvg.9.4>
- Kawamura N, Niino T (1991) Identification of the Z-W bivalent in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genetica* 83:121–123 . <https://doi.org/10.1007/BF00058528>
- Kim Y-J, Lee J, Han K (2012) Transposable Elements: No More „Junk DNA“. *Genomics Inform* 10:226 . <https://doi.org/10.5808/gi.2012.10.4.226>
- King LM, Cummings MP (1997) Satellite DNA repeat sequence variation is low in three species of burying beetles in the genus *Nicrophorus* (Coleoptera: Silphidae). *Mol Biol Evol* 14:1088–1095 . <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025718>
- Kiuchi T, Koga H, Kawamoto M, Shoji K, Sakai H, Arai Y, Ishihara G, Kawaoka S, Sugano S, Shimada T, Suzuki Y, Suzuki MG, Katsuma S (2014) A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm. *Nature* 509:633–636 .

- <https://doi.org/10.1038/nature13315>
- Krupovic M, Koonin E V (2015) Polintons: a hotbed of eukaryotic virus, transposon and plasmid evolution. *Nat Rev Microbiol* 13:105–115 . <https://doi.org/10.1038/nrmicro3389>
- Lemos B, Araripe LO, Hartl DL (2008) Polymorphic Y Chromosomes Harbor Cryptic Variation with Manifold Functional Consequences. *Science* (80- ) 319:91–93 . <https://doi.org/10.1126/science.1148861>
- Löfstedt C, Herrebut WM, Menken SBJ (1991) Sex pheromones and their potential role in the evolution of reproductive isolation in small ermine moths (Yponomeutidae). *Chemoecology* 2:20–28 . <https://doi.org/10.1007/BF01240662>
- Lu Y-J, Kochert GD, Isenhour DJ, Adang MJ (1994) Molecular characterization of a strain-specific repeated DNA sequence in the fall armyworm *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Mol Biol* 3:123–130. doi: 10.1111/j.1365-2583.1994.tb00159.x
- Lukhtanov V (2015) The blue butterfly *Polyommatus (Plebicula) atlanticus* (Lepidoptera, Lycaenidae) holds the record of the highest number of chromosomes in the non-polyploid eukaryotic organisms. *Comp Cytogenet* 9:683–690 . <https://doi.org/10.3897/compcytogen.v9i4.5760>
- Lukhtanov VA (2000) Sex chromatin and sex chromosome systems in nonditrysian Lepidoptera (Insecta). *J Zool Syst Evol Res* 38:73–79 . <https://doi.org/10.1046/j.1439-0469.2000.382130.x>
- Lyckegeard EM, Clark AG (1991) Evolution of ribosomal RNA gene copy number on the sex chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *Mol Biol Evol*. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040664>
- Marec F, Traut W (1993) Synaptonemal complexes in female and male meiotic prophase of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). *Heredity* 71, 394–404. <https://doi:10.1038/hdy.1993.154>
- Marec F, Sahara K, Traut W (2010) Rise and Fall of the W Chromosome in Lepidoptera. <https://doi:10.1201/9781420060201-c3>
- Menken SBJ, Herrebut WM, Wiebes JT (1992) Small Ermine Moths (Yponomeuta): Their Host Relations and Evolution. *Annu Rev Entomol* 37:41–66 . <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.000353>
- Murray MGG, Thompson WFF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res* 8:4321–4326 . <https://doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>
- Nelson JO, Watase GJ, Warsinger-Pepe N, Yamashita YM (2019) Mechanisms of rDNA Copy Number Maintenance. *Trends Genet* 35:734–742 . <https://doi.org/10.1016/j.tig.2019.07.006>
- 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 . <https://doi.org/10.1007/s10709-009-9424-5>
- Nilsson N, Löfstedt C, Dävring L (1988) Unusual sex chromosome inheritance in six species of small ermine moths (*Yponomeuta*, Yponomeutidae, Lepidoptera). *Hereditas* 8:259–265 . <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1988.tb00311.x>
- Novák P, Neumann P, Pech J, Steinhaisl J, Macas J (2013) RepeatExplorer: a Galaxy-based web server for genome-wide characterization of eukaryotic repetitive elements from next-generation sequence reads. *Bioinformatics* 29:792–793 . <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt054>
- Palomeque T, Munoz-Lopez M, Carrillo JA, Lorite P (2005). Characterization and evolutionary dynamics of a complex family of satellite DNA in the leaf beetle *Chrysolina carnifex*

