

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Analýza repetice v genomech vybraných druhů modrásků rodů

Polyommatus a Lysandra

Bakalářská práce

Monika Hrubá

Školitelka: RNDr. Martina Dalíková, Ph.D.

České Budějovice 2020

Hrubá, M., 2020: Analýza repetitiv v genomech vybraných druhů modrásků rodů *Polyommatus* a *Lysandra*. [Analysis of repeats in genomes of selected *Polyommatus* a *Lysandra* species. Bc. Thesis, in Czech.] – 58 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

This thesis focuses on the analysis of mobile elements in the genera *Polyommatus* and *Lysandra* (Lepidoptera) with a potential impact on karyotype fragmentation. The presence of selected mobile elements in genomes of 15 lycaenid species was tested by PCR. Moreover, the same method was used to detect these elements in 13 selected ant species, which may present a source for lateral gene transfer in myrmecophilous blue butterfly species. Selected transposable elements were localized in pachytene nuclei using fluorescence *in situ* hybridization. The results of this thesis suggest a patchy phylogenetic pattern of studied repeats which can be partly explained by mobile elements spread through interspecific hybridization and horizontal gene transfer among studied *Polyommatus* and *Lysandra* species.

Finanční podpora

Tento projekt byl financován grantem Grantové agentury České republiky reg. č. 17-17211S.

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 jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 22. 5. 2020

.....

Monika Hrubá

Poděkování

Především bych ráda poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Martině Dalíkové za její trpělivost při zodpovídání mých opakovaných dotazů a za srozumitelné vysvětlení veškeré problematiky. Dále bych chtěla poděkovat nejen své školitelce, ale i všem ostatním členům naší laboratoře za milé přijetí do kolektivu a za to, že vždy vytvářeli příjemnou atmosféru a byli ochotní mi se vším poradit.

Velký dík patří také všem, kteří mi poskytli vzorky studovaných živočichů. Vzorky modrásků mi dodali Petr Nguyen, Roger Vila a Gerard Talavera z Institut de Biologia Evolutiva (CSIC-UPF) v Barceloně ve Španělsku a Vladimir Lukhtanov ze St. Petersburg State University, Petrohrad, Rusko. Dále děkuji Petru Pechovi z Univerzity Hradec Králové za to, že mi poskytl vzorky mravenců. Také děkuji Monice Kreklové, za to, že mi věnovala chromozomální preparáty modrásků.

Největší dík patří celé mé rodině. Děkuji rodičům za to, že mi umožnili studium v Českých Budějovicích a vždy mě podporovali. Především děkuji své prababičce, která mě odmalička vedla k pilnému studiu. Nemalý dík patří také prarodičům z Merklína za jejich ochotu vždy mě vyslechnout. Děkuji jim za podporu, rady a zásoby jídla ze zahrádky.

Na závěr děkuji svému příteli, za to, že vždy stál při mně, i když to někdy nebylo lehké. Také děkuji jeho rodině za to, že mě vlídně přijali mezi sebe, za jejich dobrou náladu a podporu.

Obsah

1.	Úvod.....	1
1.1.	Chromozomy motýlů	1
1.2.	Chromozomy modrásků.....	2
1.3.	Mobilní elementy	3
1.3.1.	RNA transpozony	4
1.3.2.	DNA transpozony	5
1.3.3.	Horizontální přenos mobilních elementů	7
1.3.4.	Vliv mobilních elementů na genom	8
1.4.	Analýza repetitivní složky genomu modrásků pomocí programu RepeatExplorer ...	9
2.	Cíle práce	12
3.	Materiál a metody	13
3.1.	Použitý hmyz	13
3.2.	Izolace genomové DNA pomocí kitu NucleoSpin	13
3.3.	Navržení primerů	15
3.4.	PCR.....	15
3.5.	Gelová elektroforéza	16
3.6.	Klonování, izolace plazmidové DNA a sekvenování	16
3.6.1.	Amplifikace pomocí PCR, přečištění produktů PCR, měření koncentrace DNA	16
3.6.2.	Ligace	17
3.6.3.	Transformace tepelným šokem.....	17
3.6.4.	Klon-test a přeočkování vybraných kolonií.....	18
3.6.5.	Množení bakterií v tekutém médiu, příprava vzorků v glycerolu, izolace plazmidové DNA	18
3.6.6.	Sekvenování vzorků	19
3.7.	Analýza přítomnosti repetice u příbuzných druhů modrásků a u vybraných druhů mravenců.....	20
3.8.	Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)	21
3.8.1.	Příprava sond	21
3.8.2.	Hybridizace na chromozomální preparáty.....	22
3.8.3.	Pozorování a dokumentace výsledků	23
3.9.	Kvantitativní PCR.....	24
4.	Výsledky	26
4.1.	Klonování mobilních elementů.....	26

4.2.	Analýza přítomnosti mobilních elementů u příbuzných druhů modrásků.....	26
4.3.	Analýza přítomnosti repetice u vybraných druhů mravenců.....	28
4.4.	Lokalizace mobilních elementů <i>Lc-P element</i> a <i>Lc-Ty3/Gypsy</i> na chromozomech	29
4.5.	qPCR.....	32
5.	Diskuze	34
5.1.	Analýza mobilních elementů u vybraných druhů modrásků a mravenců.....	34
5.2.	Lokalizace repetice <i>Lc-P element</i> a <i>Lc-Ty3/Gypsy</i> na chromozomech	39
6.	Závěr	41
7.	Literatura.....	42
8.	Přílohy.....	47

1. Úvod

Tato bakalářská práce se zabývá studiem mobilních elementů u modrásků rodů *Polyommatus* a *Lysandra* (Lycaenidae). Pro tuto skupinu živočichů je charakteristický variabilní počet chromozomů i mezi blízkce příbuznými druhy (Kandul a kol., 2007). Motýli (Lepidoptera) obecně však mají počet chromozomů obvykle konzervovaný a blízký ancestrálnímu počtu $n = 31$ (Ahola a kol., 2014). A to i přesto, že mají holokinetické chromozomy s delokalizovanou centromerickou aktivitou, které usnadňují chromozomální fúze a rozpady (Mola a Papeschi, 2006; Bureš a Zedek, 2014). Vliv na fragmentaci karyotypu mohou však mít také mobilní elementy, které byly u modrásků rodů *Polyommatus* a *Lysandra* analyzovány bioinformaticky pomocí programu RepeatExplorer (Novák a kol., 2013). Výsledky této analýzy naznačují existenci repetice specifických pro druhy s vysokým počtem chromozomů (Dalíková, nepublikováno), což bylo dále ověřováno v předkládané bakalářské práci.

1.1. Chromozomy motýlů

Motýli a můry (řád Lepidoptera) představují přibližně 13 % všech popsáných druhů organismů (Mora a kol., 2011; Stork, 2018) a můžeme u nich pozorovat různé životní strategie. Přesto si však tato skupina zachovává překvapivě konzervovanou strukturu genomu i po 140 milionech let samostatné evoluce (Ahola a kol., 2014). Haploidní počet chromozomů u této skupiny je většinou 29–31 (Robinson, 1971). U skupiny *Ditrysia*, do které patří téměř 99 % druhů řádu Lepidoptera (Kristensen a Skalski, 1999), je v haploidním stavu 31 chromozomů, což je považováno za ancestrální stav. Kromě počtu chromozomů je konzervovaný také počet genů a jejich pořadí na chromozomech. Bylo objeveno jen málo fúzí a ortologů identifikovaných jako translokované mezi syntenními bloky (Ahola a kol., 2014).

Řád Lepidoptera má chromozomální určení pohlaví typu ZZ/ZW s heterogametickými samicemi. Tento typ se vyvinul chromozomálními přestavbami z typu ZZ/Z0. Chromozom W je u většiny druhů tvořen heterochromatinem a bylo na něm zatím objeveno jen málo genů, zato obsahuje četné repetice. Chromozom Z je naproti tomu většinou tvořen euchromatinem a nese celou řadu protein kódujících genů. V meióze se pohlavní chromozomy Z a W párují i přes výraznou rozdílnost v sekvencích a často i v délce (Traut a kol., 2007).

Motýli mají holokinetické chromozomy, což jsou chromozomy bez lokalizované centromery. Tato stavba zajišťuje, že fúze a rozpady chromozomů nezpůsobují dramatické změny při dělení buněk, jako je tomu u monocentrických chromozomů, které se mohou stát

acentrickými po rozpadu, nebo dicentrickými po fúzi. U holocentrických chromozomů je centromerická aktivita distribuována podél celé délky chromozomu, takže zfúzované nebo rozpadlé chromozomy si zachovávají normální kinetickou aktivitu během dělení buněk a díky tomu mají vyšší pravděpodobnost, že budou fixovány. V mitóze mají holokinetické chromozomy centromerickou aktivitu zajištěnu prostřednictvím kinetochorových formací podél celého chromozomu. Ale ne vždy tomu tak je i v meióze (Mola a Papeschi, 2006; Bureš a Zedek, 2014). Právě meiotické adaptace, které jsou u holokinetických chromozomů nutné, vedou pravděpodobně u některých skupin organismů k nižší pozorované variabilitě v počtu chromozomů, než by se dalo předpokládat (Melters a kol., 2012).