- (Coleoptera, Chrysomelidae). *Chromosome Res* 13: 795–807. <https://doi.org/10.1007/s10577-005-1013-6>
- Penton EH, Crease TJ (2004) Evolution of the transposable element *Pokey* in the ribosomal DNA of species in the subgenus *Daphnia* (Crustacea: Cladocera). *Mol Biol Evol* 21:1727–1739 . <https://doi.org/10.1093/molbev/msh189>
- Pérez-González CE, Eickbush TH (2001) Dynamics of R1 and R2 elements in the rDNA locus of *Drosophila simulans*. *Genetics* 158:1557–1567
- Plohl M, Luchetti A, Meštrović N, Mantovani B (2008) Satellite DNAs between selfishness and functionality: Structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. *Gene* 409:72–82 . <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.11.013>
- Prins J De, Saitoh K (2012) Karyology and Sex Determination. Handbook of Zoology. Lepidoptera, Moths and Butterflies, Vol.2, de Gruyter, Berlin, Německo
- Pritham EJ, Putliwala T, Feschotte C (2007) *Mavericks*, a novel class of giant transposable elements widespread in eukaryotes and related to DNA viruses. *Gene* 390:3–17 . <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.08.008>
- Raijmann LEL, Menken SBJ (2000) Temporal variation in the genetic structure of host-associated populations of the small ermine moth *Yponomeuta padellus* (Lepidoptera, Yponomeutidae). *Biol J Linn Soc* 70:555–570 . <https://doi.org/10.1006/bijl.1999.0410>
- Rishi S, Sahni G, Rishi K (1999) Inheritance of unusual sex chromosome evidenced by AAWZ sex trivalent in *Trabala vishnu* (Lasiocampidae, Lepidoptera). *Cytobios* 100:85–94
- Roessingh P, Xu S, Menken SBJ (2007) Olfactory receptors on the maxillary palps of small ermine moth larvae: evolutionary history of benzaldehyde sensitivity. *J Comp Physiol A* 193:635–647 . <https://doi.org/10.1007/s00359-007-0218-x>
- Sahara K, Yoshido A, Traut W (2012) Sex chromosome evolution in moths and butterflies. *Chromosome Res* 20:83–94 . <https://doi.org/10.1007/s10577-011-9262-z>
- Sambrook J (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Edition (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA
- Satović, E., Vojvoda Zeljko, T., Luchetti, A. (2016) Adjacent sequences disclose potential for intra-genomic dispersal of satellite DNA repeats and suggest a complex network with transposable elements. *BMC Genomics* 17, 997 doi:10.1186/s12864-016-3347-1
- Schaack S, Gilbert C, Feschotte C (2010) Promiscuous DNA: Horizontal transfer of transposable elements and why it matters for eukaryotic evolution. *Trends Ecol. Evol.* 25:537–546. doi: 10.1016/j.tree.2010.06.001.
- Schartl M, Schmid M, Nanda I (2016) Dynamics of vertebrate sex chromosome evolution: from equal size to giants and dwarfs. *Chromosoma* 125:553–571 . <https://doi.org/10.1007/s00412-015-0569-y>
- Šichová J, Nguyen P, Dalíková M, Marec F (2013) Chromosomal Evolution in Tortricid Moths: Conserved Karyotypes with Diverged Features. *PLoS One* 8:e64520 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064520>
- Šichová J, Voleníková A, Dinca V, Nguyen P, Vila R, Sahara K, Marec F (2015) Dynamic karyotype evolution and unique sex determination systems in Leptidea wood white butterflies. *BMC Evol Biol* 15:89 . <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0375-4>
- Slotkin RK, Martienssen R (2007) Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet* 8:272–285 . <https://doi.org/10.1038/nrg2072>
- Sohn JC, Regier JC, Mitter C, Davis D, Landry JF, Zwick A, Cummings MP (2013) A Molecular Phylogeny for Yponomeutoidea (Insecta, Lepidoptera, Ditrysia) and Its Implications for Classification, Biogeography and the Evolution of Host Plant Use. *PLoS One* 8: . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055066>