I přes značnou konzervovanost v počtu chromozomů vykazuje řád Lepidoptera největší variabilitu v haploidním počtu chromozomů mezi druhy v rámci jednoho řádu ($n = 7\text{--}226$), a to ve srovnání se všemi ostatními živočichy (White, 1973; Lukhtanov, 2015). Zvláště výraznou rozmanitost lze pozorovat u rodů: *Godyris* (rodina *Nymphalidae*, $n = 13\text{--}120$) (diskutováno v Brown a kol., 2004), *Leptidea* (*Pieridae*, $n = 26\text{--}61$) (Dinca a kol., 2011b; Šíchová a kol., 2016), *Lysandra* (*Lycaenidae*, $n = 24\text{--}92$) (Kandul a kol., 2004) a *Polyommatus* (*Lycaenidae*, $n = 10\text{--}226$) (Kandul a kol., 2004; Lukhtanov, 2015).

1.2. Chromozomy modrásků

Celkově má čeleď modráskovití (*Lycaenidae*) převážně konzervovaný haploidní počet chromozomů ($n = 23\text{--}24$) (Robinson, 1971), přestože sem patří rody *Lysandra* a *Polyommatus*, které se vyznačují nápadnou rozmanitostí v počtu chromozomů (Kandul a kol., 2004, 2007). K výraznému zvyšování počtu chromozomů došlo během evoluce této skupiny hned několikrát, u rodu *Polyommatus* došlo k fragmentaci karyotypu nejméně dvakrát nezávisle na sobě, a to u skupin *Plebicula* a *Agrodiaetus* (Kandul a kol., 2004) a u rodu *Lysandra* k ní došlo dokonce třikrát (Talavera a kol., 2013).

Výzkum různorodosti počtu chromozomů u podrodu *Agrodiaetus* ukazuje, že fúze a rozpady chromozomů se u této skupiny pravděpodobně hromadí v průběhu několika speciálních událostí. Postupně tedy vedou k nízkým a vysokým počtům chromozomů, což má za důsledek, že úzce příbuzné taxony mají spíše podobné velikosti chromozomových sad. Bylo také objeveno, že evolučně mladší druhy jsou si více podobné svými karyotypy než druhy, které se odštěpily dříve (Vershina a Lukhtanov, 2017).

Rod *Lysandra* (*Lycaenidae*, *Polyommatinae*) je starý cca 4,9 milionů let a vznikl oddělením od rodu *Polyommatus*, ale diverzifikace existujících linií je nedávná (před cca 1,5 milionem let) a zahrnovala několik chromozomálních přestaveb. Počty chromozomů

u rodu *Lysandra* jsou přibližně násobky minimálního počtu v tomto rodu ($n = 24$). Například *L. bellargus* ($n = 45$), ostatní druhy mají zhruba čtyřnásobek chromozomů, než odpovídá bazálnímu stavu ($n = 82-93$). To vedlo některé autory k hypotéze o výskytu několika po sobě následujících polyploidizačních událostí, tato hypotéza byla však vyvrácena analýzou, která ukázala, že velikost genomu je přibližně stejná u druhů s různými počty chromozomů (diskutováno v Talavera a kol., 2013; Kreklová, 2020).

Druh *Lysandra coridon* je také zajímavý díky populacím, které vykazují vnitrodruhovou variabilitu v počtu chromozomů v celé Evropě. Počty chromozomů jsou zjevně stálé v každé populaci. Zdá se, že hybridizace mezi druhy *Lysandra* je v přírodě běžná. Potenciálně hybridní vzorky byly nalezeny například mezi druhy *L. bellargus* a *L. coridon*. U hybridů byl pozorován střední počet chromozomů (v haploidním stavu mezi 45 a 90) a také multivalenty a univalenty během prvního meiotického dělení. U nositelů takovýchto meiotických buněk se očekává výrazné snížení plodnosti, neboť je nízká pravděpodobnost tvorby vyvážených gamet (diskutováno v Talavera a kol., 2013). Nemusí tomu tak ale být vždy, protože například u bělásků bylo zjištěno, že pravděpodobně není ovlivněna plodnost kříženců u *Leptidea juvernica*, *L. sinapis* a *L. reali* (Šíchová a kol., 2015) a u *Leptidea sinapis* (Lukhtanov a kol., 2018). V rámci rodu *Lysandra* je také běžná mitochondriální introgrese (diskutováno v Talavera a kol., 2013).

1.3. Mobilní elementy

Mobilní elementy lze charakterizovat jako úseky DNA, které mají schopnost pohybovat se v genomu z místa na místo. Mají tedy schopnost transponovat se, proto bývají také označovány jako transpozony. Ve 40. letech minulého století je poprvé pozorovala americká vědkyně Barbara McClintock. Její pozorování na kukuřici byla nejprve odmítána, ale později začala být doceňována, jelikož vyvracela v té době obvyklý názor, že genom je cosi statického. Naproti tomu byl postupně vytvořen koncept dynamického genomu. Mobilní elementy byly považovány za parazitickou nebo sobeckou DNA, tedy segmenty DNA, které se množí v rámci genomu, avšak nepřináší žádný prospěch pro jejich hostitele, a tedy byly považovány za odpadní DNA – „junk DNA“, která nemá v genomu žádnou funkci. V posledních letech se však objevují studie, které odhalují důležitý vliv mobilních elementů na funkci a strukturu genomu, evoluci chromozomů, diverzitu a speciaci u různých organismů (Klein a O'Neill, 2018) viz kapitolu 1.3.4.

Mobilní elementy byly nalezeny u většiny eukaryotických organismů. Například u kukuřice tvoří až 90 % genomu (Andrenacci kol., 2020), u obratlovců 6 až 60 %

(Sotero-Caio a kol., 2017). U lidí zaujímají mobilní elementy 46 % genomu (Andrenacci kol., 2020). Podle výzkumu z roku 2010 představují asi 10 % genomu u jiných obratlovců než savců. Avšak opět existují výjimky, jako například dánío pruhované (*Danio rerio*), u kterého je 26,5 % genomu tvořeno mobilními elementy (Sela a kol., 2010). U bource morušového (*Bombyx mori*) představují mobilní elementy 35 % genomu (Osanai-Futahashi a kol., 2008). Například u perleťovce *Heliconius melpomene* zaujímají repetice 25 % genomu (Lavoie a kol., 2013) a u běláška *Leptidea sinapis* představují 38 % genomu (Talla a kol., 2017). Mezi různými organismy se také liší typy mobilních elementů, které se v jejich genomech vyskytují (Sela a kol., 2010).

Podle způsobu transpozice lze mobilní elementy rozdělit do dvou tříd. První třídu představují RNA transpozony, někdy také označované jako retroelementy nebo retrotranspozony, druhá třída jsou DNA transpozony (Klein a O'Neill, 2018; Mustafin, 2018), viz Obrázek 1.

1.3.1. RNA transpozony

RNA transpozony se transponují mechanismem zvaným „copy-and-paste“, což obnáší přepis nukleotidové sekvence z DNA do RNA, čímž vznikne RNA intermediát, který je následně pomocí enzymu reverzní transkriptázy převeden do DNA, která je poté vložena na nové místo v genomu. Tento typ mobilních elementů se díky svému transpozičnímu mechanismu vyskytuje v genomech obecně v hojném počtu (Guo a Wu, 2013). Retroelementy se dále dělí do dvou velkých skupin. První skupinou jsou retroelementy s dlouhými koncovými opakováními, takzvané LTR („long terminal repeats“) retroelementy, které převažují u rostlin. Druhá skupina tato opakování nemá a nazývá se non-LTR retroelementy, tyto repetice dominují u živočichů (Kazazian, 2011; Klein a O'Neill, 2018,).

LTR retroelementy jsou rozšířeným druhem mobilních elementů a jsou považovány za hlavní faktor ovlivňující evoluci eukaryotického genomu (Havecker a kol., 2004). Tyto transpozony mají na svých koncích dlouhé (obvykle 300–1000 bp) přímo se opakující sekvence (Kazazian, 2011). LTR retrotranspozony obvykle kódují dva geny, a sice *gag* a *pol*, které se mezi jednotlivými skupinami elementů liší strukturou. Pomocí genu *gag* jsou kódovány proteiny, které se podílí na tvorbě kapsidy (podobné jako u virů), gen *pol* pak kóduje proteiny nutné pro transpozici, jako jsou proteáza, integráza, reverzní transkriptáza a RNáza H, přičemž reverzní transkriptáza a RNáza H jsou vždy vedle sebe. LTR retroelementy se dále dělí na základě aminokyselinové sekvence reverzní transkriptázy, což je jejich nejvíce konzervovaná sekvence. Mezi nadrodinami jsou také rozdíly v pořadí kódujících oblastí

v genu *pol*. Do řádu LTR retroelementů patří nadrodiny *Copia*, *Gypsy*, *BEL/Pao*, *Retroviry* a *Endogenní retroviry – ERV* (Havecker a kol., 2004; Mustafin, 2018).

Elementy *Gypsy* jsou zřejmě nejvíce abundantní skupinou LTR retroelementů u perleťovce *Heliconius melpomene* – zaujímají 0,21 % genomu (Lavoie a kol., 2013). U bource morušového (*Bombyx mori*) zaujímají zhruba dvojnásobně velký podíl genomu, tedy 0,5 % (Osanai-Futahashi a kol., 2008). Patrně se neustále transponují a unikají hostitelovým regulačním mechanismům. Tento způsob vývoje odpovídá hypotéze „Red Queen“ (Strotz a kol., 2018; diskutováno v Thomas-Bulle a kol., 2018). Mobilní elementy z nadrodiny *BEL/Pao* nebyly dosud nalezeny u rostlin, hub ani savců (Llorens a kol., 2011). U bource morušového (*Bombyx mori*) zaujímají 0,7 % genomu a jsou tak nejčtenějšími LTR retroelementy u tohoto živočicha (Osanai-Futahashi a kol., 2008).