- Suomalainen E (1969) On the sex chromosome trivalent in some Lepidoptera females. *Chromosoma* 28: . <https://doi.org/10.1007/BF00284928>
- Symonová R, Majtánová Z, Sember A, Staaks GBO, Bohlen J, Freyhof J, Rábová M, Ráb P (2013) Genome differentiation in a species pair of coregonine fishes: an extremely rapid speciation driven by stress-activated retrotransposons mediating extensive ribosomal DNA multiplications. *BMC Evol Biol* 13:42 . <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-42>
- Tanaka Y (1916) Genetic studies on the silkworm. *J Coll Agric* 7 (3):129–255. Tohoku Imperial University, Sapporo, Japan.
- Traut W (1976) Pachytene Mapping in the Female Silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera) *Chromosoma* 58: 275. <https://doi.org/10.1007/BF00292094>
- Traut W, Marec F (1996) Sex Chromatin in Lepidoptera. *Q Rev Biol* 71:239–256 . <https://doi.org/10.1086/419371>
- Traut WA (1999) The evolution of sex chromosomes in insects: Differentiation of sex chromosomes in flies and moths. *Eur J Entomol* 96:227–235
- Traut W, Sahara K, Marec F (2007) Sex Chromosomes and Sex Determination in Lepidoptera. *Sex Dev* 1:332–346 . <https://doi.org/10.1159/000111765>
- Traut W, Vogel H, Glöckner G, Hartmann E, Heckel DG (2013) High-throughput sequencing of a single chromosome: a moth W chromosome. *Chromosom Res* 21:491–505 . <https://doi.org/10.1007/s10577-013-9376-6>
- Turner H, Lieshout N, Van Ginkel WE, Menken SBJ (2010) Molecular phylogeny of the small ermine moth genus *Yponomeuta* (Lepidoptera, Yponomeutidae) in the Palearctic. *PLoS One* 5: . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009933>
- Turner KB, Kirby CS, Dance BW (1975) *Common Pests of Ornamental Trees and Shrubs*, Ministry of Natural Resources, Ontario, Kanada
- Ulenberg SA (2009) Phylogeny of the *Yponomeuta* species (Lepidoptera, Yponomeutidae) and the history of their host plant associations. *Tijdschr voor Entomol* 152:187–207 . <https://doi.org/10.1163/22119434-900000275>
- Van't Hof AE, Marec F, Saccheri IJ, Brakefield PM, Zwaan BJ (2008) Cytogenetic Characterization and AFLP-Based Genetic Linkage Mapping for the Butterfly *Bicyclus anynana*, Covering All 28 Karyotyped Chromosomes. *PLoS One* 3:e3882 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003882>
- Van't Hof AE, Nguyen P, Dalíková M, Edmonds N, Marec F, Saccheri IJ (2013) Linkage map of the peppered moth, *Biston betularia* (Lepidoptera, Geometridae): A model of industrial melanism. *Heredity (Edinb)* 110:283–295 . <https://doi.org/10.1038/hdy.2012.84>
- Věchtová P, Dalíková M, Sýkorová M, Žurovcová M, Füssy Z, Zrzavá M (2016) CpSAT-1, a transcribed satellite sequence from the codling moth, *Cydia pomonella*. *Genetica* 144:385–395 . <https://doi.org/10.1007/s10709-016-9907-0>
- Veselá, J., 2012: Molekulární diference pohlavních chromosomů předivek rodu *Yponomeuta* [Molecular differentiation of sex chromosomes in ermine moths of genus *Yponomeuta*. Mgr. Thesis, in Czech.] - 35 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SIS, Martienssen RA (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science (80- )* 297:1833–1837 . <https://doi.org/10.1126/science.1074973>
- Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P, Morgante M, Panaud O, Paux E, SanMiguel P, Schulman AH (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet* 8:973–982 . <https://doi.org/10.1038/nrg2165>

- Wolf KW, Novák K, Novak K, Marec F (1997) Kinetic organization of metaphase I bivalents in spermatogenesis of Lepidoptera and Trichoptera species with small chromosome numbers. *Heredity (Edinb)* 79:135–143 . <https://doi.org/10.1038/hdy.1997.136>
- 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 . <https://doi.org/10.1007/s00412-005-0013-9>
- Yoshido A, Yasukochi Y, Marec F, Abe H, Sahara K (2007) Fish analysis of the W chromosome in *Bombyx mandarina* and several other species of Lepidoptera by means of *B. mori* W-BAC probes. *J Insect Biotechnol Sericology* 76:1–7 . [https://doi.org/10.11416/jibs.76.1\\_1](https://doi.org/10.11416/jibs.76.1_1)
- Zrzavá M, Hladová I, Dalíková M, Šíchová J, Ůunap E, Kubičková S, Marec F (2018) Sex Chromosomes of the Iconic Moth *Abraxas grossulariata* (Lepidoptera, Geometridae) and Its Congener *A. sylvata*. *Genes (Basel)* 9:279 . <https://doi.org/10.3390/genes9060279>