„Long interspersed nuclear elements“ (LINE) představují skupinu dodnes aktivních mobilních elementů u lidí a jsou považovány za jediné autonomní non-LTR elementy v lidském genomu, jelikož stále kódují všechny geny potřebné pro transpozici. U lidí z této skupiny zbývají pouze elementy LINE1, které zaujímají asi 17–20 % genomu (Klein a O’Neill, 2018). U bource morušového (*Bombyx mori*) zaujímají LINE elementy 14,5 % genomu a jsou tak nejhojnějšími elementy u tohoto zástupce řádu Lepidoptera (Xia a kol., 2008), u perleťovce *Heliconius melpomene* zaujímají jen 3,85 % genomu a jsou tak druhou nejpočetnější skupinou non-LTR retrotranspozonů po SINE elementech (Lavoie a kol., 2013) a u běláška *Leptidea sinapis* tvoří LINE elementy 5,4 % (Talla a kol., 2017).

„Short interspersed nuclear elements“ (SINE) jsou považovány za neautonomní aktivní mobilní elementy, které k transpozici potřebují přítomnost autonomních mobilních elementů. U lidí nacházíme *Alu* elementy, které představují asi 11 % genomu. Přesto jsou však mnohem častější než LINE1 elementy, které tvoří až pětinu genomu, neboť jsou 20x kratší. Jejich délka (u lidí) je cca 300 bp, neobsahují však žádné otevřené čtecí rámce, takže nekódují žádné bílkovinné produkty (Klein a O’Neill, 2018). U běláška *Leptidea sinapis* zaujímají SINE elementy pouze 3,9 % genomu (Talla a kol., 2017), u perleťovce *Heliconius melpomene* 8,22 % genomu (Lavoie a kol., 2013) a u bource morušového (*Bombyx mori*) dokonce 13,3 % genomu (Xia a kol., 2008).

1.3.2. DNA transpozony

Na rozdíl od retroelementů, není známo, že by u lidí byly DNA transpozony aktivní během posledních 50 milionů let (Klein a O’Neill, 2018). DNA transpozony obvykle nezaujímají tak velkou část genomu jako RNA transpozony. Existují však i organismy,

u kterých tvoří DNA transpozony největší část mobilních elementů – například u *Caenorhabditis elegans* tvoří DNA transpozony 91,4 % všech transpozonů (Kazazian, 2011). U bource morušového (*Bombyx mori*) zaujímají DNA transpozony pouze 3 % genomu (Osanai-Futahashi a kol., 2008), u běláška *Leptidea sinapis* představují 5,7 % genomu (Talla a kol., 2017). Naproti tomu u perleťovce *Heliconius melpomene* zaujímají 10,05 % genomu (Lavoie a kol., 2013). DNA transpozony bývají rozdělovány do tří skupin podle způsobu transpozice.

Největší skupinu představují TIR („terminal inverted repeats“) elementy, které mají na obou koncích invertované repetice a kódují pouze enzym transponázu, který je odlišný u jednotlivých nadrodin. Tyto transpozony se pohybují mechanismem „cut-and-paste“, kdy transponáza rozpozná invertované repetice, vystříhne transpozon a vloží ho na nové místo v genomu. Toto vložení obvykle probíhá nedaleko od původního místa výskytu transpozonu, ale nemusí tomu tak být vždy. Do této skupiny patří elementy z nadrodin *hATs*, *PiggyBacs* a *Mariner* (Kapitonov a Jurka 2001, 2006; Pritham a kol., 2007; Bao a kol., 2009; Kazazian, 2011; Sotero-Caio a kol., 2017). U perleťovce *Heliconius melpomene* bylo zjištěno, že elementy z nadrodiny *Mariner* jsou pravděpodobně stále aktivní, nebo byly aktivní v nedávné době (Lavoie a kol., 2013). U bource morušového (*Bombyx mori*) představuje tato nadrodina největší část DNA transpozonů – zaujímá 2,7 % genomu (Osanai-Futahashi a kol., 2008).

Druhá podtřída DNA transpozonů bývá podle svého způsobu transpozice označována jako „rolling-circle transposons“, sem patří například nadrodina *Helitron* (Sotero-Caio a kol., 2017), která díky svému replikačnímu mechanismu hraje roli při přeskupování exonů (Rebollo a kol., 2010). Transpozice těchto elementů probíhá podle semireplikativního transpozicičního modelu, kdy je pouze jedno vlákno elementu přeneseno na nové místo v genomu, kde poslouží jako templát pro syntézu druhého vlákna DNA pomocí reparačních mechanismů hostitele (Kapitonov a Jurka, 2007). Elementy z nadrodiny *Helitron* jsou výrazně amplifikované v genomu perleťovce *Heliconius melpomene* a představují největší skupinu DNA transpozonů u tohoto organismu (Lavoie a kol., 2013).

Poslední skupina DNA transpozonů se nazývá „self-synthesizing transposons“ a patří sem nadrodina *Maverick* (Sotero-Caio a kol., 2017). Tyto elementy si kódují až 10 různých proteinů, mimo jiné vlastní DNA polymerázu a integrázu podobnou jako u retrovirů. Tyto enzymy zajišťují vystřížení elementu z hostitelského genomu během jeho replikace. Jednovláknový element formuje raketovitou strukturu a je replikován vlastní polymerázou. Pomocí integrázy je dvouvláknový element vložen na nové místo v genomu (Kapitonov a Jurka, 2006).

Class I MGE—retrotransposons			Class II MGE—DNA transposons			
Order	Superfamily	Structural organization	Order	Superfamily	Structural organization	
LTR	<i>Copia</i>	→ GAG AP INT RT RH →	TIR	<i>Tc1/mairner</i>	> TRANSPOSASE <	
	<i>Gypsy</i>	→ GAG AP RT RH INT →		<i>hAT</i>		
	<i>Bel-Pao</i>	→ GAG AP RT RH INT →		<i>Mutator</i>		
	<i>Retrovirus</i>	→ GAG AP RT RH INT ENV →		<i>Merlin</i>		
	<i>ERV</i>	→ GAG AP RT RH INT ENV →		<i>Transib</i>		
DIRS	<i>DIRS</i>	> GAG AP RT RH YR <		<i>P</i>		> TRANSPOSASE ORF2 <
	<i>Ngaro</i>	→ GAG AP RT RH YR →→→		<i>PiggyBac</i>		
	<i>VIPER</i>	→ GAG AP RT RH YR →→→		<i>PIF-Harbinger</i>		
PLE	<i>Penelope</i>	← RT EN →		<i>CACTA</i>		> TRANSPOSASE ORF2 <
LINE	<i>R2</i>	— RT EN —		Crypton		<i>Crypton</i>
	<i>RTE</i>	— APE RT —	Helitron	<i>Helitron</i>	— RPA Y2HEL —	
	<i>Jockey</i>	— ORF1 APE RT —	Maverick	<i>Maverick</i>	— C-INT ATP CYP POLB —	
	<i>LI</i>	— ORF1 APE RT —				
	<i>I</i>	— ORF1 APE RT RH —				
SINE	<i>tRNA</i>	— — — — —				
	<i>7SL</i>	— — — — —				
	<i>5S</i>	— — — — —				

Obrázek 1: Rozdělení mobilních elementů (převzato z Mustafin, 2018). LTR: dlouhá koncová opakování; GAG: kapsidový protein; AP: aspartátová proteináza; INT: integráza; RT: reverzní transkriptáza; RH: RNáza H; TIR: koncová invertovaná opakování; ENV: obalový protein; YR: tyrosin rekombináza; EN: endonukleáza; APE: apurinová endonukleáza; ORF: otevřený čtecí rámec; RPA: replikační protein A; HEL: helikáza; ATP: ATPáza; CYP: cysteinová proteáza; POLB: DNA polymeráza B.

1.3.3. Horizontální přenos mobilních elementů

Horizontální přenos genů je přenesení genetické informace jinak než po genealogické linii, tedy ne přenos z rodiče na potomka. Ačkoli je horizontální přenos genů znám především u prokaryot, dochází k němu i u eukaryotických organismů (Boto, 2010). Většina genů eukaryot získaných horizontálním přenosem pochází od prokaryot (Keeling, 2009). Méně často jsou pozorovány horizontální přenosy genů mezi eukaryoty (Boto, 2010). Sekvence získané horizontálním přenosem mohou u nového hostitele zajistit novou fyziologickou funkci (Drezen a kol., 2017). Mobilní elementy se mohou šířit horizontálním přenosem snáze než jiné sekvence (kódující i nekódující), protože mají schopnost snáze se začlenit do genomu na novém místě. Horizontální přenos je důležitou součástí životního cyklu mobilních elementů,

Jelikož jim umožňuje kolonizovat další druhy organismů (Wallau a kol., 2012). Mobilní elementy, které se dostaly do genomu nově pomocí horizontálního přenosu, se v něm mohou nekontrolovaně šířit, dokud se nedostanou pod kontrolu regulačních mechanismů (Drezen a kol., 2017).