## 8 Přílohy

### Příloha I: FASTA formát studovaných sekvencí.

#### >*Maverick klon Mav1* (1927 bp)

```
TTGTTAAAAAATGAAATTTCCAAAGCAGACGACTTCACTACAACCTCGATAAAATCTGCGTTAGTTCTCCGAAAAAGGATCTCGTC
ATGGAAAGCTCTTACCTAATTCAATTCGTTGTTTAGTGTGCGGACCGTCCAACCTGTGGAAAACTAATTTGGTGATTGGTCTTCTT
CTTCATCCGAATGGGCTCACTTTCCATAATGTTTACGTGTATTCAAAAACCTCTTACCAGCCTAAGTATTTATTTTTAGAAAAGGT
ATTAGAACAATGTCCTGAGGTGTCCTACCATAAATATCACAATAATGAAGAAGTTTTAAGTTCAAACGAAGCGTCTCCGAATCCG
TGATAATATTTGATGATGTTGCATGTGAAAATCAGAATAATATTCGCGACTATTTTGAATGGGTAGGCACCGTTACATAGATTGC
TTTTATATCAATCAAACCTATAGTAAAGTACAAAACAGCTTATTTCGCGATAATACCAATCTCATTGTTCTTTTTAAACAAGATGA
TATTAACCTTGCCTCATGTCTACGATGAACACGTCAACACAGACATGACATGGAAACAGTTTCGTGAAATGTGTTTCGAAAAATTTGGA
GTGATCCTTACAGTGTTTTGGTTATAAATAAAGATTGCCAAAAAATAATGGGTGTACAGAAATAAATTTGACACATTTATTAGT
TTCGATGAATGAAATATAAGAACGCTTAAACCTATTTATTTAAAGTTTTTTTTGACAAATATCATTATCACTTTTGTGCTCCTC
CCAAGAAGTTGTGCATTCAACCGAAGATGAGTGACGAAAAAGCAATGAAACAACAGATAGTTAAAGCTGCAAAAGCTGTAACAAAG
AAGATTTAAATTAATGAAAAACAATAAAGTAGAAAGTAAATGGTGTAGGAAATATCTGAAACCGATAACGGAACCCCTTAATAT
ATTAGCTGCGCACAGCAATAGCGCTGTCAATAACAACCTTAGAGTTCAAAGAAAACCTCGAACAGTTCCAATGATACAAAACCAAAA
ACTCTCCTAGTAGTTTTTTAAATGAGTCAAATACAACAAAAAAGAGGAAATTTTTCTGAAGTAAGTGAATGTCAACTGGAGAGAAC
AAGGATGATAACAGTTCACATTCAAATGATACGGAATACAATGTAAGTGATCAATTTTTTTGAAGCTGATCTTGATTGGGTATCTAC
TCCAAACGAGAAATCTGTATCTTCTTGGTCGATGTCATCTGAAGTATTCAAAGATGTTCCCTTATGGAGTAAGAAGTAAAAATGAA
AATTAATGATAGGCTCAAACCCTCTTCATGTCCGGCGACAAATGAGTATTTTCAGGAAAAACTTACAACAAAACCAGCGGCCCTC
ATTGAGTTGTTGTTTAAACCATCTCCAGATTTGAGCATCGTTTCCAAGAATGATAAACAGAATTATAAATTAATATGCTAGATAC
TAATGCCCATCACCGCAAATACGATCCCCAACCAACCTATAAACGCAAATCGAGGAAACAAATATATGCATGTAATAAAACCTCTAT
TTAACCAAAAAAGTCAATGAAATGTAAACAAAGGGAGCGGGATACCTATATTTAAAAAAGTTAAAAAAAACGTTGATTTTATTTAC
TGGGATGACCCGAATGAGTTAGTAGAAAGACTAAAATTACTCATTGCTTCTCGTGATGCTGGTAACACTGGAGTGGATAATGAAAT
CATCTCAATAATTGAAGAGCTGAGGGAATGTGGAATAATAACACGATAATAAATACTTAGCAAAAGATAATTTTATTTATTATTAC
GACAACCACCGTCAACTTACTTCAATTCAAAATGAATGTCGATAAATTTGGACACTACGTGCATAAGAGGCTGCGTAGGTGAGAGA
CTTTGCCGGACGTAATACTATTGACAAGGCCTTG
```