1.3.4. Vliv mobilních elementů na genom

Jelikož jsou mobilní elementy nedílnou součástí genomu, mají na něj také nemalý vliv. Mimo jiné repetitivní DNA ovlivňuje velikost genomu svojí přítomností v něm (Kraaijeveld, 2010). Jako nekódující sekvence se mobilní elementy podílejí na jevu označovaném jako paradox hodnoty C, což znamená, že velikost genomu nekoresponduje s fenotypovou komplexitou organismu (Rebollo a kol., 2010).

Mobilní elementy mohou mít vliv na funkci a expresi protein kódujících genů. Pokud se transpozony vloží do regulační sekvence, mohou působit jako alternativní promotory nebo enhancery. Při transpozici mobilního elementu může dojít k jeho vložení do protein kódující oblasti, což může způsobit mutaci daného genu. Například u lidí vložení LINE1 do exonu 14 genu pro faktor srážlivosti VIII spouští hemofilii A. Inzerce mobilního elementu může také způsobit změnu místa sestřihu, což může vést ke změně struktury vznikajícího proteinu, a tím může být změněna i jeho funkce. Při transpozici může také dojít k malým delecím v cílové DNA, nebo naopak k přidání několika bází v místě inzerce, což může způsobovat změny v několika aminokyselinách, ale i posuny čtecího rámce nebo vznik předčasných stopkodonů. Obecně mají mobilní elementy tendenci být metylovány, takže mají vliv na epigenom, což ovlivňuje expresi genů v okolí místa inzerce (Klein a O'Neill, 2018). Čím více repetitivní je v genomu přítomno, tím větší mohou mít vliv na jeho přestavby a vznik mutací (Kraaijeveld, 2010).

Přítomnost mobilních elementů má také často vliv na chromozomální aberace. Přítomnost jednotlivých kopií daného transposonu v různých částech genomu může vést k rekombinaci mezi nehomologními oblastmi, což může způsobit delece, duplikace či inverze (Kraaijeveld, 2010; Klein a O'Neill, 2018). Například u rodu *Drosophila*, konkrétně u skupiny *virilis* bylo objeveno, že retrotranspozony (*Penelope* a *Ulysses*) souvisí s řadou chromozomálních přestaveb, některé z nich jsou v rámci druhu fixované, jiné přestavby vykazují vnitrodruhovou variabilitu (Evgen'ev a kol., 2000). Také transpozony *P element* a *hobo* mají u zástupců rodu *Drosophila* sklon k vyvolání převážně intrachromozomálních přestaveb, ke kterým dochází vlivem rekombinace mezi jednotlivými kopiemi daného mobilního elementu. Restrukturalizaci chromozomů u rodu *Drosophila* zřejmě také způsobují

retroelementy *BEL/Pao*, *roo*, *Docand I* a *foldback element*. Lze předpokládat, že mobilní elementy by mohly mít podobnou roli i u jiných druhů (Lim a Simmons, 1994). Při vkládání retrotranspozonů na nové místo mohou navíc vznikat dvouvláknové zlomy vedoucí k rozpadu chromozomu (Gasior a kol., 2006).

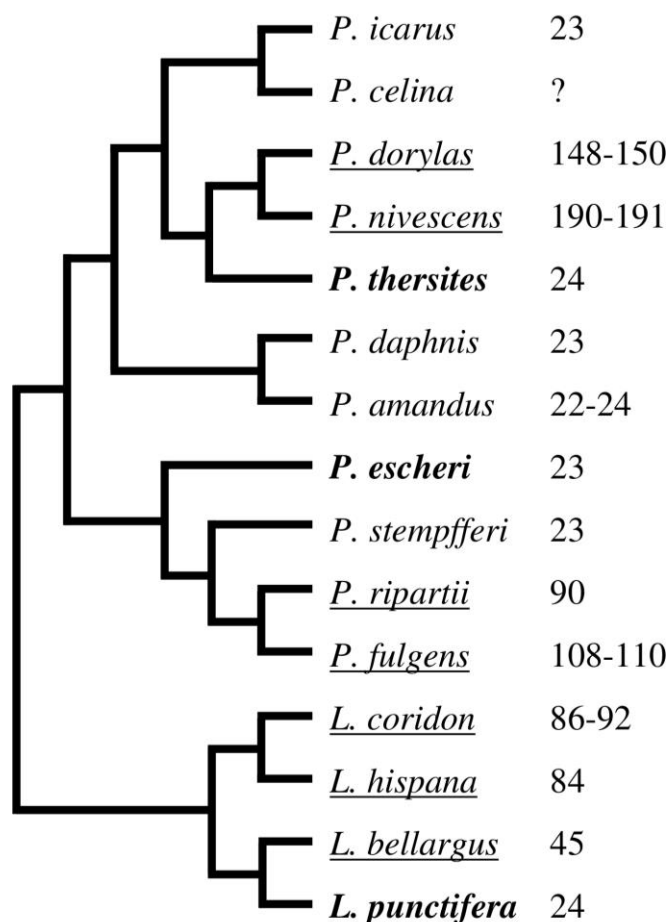
Jako obrana proti vlivům mobilních elementů se vyvinula řada mechanismů, které brání nestabilitě genomu (Klein a O'Neill, 2018). Pokud se však do genomu dostane nový mobilní element, například horizontálním přenosem, trvá nějaký čas, než se dostane pod kontrolu regulačních mechanismů. Během této doby se může element nekontrolovaně šířit a výrazně tak ovlivnit hostitelský genom (Drezen a kol., 2017). Mezi obranné mechanismy patří například epigenetické umlčení mobilních elementů, které může být narušeno, pokud je organismus stresovaný, nebo pokud dojde k mezidruhovému křížení (Rebollo a kol., 2010). Další mechanismus, který brání šíření repetitivních sekvencí jsou „PIWI-interacting RNA“ (piRNA), což jsou krátké RNA exprimované především v zárodečné linii živočichů, interagující s PIWI proteiny ze skupiny proteinů Argonaute. Tyto 23–29 bazí dlouhé RNA byly objeveny u modelových organismů jako jsou octomilka, myš, krysa, háďátko nebo dánio pruhované. Jednotlivé piRNA rozpoznávají na základě komplementarity především mRNA vzniklé přepisem mobilních elementů, což vede jednak k degradaci daného transkriptu, ale následně i k umlčení transpozonů epigenetickými modifikacemi (jako je metylace DNA nebo histonové modifikace) (Guo a Wu, 2013; Luo a Lu, 2017). Dalším obranným mechanismem proti škodlivým vlivům mobilních elementů je homologní rekombinace, která rychle eliminuje mobilní elementy a udržuje tak genom kompaktní, což vyplývá například z výzkumu genomu u perleťovce *Heliconius melpomene* (Lavoie a kol., 2013).

1.4. Analýza repetitivní složky genomu modrásků pomocí programu RepeatExplorer

Fragmentaci chromozomů a následnou diverzifikaci u modrásků by mohly způsobovat mobilní elementy, které mají obecně vliv na chromozomální přestavby (Kraaijeveld, 2010; Klein a O'Neill, 2018). Tato teorie byla navrhována již v Kandul a kol. (2004), kde bylo také diskutováno, že transpozony by mohly být přenášeny například horizontálním přenosem mezi podrodem *Agrodiaetus* a skupinami *Lysandra* a *Plebicula*.

Hypotéza o vlivu mobilních elementů na fragmentaci karyotypu u modrásků byla zkoumána pomocí programu RepeatExplorer (Novák a kol., 2013) a předkládaná bakalářská práce ověřuje výsledky této analýzy, kterou vypracovala Martina Dalíková. Bioinformatickým softwarem RepeatExplorer byla porovnána jednotlivá sekvenační čtení získaná sekvenací genomové DNA firmou Illumina z deseti druhů modrásků. Od každého druhu byli použiti tři

samci. V rámci jedné fylogenetické větve byly porovnávány druhy s vysokým počtem chromozomů vůči referenčnímu druhu s ancestrálním počtem chromozomů (viz Obrázek 2).



Obrázek 2: Fylogenetické vztahy všech druhů modrásků zkoumaných v této bakalářské práci. (Kladogram byl sestaven na základě poskytnutých výsledků fylogenetické analýzy od Vila a kol., nepublikováno.) Číslo napravo znázorňuje haploidní počet chromozomů u daného druh (Kandul a kol., 2004; Wiemers a kol., 2010; Talavera a kol., 2013; Vershinina a Lukhtanov, 2017). Referenční druhy s ancestrálním počtem chromozomů analyzované bioinformaticky jsou uvedeny tučně, srovnávané druhy jsou podtrženy. Ostatní uvedené druhy byly použity pro další ověření výsledků analýzy.

Cílem bylo odhalit mobilní elementy, které se nacházejí zároveň u zkoumaných druhů s vysokým počtem chromozomů, ale chybí u referenčního druhu vždy v rámci kladu. Takto byl srovnán referenční druh *Polyommatus thersites* vůči *P. dorylas* a *P. nivescens*, u kterých byla odhalena akumulace elementů *BEL/Pao* a *Mariner* (dále označovány jako *Pd-BEL/Pao* a *Pd-Mariner*). V rámci dalšího kladu byl druh *P. escheri* srovnáván s *P. ripartii* a *P. fulgens*,

které mají více chromozomů a byly u nich nalezeny repetice *Mariner* a *Ty3/Gypsy* (dále označovány jako *Pr-Mariner* a *Pr-Ty3/Gypsy*). Srovnání druhů *Lysandra coridon*, *L. hispana* a *L. bellargus* s *L. punctifera* detekovalo *P element* a repetici *Ty3/Gypsy* (dále označovány jako *Lc-P element* a *Lc-Ty3/Gypsy*) u druhů s více chromozomy.

2. Cíle práce

Pro motýly (řád Lepidoptera) je typický výskyt holokinetických chromozomů s delokalizovanou centromerou. O takovýchto chromozomech se předpokládá, že usnadňují evoluci karyotypu přes chromozomální fúze a rozpady (Mola a Papeschi, 2006; Bureš a Zedek, 2014). Navzdory tomu je známo, že u zástupců tohoto řádu, se haploidní počet chromozomů obvykle pohybuje kolem 31, což je ancestrální stav pro tuto skupinu živočichů (Robinson, 1971; Ahola a kol., 2014).

Někteří zástupci z čeledi modráskovití (Lycaenidae) se však v tomto ohledu výrazně odlišují od ostatních motýlů a mají velmi variabilní počet chromozomů, který se liší i mezi blízkými příbuznými druhy. Příčina nestability karyotypu dosud není známá, ale s chromozomálními přestavbami jsou často spojovány mobilní elementy (Kraaijeveld, 2010; Klein a O'Neill, 2018) a například Kandul a kol. (2004) je navrhuje i jako možnou příčinu fragmentace genomu modrásků. U modrásků rodů *Polyommatus* a *Lysandra* byla provedena bioinformatická analýza repetitivní části genomu pomocí programu RepeatExplorer. Výsledky této analýzy odhalily u obou studovaných rodů možnost existence mobilních elementů specifických pro druhy s fragmentovaným karyotypem.

Cílem této bakalářské práce bylo studium vybraných repetitivních sekvencí specifických pro druhy modrásků rodů *Polyommatus* a *Lysandra* s vysokým počtem chromozomů. Dílčími cíli bylo:

- I. amplifikovat a klonovat vybrané repetece u modrásků *Polyommatus dorylas*, *P. ripartii* a *Lysandra coridon*;
- II. lokalizovat tyto sekvence na chromozomech příslušného druhu pomocí fluorescenční hybridizace *in situ*;
- III. ověřit přítomnost daných repetitivních sekvencí u příbuzných druhů.

3. Materiál a metody

3.1. Použitý hmyz

Pro práci byli použiti modrásci rodů *Polyommatus* a *Lysandra*. Informace o všech jedincích jsou zaneseny v Tabulce 1. Vzorky mi poskytli Petr Nguyen z Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích; Roger Vila a Gerard Talavera z Institut de Biologia Evolutiva (CSIC-UPF), Barcelona, Španělsko a Vladimir Lukhtanov ze St. Petersburg State University, Petrohrad, Rusko; za což jim velice děkuji.

Dále byly pro tuto práci použity vzorky mravenců, které mi poskytl Pavel Pech z Univerzity Hradec Králové. I jemu děkuji. Všechny vzorky mravenců byly naloženy v etanolu a uchovávány při -80 °C, použity byly jen samice (viz Tabulku 2).

3.2. Izolace genomové DNA pomocí kitu NucleoSpin

Genomová DNA byla izolována ze vzorků hmyzu (viz Tabulky 1 a 2). Izolace DNA byla provedena pomocí kitu NucleoSpin DNA Insect (Macherey-Nagel, Německo). Nejprve bylo do zkumavky napipetováno 100 µl pufru „Elution Buffer“ a 40 µl pufru „Buffer MG“. Do takto připravených zkumavek byla přesunuta tkáň ze vzorků. U vzorků v etanolu, byla tkáň nejprve vysušena filtračním papírem. Tkáň ve zkumavkách byla homogenizována pomocí sterilních tlouček. Do každé zkumavky pak bylo přidáno 10 µl dodané proteinázy K, obsah zkumavek byl promíchán a ponechán 20 minut inkubovat při pokojové teplotě. Další kroky byly provedeny podle přiloženého protokolu od výrobce. Finální eluce byla provedla do 50 µl pufru „Elution Buffer“.

Koncentrace DNA byla změřena na přístroji Qubit 3.0 Fluorometer (ThermoFisher Scientific, USA) pomocí kitu Qubit dsDNA BR Assay Kit (ThermoFisher Scientific, USA) a byly použity 2 µl měřené DNA. Měření bylo provedeno podle přiloženého manuálu. Takto byla provedena všechna měření koncentrace DNA v této práci. Získaná genomová DNA byla skladována při -20 °C a později využita pro další metody.

Tabulka 1: Použití modrásci. Vzorky, u kterých je ve sloupci o uchování vzorku uvedeno „zmraženo“, byly zamraženy v tekutém dusíku a následně uchovávány v -80 °C. Vzorky, u kterých je uvedeno „v etanolu“, byly skladovány také při -80 °C naloženy v etanolu (před tímto uskladněním byly nějakou dobu uchovávány při pokojové teplotě). Vzorky, u kterých je uvedeno „sušeno“ byly skladovány při pokojové teplotě.

Druh	Pohlaví	Rok sběru	Místo sběru	Uchování vzorku
<i>Polyommatus icarus</i>	♂	2016	Tušť, ČR	zmraženo
<i>Polyommatus celina</i>	♂	2013	Menorka, Španělsko	v etanolu
<i>Polyommatus dorylas</i>	♂	2017	Calella, Barcelona, Španělsko	v etanolu
<i>Polyommatus dorylas</i>	♂	2017	Calella, Barcelona, Španělsko	v etanolu
<i>Polyommatus dorylas</i>	♂	2017	Calella, Barcelona, Španělsko	v etanolu
<i>Polyommatus nivescens</i>	♂	2014	El Vallecillo, Aragon, Španělsko	v etanolu
<i>Polyommatus nivescens</i>	♂	2016	Villacadima, Kastilie-La Mancha, Španělsko	zmraženo
<i>Polyommatus nivescens</i>	♂	2017	Tivissa, Katalánsko, Španělsko	zmraženo
<i>Polyommatus thersites</i>	♂	2017	Montseny, Barcelona, Španělsko	zmraženo
<i>Polyommatus thersites</i>	♂	2017	Montseny, Barcelona, Španělsko	zmraženo
<i>Polyommatus thersites</i>	♂	2017	Montseny, Barcelona, Španělsko	v etanolu
<i>Polyommatus daphnis</i>	♂	2015	Huesca, Aragon, Španělsko	v etanolu
<i>Polyommatus amandus</i>	♂	2008	Lleida, Katalánsko Španělsko	v etanolu
<i>Polyommatus escheri</i>	♂	2017	Montseny, Barcelona, Španělsko	zmraženo
<i>Polyommatus escheri</i>	♂	2017	Montseny, Barcelona, Španělsko	zmraženo
<i>Polyommatus escheri</i>	♂	2017	Montseny, Barcelona, Španělsko	zmraženo
<i>Polyommatus stempfferi</i>	♂	2003	Deh-Bala, Írán	sušeno
<i>Polyommatus stempfferi</i>	♂	2003	Deh-Bala, Írán	sušeno
<i>Polyommatus stempfferi</i>	♂	2003	Deh-Bala, Írán	sušeno
<i>Polyommatus ripartii</i>	♂	2017	Montseny, Barcelona, Španělsko	zmraženo
<i>Polyommatus ripartii</i>	♂	2017	Montseny, Barcelona, Španělsko	zmraženo
<i>Polyommatus ripartii</i>	♂	2017	Montseny, Barcelona, Španělsko	zmraženo
<i>Polyommatus ripartii</i>	♂	2017	Montseny, Barcelona, Španělsko	zmraženo
<i>Polyommatus fulgens</i>	♀	2017	Montseny, Barcelona, Španělsko	zmraženo
<i>Polyommatus fulgens</i>	♂	2015	Olazagutia, Navarra Španělsko	v etanolu
<i>Polyommatus fulgens</i>	♂	2015	Ezcaray, La Rioja, Španělsko	v etanolu
<i>Lysandra coridon</i>	♂	2017	Hády, ČR	zmraženo
<i>Polyommatus hispana</i>	♂	2017	Malorka, Paguera, Španělsko	zmraženo
<i>Polyommatus belargus</i>	♂	2018	Baga, Barcelona, Španělsko	zmraženo
<i>Polyommatus punctifera</i>	♂	2015	Maroko	v etanolu

Tabulka 2: Použití mravenci.

Druh	Datum sběru	Místo sběru
<i>Myrmica sabuleti</i>	červen 2019	PP Báň
<i>Tapinoma erraticum</i>	červen 2019	PP Báň
<i>Tetramorium cf. Caespitum</i>	červen 2019	PP Báň
<i>Formica (Serviformica) rufibarbis</i>	červen 2019	Oškobrň
<i>Lasius (Lasius s. str.) alienus</i>	červen 2019	Oškobrň
<i>Lasius (Dendrolasius) fuliginosus</i>	květen 2019	Kunětická Hora
<i>Myrmica ruginodis</i>	květen 2019	Kunětická Hora
<i>Lasius (Cautolasius) flavus</i>	květen 2019	Kunětická Hora
<i>Dolichoderus quadripunctatus</i>	květen 2019	Kunětická Hora
<i>Camponotus ligniperda</i>	červen 2019	Hradec Králové
<i>Formica (Raptiformica) sanguinea</i>	červen 2019	Hradec Králové
<i>Formica (Formica s. str.) pratensis</i>	červen 2019	Hradec Králové
<i>Liometopum microcephalum</i>	květen 2019	Lednice

3.3. Navržení primerů

K navrhování primerů byl použit program Geneious 11.1.4. (Biomatters, Nový Zéland), konkrétně nástroj Primer 3 (Untergasser a kol., 2012). Primery byly pořízeny od firmy Geneti Biotech s.r.o. (Hradec Králové, Česká republika). Použité primery jsou uvedeny v Tabulkách 3, 4, 5, 6, 7, 8 u jednotlivých metod. Optimální nasedací teplota pro všechny primery byla zjištěna gradientovou PCR. Kromě univerzálních primerů M13 byly všechny primery navrženy v rámci této práce. Názvy primerů se skládají ze tří částí: zkratka druhu, u kterého byl primer navrhován (Pd = *Polyommatus dorylas*, Pr = *Polyommatus ripartii*, Lc = *Lysandra coridon*); zkratka názvu mobilního elementu, který daný primer amplifikuje (BEL = *BEL/Pao*, P = *P element*, Ty3 = *Ty3/Gypsy*); třetí část názvu označuje, zda se jedná o forward (F) či reverse (R) primer a udává číslo daného páru primerů.