#### >*Maverick klon Mav2* (1931 bp)

```
ACAAAGATGCGAGTGAAAAATGTTAAAAAATGTAATTTTACTAACAATGCAATATCATTCTTTTCCAAGATATTAGATAT
GAAATAAATGGTATTGAAATTGATCGCATAAGAAATGTTGGTATAACTACAACAATGAAATCATATATTTTCGTTAAACAATGGAGA
AAGTAAGGCAGCTGAAGCTTGGGGCTGAAAAATCAAGGATTAAAAAATCAAGCGGCGAGTTTCAGCATTCTTTTACCTCTCAATA
AATTATTAGGGTTTGTGAAGACTACAACAAATTTATTTAAATTGCAAAACATGAACCTATTTTAAATAGATCTAGTACAAACCTG
AATAGTTTAGTTTCTGGAGCTGACGATATTGTAATTTTAAATATTCAAAGGATTCAATGGCGTATGCCCCACATTAAGTTTCTGA
TCAGCAAAGATTAATTTTGTAAAACATTTAGAAAAAGACAATCCTATACATATAGCATTTAGAAACTGGGATTTGTATGAGTATC
CCTTATTACAAAAACTACAAAACATTCATGGGCTATAAAAACAGCATCTCAGTTAGAGAAACCGCGCTATGTAATATTCGGCTTG
CAAACATAAGAAAAATAATAAACTGAAGACGGTTCAATCTTTGATCATTGTGCTTTGACTAATGTTACATTATTTTTGAATTC
TCATTACTATCCTTATGATGCATTAACCTTAAGTTGATGAGAATAAGATTAGTATATATATGACATGTATACTAAAATTCGCC
AGTCGTTCTATAACCTTCCACAAGATCCGCTGCTTGACATTCAAACGTTTAAAGGAAAAAGCTCCTCTTTTTGTTATCGACTGTTTCG
AGACAAAACGAAAAATTTAAATCTGGTCCGGTTGATGTGCGATTAGAAATGAAACCTCGAGAGATATCCCAGTAACACCTGTGC
TTACTGTTTGATAATCAACGATCGACTTATTGAATATAAGCCGCTAAGTAACATTGTGCGCAAGTTATCATGAATGTTATTGTAGA
```

CGTACAAGGGTTTAAACCTATCAAAATGAATTTATACCGAAAGAATTTGCTTTAGTATGCAACGACCAAATTCAGTATTACTAA  
TAAACCTCCTTTTTCATTATAATGAGCTGACGAATGAGGAAAAAACAAGGTAGGCTGGATAGAGCGAAATCGAAAAATGTTGTGG  
AGCGAAGGAATAGTTTCGTATGATTTTACACACCTTATTTGAAACACTTTTAAAGACATAAAAAATATTTATTGTAAGGATTAGA  
AAAAATGACATGGTTGAAACAAATCCTGAATAATACAAATGTTTTAATTTAGAAGATTATGGTTGCCCAAATTTATTAACCTCTGT  
ACAATTTATATGACACAAATTTCTGATATTTATAGTTGTATTTATCACCCACAATATGTGCTTTAAAAAATGTAACCTGTTTGAGA  
AAATGGTGTAATTAATAATAAAGTTTTATGAAAAATAACTGAGTATTTAAATCATACTTATTTAAACATCCTTACAATACCTG  
ACAAATACAAATCTTCACATAGAAAGAAAAGGGTCTCCATATGCCTCACACGCATCGCCAATTTTTTTCCGTGTGAAGTTTGTTT  
AGCAAAAACCCAACATGCGAATTATAACGCAAAACGTAGGTAGGATCCTCAGATCATAGAAGTAAGTATCATAGTAGTTACTCAG  
ATCATAGTAGTTACTTCTATGATCTGAGGTAGGATCTATCATAAGGATTGGGTTGAATCGTAACAGACCTTGCGCCCGAAAGGTCA  
GCAGCTCTAGCAATTTAGAGTCGAACCGTTGTGACAGTTGCGAGTTGGGTTGAAGCGAAAGGATAGCTCTTGTATTGATGAAACTG  
TGTAGTTTTTGTAGATCGGTTTCAGTTCAATTCGCAACT