3.4. PCR

Celkový objem jedné reakční směsi byl 20 µl. Jedna reakce obsahovala: přibližně 26 ng DNA (množství DNA se mohlo mírně lišit vzhledem ke koncentraci daného vzorku); 1x OneTaq Quick-Load Reaction Buffer a 1 U OneTaq Quick-Load DNA Polymerase (New England BioLabs, USA); 1 µM každý primer; 0,2 mM každý dNTP (TaKaRa, Japonsko). Při

klonování byla použita ExTaq polymeráza a jedna taková směs pro PCR o celkovém objemu 20 μ l obsahovala: 30 ng DNA (množství DNA se mohlo mírně lišit vzhledem ke koncentraci daného vzorku); 1x Ex Taq Buffer a 1 U Ex Taq a 0,2 mM každý dNTP (TaKaRa, Japonsko); 1 μ M každý primer. Ke každému připravovanému master mixu byla provedena negativní kontrola bez templátové DNA.

Samotná amplifikace pomocí PCR probíhala v termocycleru Biometra TAdvanced (Analytik Jena, Německo). Prvním krokem byla počáteční denaturace při 94 °C, která trvala 3 minuty, dále následovalo 30 cyklů, které zahrnovaly 3 kroky: denuraci trvající 30 sekund při 94 °C, nasedání primerů trvající 30 sekund při teplotě optimální pro použité primery (viz Tabulky: 3, 4, 5, 6, 7, 8) a elongaci při teplotě optimální pro použitou DNA polymerázu (OneTaq 68 °C, ExTaq 72 °C). Doba elongace se odvíjela od délky amplifikovaného produktu PCR (1 minuta na 1000 bazí). Posledním krokem byla finální elongace, trvající 3 minuty a probíhající opět při teplotě optimální pro použitou polymerázu. Po provedení těchto kroků byly vzorky ochlazeny na 4 °C.

3.5. Gelová elektroforéza

Pro kontrolu výsledků PCR byla použita gelová elektroforéza na 1% agarózovém gelu připraveném v 1x TAE pufru (Tris-Acetate-EDTA: 40 mM Tris, 20 mM kyseliny octové, 1 mM EDTA; pH 8). Do mírně zchlazeného gelu byl přidán etidium bromid na výslednou koncentraci 0,2–0,5 μ g/ml. Byl použit velikostní marker Gene Ruler 1 kb DNA Ladder (ThermoFisher Scientific, USA), nebo PCRBIOLadder I (PCR Biosystems, Velká Británie).

3.6. Klonování, izolace plazmidové DNA a sekvenování

3.6.1. Amplifikace pomocí PCR, přečištění produktů PCR, měření koncentrace DNA

K amplifikaci požadovaných úseků DNA byla použita PCR s ExTaq polymerázou (viz kapitolu 3.4.), použité primery jsou uvedené v Tabulce 3.

Produkty PCR byly přečištěny na kolonce pomocí kitu Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, USA). Bylo postupováno podle návodu od výrobce. Eluce byla provedena do 25 μ l přiložené vody „Nuclease Free“. Následně byla změřena koncentrace přečištěného produktu PCR pomocí přístroje Qubit 3.0 Fluorometer.

Tabulka 3: Primery pro amplifikaci mobilních elementů ke klonování.

Název primeru	Sekvence primeru	Ta [°C]	Délka produktu [bp]
Lc_P_F1	ACGGAATAAGCCAGGAACTACC	65	1 429
Lc_P_R1	ATCAGCTGATCACGTCGTGT		
Lc_Ty3_F1	AGACTGTCCCATGCAGAACG	65	2 181
Lc_Ty3_R1	TTGAAAATTCGTGCTGGGCG		
Lc_Ty3_F2	CGCCCTGGTACTCGTATGTC	60	2 430
Lc_Ty3_R2	CCTGTGGTCCTCAAGTCGTC		
Lc_Ty3_F3	CGCCCAGCACGAATTTTCAA	58	2 071
Lc_Ty3_R3	TGACTTGCCATTCGTCCCAA		
Pd_BEL_F1	AGGTAGCGTGCTTTTCTCCC	62	2 378
Pd_BEL_R1	TTCCGAACCACCGATTCCTG		
Pd_BEL_F2	CAGGAATCGGTGGTTCGGAA	65	2 695
Pd_BEL_R2	ACATTCCCCCGGCCTTAAAG		
Pd_Mariner_F1	ACAGACGCCATACCAAGCAA	62	1 226
Pd_Mariner_R1	TACGCTCTCAATGGGCTTCG		
Pr_Mariner_F1	TGTCAATTATTTTCCATTGTGGCG	60	1 104
Pr_Mariner_R1	GCTTTTCAAATATTCGCCGCG		
Pr_Ty3_F2	TCTTGATTTTCATTTGGTCCAAGG	62	1 050
Pr_Ty3_R2	AGTGAAAACAAGAGACTGCAAATT		

3.6.2. Ligace

Pro ligaci byl použit kit pGem-T Easy Vector System (Promega, USA). Podle protokolu od výrobce bylo do ligační reakce přidáno 3x více kopií přečištěného produktu PCR než vektoru. Jedna ligační reakce měla celkový objem 10 µl a obsahovala: 50 ng vektoru, 1x ligační pufr, 3 U T4 DNA ligázy a odpovídající množství přečištěného produktu PCR. Reakční směs byla inkubována v lednici (4 °C) přes noc.

3.6.3. Transformace tepelným šokem

Kompetentní bakteriální buňky *Escherichia coli* kmene DH5a uchované v -80 °C byly nechány rozmraznout na ledu. Poté bylo do každé zkumavky připraveno 50 µl kompetentních buněk a přidáno 2,5 µl ligační reakce. Tato směs byla 30 minut ponechána na ledu. Pak byly

zkumavky přeneseny do termobloku předehřátého na 42 °C, kde byly zahřívány 90 sekund, poté byly na 1 minutu rychle přeneseny na led. K buňkám bylo přidáno 800 µl sterilního LB média LB Broth Low salt (Duchefa Biochemie, Nizozemsko) nebo SOC média (ThermoFisher Scientific, USA). Polovina buněk po transformaci (v některých případech všechny buňky) byla vyseta na připravené agarové Petriho misky pro modro-bílou selekci (1,5% bacto agar (VWR Life Science, USA) v LB médiu, 100 µg/ml ampicilin, na jednu misku bylo po ztuhnutí média přidáno: 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) a rozetřeno sterilní skleněnou hokejkou). Transformované buňky byly kultivovány na miskách přes noc ve 37 °C.

3.6.4. Klon-test a přeočkování vybraných kolonií

Z narostlých bílých kolonií obsahujících insert bylo vybráno několik velkých samostatných kolonií, aby nedošlo ke smísení bakterií ze dvou kolonií blízko vedle sebe. Byl připraven master mix pro klon-test pomocí PCR s OneTaq polymerázou a univerzálními vektorovými primery M13 (viz Tabulku 4). V celkovém objemu jedné reakce (20 µl) nebylo počítáno s žádnou DNA a její objem byl nahrazen vodou (viz kapitolu 3.4.). DNA byla do reakce vnesena pipetovací špičkou, kterou byla daná kolonie nejprve přeočkována na novou Petriho misku (1,5% bacto agar v LB médiu, 100 µg/ml ampicilin). Nová miska byla inkubována přes noc ve 37 °C, poté zalepena parafilmem a uchována v lednici (4 °C).

Tabulka 4: Univerzální vektorové primery M13. 260 bp je délka vektoru, který je těmito primery amplifikován spolu s insertem.

Název primeru	Sekvence primeru	Ta [°C]	Délka produktu [bp]
M13_F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	57	dle insertu + 260 bp
M13_R	CAGGAAACAGCTATGAC		

3.6.5. Množení bakterií v tekutém médiu, příprava vzorků v glycerolu, izolace plazmidové DNA

Vybrané klony o očekávané velikosti byly namnoženy v tekutém médiu. Do zkumavek se 4 ml LB média obsahujícího 400 µg ampicilinu byly pomocí pipetovací špičky přeneseny bakterie z přeočkovévané Petriho misky (viz kapitolu 3.6.4.). Zkumavky byly inkubovány přes noc za stálého míchání při 37 °C. Další den bylo z každé zkumavky odebráno 500 µl do

Eppendorfovy zkumavky s připravenými 500 µl 50% glycerolu. Vzorke byly zamrazeny v tekutém dusíku a následně uchovávány při -80 °C.