### >18S rDNA (2130 bp)

CGATGTGCGTGTGCGATGTGAGCGAGTCGCACAAAAAACGTACACGCAAAACACGCAACAGTGGTGAATACGAGCCACCCGCGTCC  
CGGACGTTTTAACGTTTCGGCGGCGCGGTTAAGGGCGGTCGGCGATAGGGCCGCCCTCTAGTAGTCGTGTGAATCGACAGACAGCTC  
CCTGGTTGATCCTGCCAGTAGTTATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCTCAGTGCAAGCCGATTAAGGCGATACCG  
CGAATGGCTCAATATATCAGTTTTGGTTCCTTAGATCTTACTCAGTTACTTGGATAACTGTGGTAATCTAGAGCTAATACATGCA  
ATCAGAACTCTGACCAGTGATGGAATGAGTGCTTTTATTAGATCAAAACCAATCGACGGAGGGCCTCGCGTCCGATGTCGTTTCATT  
TTGATGAATCTGGATAACTTTTGGCGATCGCACGGTCCAGTACCGGCGACGCATCTTCAAATGTCTGCCTTATCAACTTTCGATG  
GTAGTTTCTGCGACTACCATGGTTGTACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAAACGGCTACCAC  
ATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATACCCACTCCCGGCACGGGGAGGTAGTGACGAAAAATAACGATACGGGACTCTTACGA  
GGCCTCGTAATCGGAATGAGTACACTTTAAATATTTAACGAGGAACAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATT  
CCAGCTCCAATAGCGTATACTAAATTTGTTGCGGTTAAAAAGCTCGTAGTTGCATTTGTGCGCCGCGCTGTGCGTGCACCGCATCC  
GCGGTGATACTGACACGTCTGCGGAGCATATCGTCGGTGAGCCGCCGGTCAAACGGCGGTTCAATATCAAAATCCTATCGCGGTGC  
TCTTCAGTGAGTGTGAGATGGGCCGACAATTTTACTTTGAACAAATTAGAGTGCTCAAAGCGGGCTCAAAATGCTGCTTGNNNNN  
NN  
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTAGAGGTGAAATCTTGGATCGTCGCAAGACGAACATCAGCGAAAGCATTGCCAAAGGTGTTTTTC  
ATCAATCAAGAACGAAAGTTAGAGGTTCAAGGCGATTAGATACCGCCCTAGTTCTAACCGTAAATATGTCATCTAGCGATCCGCC  
GACGTTACTACAATGGCTCGGCGGGCAGCTTCCGGGAAACCAAGATTTTGGACTCCGGGGGAGTATGGTTGCAAAGCTGAAACT  
TAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGAGTGGAGCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACACGGGAAATCTCACCAGGCCCGGACA  
CCGGAAGGATTGACAGATTAACAGCTCTTCTTGATTCGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAGTTGGTGGAGCGATTTGTCT  
GGTTAATTCGGTAACGAACGAGACTCTAGCCTGCTAAATAGGCGTCGCCATTTAGGTGTGCGCGGCTTCGGTTCGCGCAACTCACT  
GGCGACGTATTAATAATCTTCTTAGAGGGACCGCGGCTTCGAGCCGCACGAGATTGAGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTTAGA  
TGTCTGGGCGCACGCGCTACACTGAAGGAATCAGCATGTTCTCCCTGGCCTAGAGGCCCGGCAACCCGCTGAAACTCCTTC  
GTGCTGGGATTGGGTTTCGCAATTGTCCCCATAAACGAGGAATTCCTAGTAAGCGGAGTCATAAGCCCGGTTGATTAAGTCC  
CTGCCCTTGTACACACCGCCCGTCTACTACCGATTGAATGATTTAGTGAGGCTTTCGGACCGACACGCGACGGCTTCACGGCC  
GTCGGCGTGTGGGAAGTTGACCAAACCTTATGATCATTAGAGGAAGTAAAGTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGGGAACCTGCGGAA  
GGATCATTAACGTAACGTGTCATTACGTCGTTATTATATCTGATACGGCACGCGTCTAAACGACAT



### >28S rDNA (4504 bp) část 1

GTTCGACGGGGTAACCCAAAGAGGCCTGAAGACGCCGCCGAGAGGTCGGGAAGAGATTTCTTTTCTGCTTGAGCGTTCGAGTTCC  
ATGGAATTCTGTAGCAAGGAGATGTGGTTCGGAACGTGAAGAGCACCACACTTGC GGCGGTGTCCGATTCTCTCTCGCGACCTTG  
AAAATCAAGTGAGGGATGTACGTGAAGATGTCTCGCCGGTTCGTACCCATATCCACATCAAGTCTCCTAGGTGAAGACCTCTAG  
TCGATAGAATAATGTAGGTAAGGGAAGTCGGCAAATGGATCCGTAACCTCGGAATAAGGATTGGCTCTGAGGACCGGGGCGCGTC  
GGTTTGGAGGGGAAGCGGATGCGGCCGGTTCGGGCCCTGGTCAAGCTCGTTCGCGCGAGCGGACTCTGGGCCACGCTCCGGCG  
TTCCGCTGATCCTCCTAGCCGTAAGGCCGCGTTCGGTTACGTCTAGCACGCGACTGGCGCGGTTCTGTACGATCGCCGTTCAACGGT  
CAGCTCAGAACTGGCACGGACAAGGTGAATCCAACGTCTGATTAATCAGAGCATTGCGATGGCCCTCGCGGGTGTGACACAAT  
GTGATTTCTGCCAGTCTCTGAATGTCAACGTGAATAAATCAAGCAAGCGCGGGTCAACGGCGTGAGTAACATGACTCTCTTA  
GTGTAGCCAAATGACTCGTCATCTAATTAGTGACGCGCATGAATGGATTAACGAGATTCTACTGTGCTATCTACTATCTAGCGA  
ATCGACAGCCAAGGGAACGGGCTTGCTAGATCAG