Zbytek tekuté bakteriální kultury byl použit pro izolaci plazmidové DNA alkalickou lyzí pomocí kitu NucleoSpinPlasmid (Macherey-Nagel, Německo) podle protokolu výrobce, finální eluce byla provedena do 50 µl přiloženého elučního pufru.

3.6.6. Sekvenování vzorků

U vyizolované plazmidové DNA byla změřena koncentrace pomocí přístroje Qubit 3.0 Fluorometer. Každá sekvenační reakce o celkovém objemu 5 µl obsahovala 500 ng plazmidové DNA. Vzorke byly sekvenovány pomocí primerů M13 v laboratoři SEQme s.r.o. (Dobříš, Česká republika) standardním Sangerovým sekvenováním. Klony nesoucí část element *Pd-BEL/Pao* se nepodařilo celé prosekvenovat, stejně jako element *Lc-Ty3/Gypsy*, konkrétně klon amplifikovaný pomocí páru primerů Lc_Ty3_F2 a Lc_Ty3_R2. Proto byly navrženy další primery, viz Tabulku 5.

Tabulka 5: Navržené primery pro sekvenaci klonovaných mobilních elementů.

Název primeru	Sekvence primeru	Ta [°C]
Pd_BEL_F3	CCGCCAAATTGCTTGCTGTA	60
Pd_BEL_R3	CGCGGGATTGCTACGTAATT	
Pd_BEL_F4	ACGCTAGCTGTGCGAACTACA	60
Pd_BEL_R4	ACCGAAATGTGGAGAGGCAG	
Lc_Ty3_F4	GTGTTTGAGACGCAATGGAAC	60

Další sekvenační reakce o celkovém objemu 10 µl obsahovaly 500 ng plazmidové DNA a 25 pmol jednoho primeru. Dále byly stejným způsobem připraveny sekvenační reakce s některými primery použitými pro amplifikaci mobilních elementů. Pro sekvenaci klonu amplifikovaného primery Lc_Ty3_F1 a Lc_Ty3_R1, byl použit primer Lc_Ty3_F2. Pro sekvenování klonu amplifikovaného primery Lc_Ty3_F3 a Lc_Ty3_R3 byl použit primer Lc_Ty3_R2 (viz Tabulku 3). Získané sekvence byly zpracovány v programu Geneious 11.1.4. a porovnány s konsensus sekvencemi získanými v předchozích bioinformatických analýzách (viz kapitulu 1.4.)

3.7. Analýza přítomnosti repetice u příbuzných druhů modrásků a u vybraných druhů mravenců.

Analýza mobilních elementů byla provedena pomocí PCR. Pro kontrolu průběhu PCR byly navrženy primery na část genu pro 18S rRNA v programu Geneious 11.1.4. Teplota nasedání primerů byla s ohledem na ostatní použité primery stanovena na 62 °C. Primery označené zkratkou „lyc“ byly použity u modrásků, zkratka „ants“ značí použití u mravenců, viz Tabulku 6. Tyto primery byly otestovány pomocí PCR nejprve samostatně, a pak i dohromady s primery pro jednotlivé mobilní elementy. Pro analýzu byly použity následující primery (viz Tabulku 7).

Tabulka 6: Primery pro 18S rRNA.

Název primeru	Sekvence primeru	Délka produktu [bp]
18S_lyc_F	CGGTGCTCTTCAGTGAGTGT	571
18S_lyc_R	CACCACCCACCGAATCAAGA	
18S_ants_F	GCCTGAATACTGCGTGCATG	516
18S_ants_R	TCCACCAACTAAGAACGGCC	

Tabulka 7: Primery použité pro analýzu přítomnosti mobilních elementů u vybraných druhů modrásků a mravenců.

Název primeru	Sekvence primeru	Délka produktu [bp]
Lc_P_F1	ACGGAATAAGCCAGGAACTACC	1 429
Lc_P_R1	ATCAGCTGATCACGTCGTGT	
Lc_Ty3_F5	CGCCCTGGTACTCGTATGTC	1130
Lc_Ty3_R5	TTGAAAATTCGTGCTGGGCG	
Pd_Mariner_F1	CCGCCGCTAGACTTTATCGT	851
Pd_Mariner_R1	TACGCTCTCAATGGGCTTCG	
Pd_BEL_F5	GCGCTCGTGTGAACGTATTC	1190
Pd_BEL_R5	CTCAATGTCCGGTGAAGCCT	
Pr_Mariner_F1	TGTCAATTATTTTTCCATTGTGGCG	1104
Pr_Mariner_R1	GCTTTTCAAAATATTCGCCGCG	
Pr_Ty3_F2	TCTTGATTTTCATTTGGTCCAAGG	1050
Pr_Ty3_R2	AGTGAAAACAAGAGACTGCAAATT	

Směsi pro PCR obsahující dva páry primerů byly namíchaný tak, jak je popsáno v kapitole 3.4. U všech druhů byla použita OneTaq polymeráza. Reakce u modrásků obsahovaly přibližně 26 ng DNA (podle naměřené koncentrace), každá reakce u mravenců obsahovala přibližně 15 ng DNA (podle naměřené koncentrace).

3.8. Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

U druhů *Lysandra coridon* a *L. bellargus* byla provedena fluorescenční *in situ* hybridizace, umožňující lokalizaci studovaných repetit na chromozomech. Analyzovány byly mobilní elementy *Lc-P element* a *Lc-Ty3/Gypsy*. K tomuto účelu byla použita tzv. TSA-FISH („Tyramide signal amplification FISH“), což je FISH s enzymatickou amplifikací signálu.

3.8.1. Příprava sond

Sondy byly připraveny pomocí PCR, kde jako templát sloužila plazmidová DNA a primery byly použity stejné, jako při klonování daného elementu. Pro oba studované elementy byla jako templát použita DNA z klonů s největší homologií s konsensus sekvencí (viz Přílohu I). Každá reakční směs pro PCR o celkovém objemu 20 µl obsahovala: přibližně 19 ng plazmidové DNA a byla použita ExTaq polymeráza (viz kapitolu 3.4.).

Deset stejných směsí pro PCR se stejnou templátovou DNA bylo přepipetováno do jedné zkumavky a přečištěno pomocí kitu Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System. Bylo postupováno podle návodu od výrobce. Eluce byla provedena do 40 µl přiložené „Nuclease Free“ vody. Koncentrace DNA v přečištěném produktu PCR byla změřena pomocí přístroje Qubit 3.0 Fluorometer.

Sondy byly značeny metodou tzv. nick-translace. Jedna reakční směs o celkovém objemu 20 µl obsahovala: 1x Nick Translation pufr (5 mM Tris-HCl, 0,5 mM MgCl₂, 0,0005% BSA; 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 digoxigenin-11-dUTP (Jena Bioscience, Německo); 20 U DNA polymerázy I (ThermoFisher Scientific, USA); 0,01 U DNázy I (ThermoFisher Scientific, USA) a 1 µg templátové DNA. Značení probíhalo při 15 °C po dobu 45 minut u sondy pro *Lc-P element* a 60 minut u sond pro repetici *Lc-Ty3/Gypsy*. Poté byla reakce ukončena přidáním 2 µl 10x pufru „loading buffer“ (50% glycerol; 250 mM EDTA; 5,9 mM bromphenol blue). Výsledek nick-translace byl ověřen gelovou elektroforézou. Takto značené sondy byly přečištěny na sephadexové kolonce, která byla vyrobena ze Sephadexu G-50 (GE Healthcare, USA) a pipetovací špičky s filtrem. Pro výrobu jedné kolonky bylo použito 0,025 g Sephadexu

a 400 μ l MilliQ H₂O. Tato směs byla po promíchání inkubována 45 minut při 4 °C. Poté byla nanášena do ustřížené pipetovací špičky s filtrem (200 μ l). Kolonka byla vložena do zkumavky a poslední zbytky vody byly odstraněny centrifugací po dobu 2 minut na 1000 g. Na takto připravenou kolonku byla nanášena značená sonda a opět proběhla centrifugace (2 minuty, 1000 g). Takto přečištěné sondy měly koncentraci přibližně 20–30 ng/ μ l a byly skladovány při -20 °C.

3.8.2. Hybridizace na chromozomální preparáty

Chromozomální preparáty byly připraveny rozptylovací metodou na histologické plotýnce (Mediouni a kol., 2004) a věnovala mi je kolegyně Monika Křeklová, za což jí děkuji. Sklíčka s chromozomálními preparáty, která byla uchovávána při -80 °C, byla nejprve odvodněna vzestupnou alkoholovou řadou (70%, 80% a 100% ethanol), v každém roztoku byla skla 1 minutu. Dále bylo na každé sklíčko aplikováno 100 μ l RNázy A (Sigma-Aldrich, USA) (100 μ g/ml RNázy A ve 2x SSC) a preparáty byly překryty krycím sklíčkem. Ve vlhké komůrce byly inkubovány 1 hodinu ve 37 °C. Poté byla odstraněna krycí sklíčka a preparáty byly třikrát promývány ve 2x SSC, pokaždé po dobu 5 minut za stálého míchání v pokojové teplotě. Tímto krokem byla z preparátů odstraněna případná nežádoucí RNA.

Následně byla skla ponořena do 10 mM HCl, kde byla ponechána 20 minut při 37 °C, a poté opět promyta ve 2x SSC po dobu 3x 5 minut v pokojové teplotě. Takto byly ze vzorků odstraněny zbytky cytoplazmy.