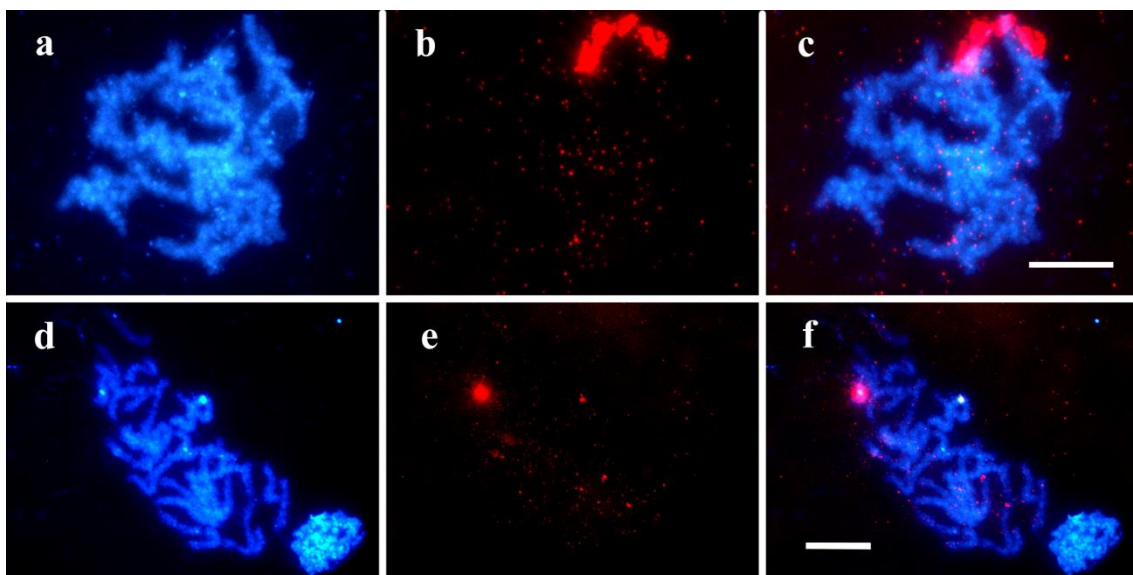
### >28S rDNA (4504 bp) část 2

TCAATAATCGTTCCCTCGTTTCTAACGAGAGTTCGACGGGGTAACCCAAAGAGGCCTGAAGACGCCGCCGAGAGGTCGGGAAGAG  
ATTTCTTTTCTGCTTGAGCGTTCGAGTTCATGGAATCTGTAGCAGGAGATGTGGTTCGGAACGTGAAGAGCACCGCATTTGCG  
GCGGTGTCCGATTCTCTCTCGCGACCTTGAAAATTCAGGTGAGGGATGTACGTGGAGATGTGCGCGCGGTTTCGTACCCATATCCG  
CAGCAGTCTCCAAGGTGAAGAGCCTCTAGTCGATAGAATAATGTAGGTAAGGGAAGTCGGCAAATGGATCCGTAACCTCGGAAT  
AAGGATTGGCTCTGAGGACCGGGGCGCGTTCGGGTTTGGAGGGGAAGCGGATGCGGCCGGTTCGGGCCCTGGTCAAGCTCGTTCCG  
GCGAGCGGACTCTGGGCCACGCTCCGGCGTTCGCTGATCCTCCTAGCCGTAAGGCCGCGTTCGGTTACGTCTAGCACGCGACTGG  
CGCGGTTCTGTACGATCGCCGTTCAACGGTCAGCTCAGAACTGGCACGGACAAGGGGAATCCGACTGTCTAATTAACAAAGCAT  
TGCGATGGCCCTCGCGGGTGTGACGCAATGTGATTTCTGCCAGTCTCTGAATGTCAACGTGAAGAAATCAAGCAAGCGCGGG  
TAAACGGCGGGAGTAACATGACTCTCTTAAGGTAGCCAAATGCCTCGTCATCTAATTAGTGACGCGCATGAATGGATTAACGAGA  
TTCCCACTGTCCCTATCTACTATCTAGCGAAACCACAGCCAAGGGAACGGGCTTGGGAGAATCAGCGGGGAAAGAAGACCCTGTTG  
AGCTTGACTCTAGTCTGGCATTGTAAGGAGACATGAGAGGTGTAGCATAAGTGGGTGATCGTTTCGCGGTCGTCGTAACAAACCAC  
TACTTTCATTGTTTCACTACTCTCGGTTGGGCGGAACGCGTTCGTCGATTCTATCGTTCGRCGACGGTGTTCGTTCCAA  
GCGTGCAGAGTGGCGATGTGGCGGCAACGCCCTTCGCCGTC

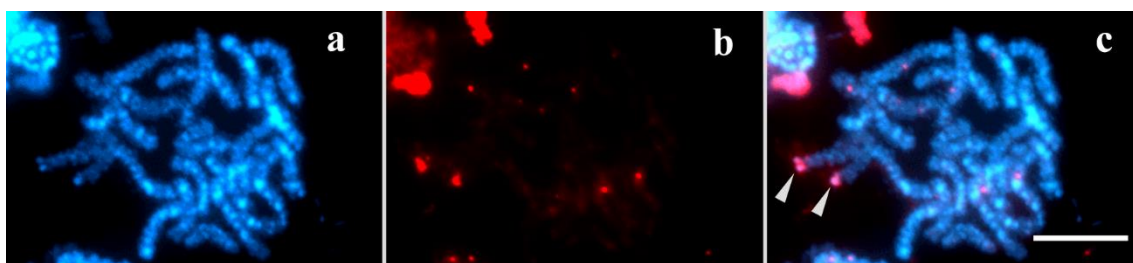
### >Satelit klon *sat4* (1144 bp)

TGAAATTTGAAATAGCTGTTTGTTCGTGATCTAATTGTGAAAAAATTTTGAACGTTTCGAAATCAAAATAGGGGCGAGAATAT  
GGCCGCCGAAAAATCGACCTCTGCGCAAAAAGTCGCGAGCCAACCTGGGCACATGCTGGAGACGTGCCCTAACGGCATCGGGTC  
GTCAAAGGACCCAGGTATATGAGAAAAATCGACATTTTACATTTCAAGATGGCGGCCGAGATATCGACGATTGAAAATGAGAAA  
ATTTTGTATGGAGAATTTGTACTGAAAATCGACTTTTAGTACAAAATTTTAAACAAAATGAACAATTTTCAAATAAACAATTTT  
TTGAGGCCGAAGCGGTGATGAGGAACCTCGCCGCGGCGAGGCCGAAGGCCGAGCTCCGTTTCAGGCCGAGGCCGAAGGCCGAGATCA  
CACATTTTCCGGCGAACAAGCAACAACGCAAAAGCCAGATGGGACAACTTTCGAGGCCGAAGGCCGAGCTCCGCGAAGCGGGCCC  
CAGGAACCCCGCCGCGGCGAGGCCGAAGGCCGAGCTCCGTTTCAGGCCGAGGCCGAAGGCCGAGACTATACATTTTTCGGCGAACAAG  
CAACAACGCAAAAGCCAGATGGGACAACTTTCGAGGCCGAAGGCCGAGCTCCGCGAAGCGGGCCCCAGGAACCCCGCCGCGGCGA  
GGCCGAAGGCCGAGCTCCGTTTCAGGCCGAGGCCGAAGGCCGAGACTATACATTTTTCGGCGAATAAGCAACAACGCAAAAGCCAGAT  
GGGACAACTTTCGAGGCCGAGGCCGAGCTCCGCGAAGCGGGCACGAAGAACCCCGCCGCGGCGAGGCCGAAGGCCGAGCTCCGTT  
TCAGGCCGAGGCCGAAGGCCGAGACTATACATGTTCCCACTTATCAAAATCCCTACCCCAAGTGTCTAGCGAGGCCCTAGGCCGAGC  
GCCGCGGAGAGCGAAGCTCGGAGCGGCTGGGGTTGGCGCGCTAAGCGCGCAGGGGTTACCCCTAGTACTAATATATATAGC  
TACAATCCGGTATACTCACTGACTGACTGACTGATCATCTATAGATTTTCTCGAAACGGTAAGAGTTACGTGAAAATTTTGTATG  
AGAAAGTTGTAGGAAATGTATGATAT

**Příloha II:** Obrázková dokumentace výsledků FISH experimentů.



**Obrázek 10:** Nepřímá fluorescenční *in situ* hybridizace se sondami *Mav1* + *Mav2* značenými biotinem na preparátu pachytenních oocytů samice české populace. **a, d** – chromosomy barvené DAPI. **b, e** – hybridizační signály sond detekované pomocí streptavidinu s fluorochromem Cy3. **c, f** – složené snímky obarvených chromosomů a sondy. Měřítko odpovídá 10  $\mu\text{m}$ .



**Obrázek 11:** TSA-FISH se sondou 18S na preparátu nizozemské samice. **a** – pachytenní chromosomy obarvené DAPI. **b** – signál sondy 18S detekovaný pomocí tyramidu s fluoresceinem (červeně). **c** – složený snímek. Šipky ukazují na terminální signály. Měřítko odpovídá 10  $\mu\text{m}$ .