Dalším krokem bylo ošetřování preparátu v 1% roztoku peroxidu vodíku po dobu 30 minut v pokojové teplotě. Poté byla skla opět promyta v 2x SSC (3x 5 minut, pokojová teplota).

Preparáty byly dále ponořeny do 5x Denhardtova roztoku (0,1% polyvinylpyrolidol; 0,1% BSA a 0,1% Ficoll 400) na 30 minut při 37 °C. Na ještě vlhká skla bylo nanášeno 50 μ l hybridizačního mixu (30 ng značené sondy v 50% deionizovaném formamidu a 5% dextran sulfátu v 2x SSC), preparáty byly překryty krycím sklem a denaturovány 5 minut při 70 °C na kovové plotýnce. Takto ošetřená skla byla ihned přenesena do vlhké komůrky, okraje krycích sklíček byly utěsněny lepidlem Fixogum rubber cement (Marabu, Německo) a vzorky byly inkubovány přes noc ve 37 °C.

Následující den byla odmyta nespecificky navázaná a nenavázaná sonda, za podmínek stanovených podle teploty tání sondy (T_m) a podle předpokládané homologie mezi sondou a repetitivy v genomu. Ke stanovení T_m byl použit vzorec:

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

příčemž n značí délku sondy v bazích (Sambrook 2001).

Preparáty byly zbaveny lepidla spolu s krycími sklíčky a promyty v 50% roztoku formamidu v 2x SSC 3x 5 minut při 42 °C za stálého míchání (za stálého míchání probíhaly i všechny následující promývací kroky). Při stejné teplotě byly dále promyty ve 2x SSC opět 3x 5 minut. Následovalo promytí v 0,1x SSC 3x 5 minut při 56 °C. Jako poslední promývací krok byla skla ponořena do roztoku 1x TNT (0,1 M Tris-HCl; 150 mM NaCl a 0,1% Tween 20) a promývána 5 minut při pokojové teplotě.

Na vlhká sklíčka bylo nanášeno 200 µl blokovacího pufru TNB (0,1 M Tris-HCl; 150 mM NaCl a 0,5% blokovacího činidla TSA Blocking reagent (PerkinElmer, USA)). Preparáty byly překryty krycím sklíčkem a inkubovány 45 minut ve vlhké komůrce při pokojové teplotě. Mezi tím byla protilátka (konjugovaná s křenovou peroxidázou) Anti-Digoxigenin-POD, Fab fragments (Roche Diagnostic, USA) naředěna s TNB pufrem v poměru 1:200 pro *Lc-P element* nebo 1:500 pro repetici *Lc-Ty3/Gypsy*. Po inkubaci bylo na každé sklíčko aplikováno 100 µl této směsi a po přikrytí krycím sklíčkem byla skla inkubována 1 hodinu ve vlhké komůrce při 37 °C. Poté byly preparáty opláchnuty cca 1 ml TNT a v tomto roztoku promyty 3x 5 minut při pokojové teplotě. Dále bylo se sklíčky pracováno výhradně v šeru. Na vlhká sklíčka bylo nanášeno 100 µl 2% roztoku tyramidu (TSA Plus Fluorescein system, PerkinElmer, USA) naředěného v dodaném „dilutant buffer“ v poměru 1:49. Preparáty byly zakryty krycím sklíčkem a inkubovány 15 minut ve vlhké komůrce při pokojové teplotě. Pak bylo každé sklíčko opláchnuto cca 1 ml TNT, a poté byla sklíčka promývána 3x 5 minut v TNT při pokojové teplotě. Dále byla skla na 1 minutu ponořena do 1% roztoku Ilfotolu (Ilford, Velká Británie).

Na oschlá skla bylo nanášeno 25 µl DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) (Sigma-Aldrich, USA) v DABCO (1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktan) (Sigma-Aldrich, USA) o koncentraci 1 µg/µl. Preparáty byly překryty krycím sklíčkem a přebytek aplikovaného roztoku byl vymačkáno do filtračního papíru. Okraje krycího sklíčka byly přetřeny lakem na nehty a vzorky byly skladovány při 4 °C ve tmě.

3.8.3. Pozorování a dokumentace výsledků

Chromozomální preparáty po provedené *in situ* hybridizaci byly pozorovány mikroskopem Zeiss Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss Jena, Německo) a dokumentovány černobílou kamerou Olympus CCD XM10 s programem cellSens Standard 1.9 (Olympus, Německo). Finální podoba snímků byla vytvořena programem Adobe Photoshop Elements 2020 složením a pseudo-obarvením fotografií.

3.9. Kvantitativní PCR

Metoda kvantitativní PCR (qPCR) byla použita ke zjištění počtu kopií mobilního elementu *Pd-Mariner* u druhů *Polyommatus dorylas*, *P. nivescens* a *P. thersites*. Templátem pro qPCR byla genomová DNA izolována kitem NucleoSpin DNA Insect (viz kapitolu 3.2.). Jako referenční gen byl zvolen gen *acetylcholinesteráza-2 (Ace-2)*, který se u studovaných modrásků vyskytuje v genomu pouze v jedné kopii. Primery pro amplifikaci mobilního elementu *Pd-Mariner* i *acetylcholinesterázy-2* byly navrženy pomocí programu Geneious, tak, aby měly stejnou nasedací teplotu a tvořily stejně dlouhé produkty (viz Tabulku 8). Tyto primery byly pořízeny od firmy Generi Biotech s.r.o. a jejich funkčnost byla ověřena pomocí PCR s OneTaq polymerázou (viz kapitolu 3.4.).

Tabulka 8: Primery použité pro qPCR.

Název primeru	Sekvence primeru	Ta [°C]	Délka produktu [bp]
q_ref_F	ATCCTGATCGACGACTGCAA	60	172
q_ref_R	GGAGAAACACACCGTCGACA		
q_Pd_Mariner_F	CCGCCGCTAGACTTTATCGT	60	172
q_Pd_Mariner_R	GCGACCTCTTGCAACACTTC		

Pro qPCR byly použity 96 jamkové destičky. U každého druhu byl proveden test účinnosti PCR na směsi genomové DNA ze tří jedinců daného druhu namíchané v poměru 1:1:1. Takto namíchaná DNA o koncentraci 5 ng/μl pak byla naředěna 5x, 25x a 125x. Jednotlivé reakce ředící řady byly provedeny v technických triplikátech. Reakce pro zjištění relativního počtu kopií studované sekvence, byly prováděny v biologických a technických triplikátech. Jedna reakce o objemu 10 μl obsahovala 5 ng templátové DNA; 0,8 μM každého primeru a 1x Xceed qPCR SG 2x mix Lo-ROX (Institute of Applied Biotechnologies, Praha, Česká republika). U druhu *P. nivescens* nebyla dostupná DNA o dostatečně vysoké koncentraci, a proto byla použita koncentrace: 5 ng/μl u jedince č. 1, u jedince 2 byla koncentrace DNA pod rozlišovací limit přístroje Qubit 3.0 při použití kitu Qubit dsDNA BR Assay Kit a 2 μl měřené DNA. Přítomnost DNA však prokázala PCR s primery pro 18S rDNA. U jedince 3 byla koncentrace DNA 1,155 ng/μl. Tato DNA byla smíchána v poměru objemů 1:1:1 pro přípravu ředící řady. Pro test účinnosti i pro analýzu množství kopií v genomu byly u tohoto druhu použity 2 μl DNA na 1 reakci.

Test účinnosti PCR i samotný experiment probíhaly vždy souběžně na jedné destičce, a to s primery pro studovaný element i s primery pro referenční gen *Ace-2*. Do jamek byla

vždy nejprve napipetována DNA, a poté mix obsahující ostatní složky reakce. Takto připravená destička byla přelepena krycí fólií, krátce centrifugována a vložena do přístroje C1000 Thermal cycler CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, USA), kde probíhala samotná reakce takto: počáteční denaturace při 95 °C po dobu 3 minuty, poté následovalo 40 cyklů počínajících denaturací při 94 °C po dobu 10 sekund, nasedání primerů a elongace při 60 °C 30 sekund. Po každém cyklu bylo detekováno množství fluorescence v jamkách, a tedy množství DNA. Následně byla provedena analýza tání dvoušroubovice DNA postupným zvyšováním teploty z 55 °C na 95 °C (po 0,5 °C). Pořízená křivka tání byla použita k detekci případných nežádoucích produktů, např. tzv. „primer-dimer“ nebo jiných nespecifických produktů PCR. Získané výsledky byly vyhodnoceny v programu Bio-Rad CFX Manager 3.0 a v Microsoft Office Excel Professional Plus 2016.

Z ředící řady byla stanovena účinnost reakcí a její hodnota byla využita při stanovení relativního počtu kopií repetic *Pd-Mariner* s využitím vzorce:

$$R = ((1 + E_{\text{ref}})^{C_{\text{ref}}}) / ((1 + E_{\text{mariner}})^{C_{\text{mariner}}}),$$

kde R je relativní počet kopií studovaného mobilního elementu, E je rovno vypočtené účinnosti reakce a Ct je cyklus, v němž došlo k překročení prahové hodnoty. Dolní index „ref“ značí referenční gen *Ace-2*, „mariner“ je index pro studovaný mobilní element.

4. Výsledky

4.1. Klonování mobilních elementů

Všechny zvolené mobilní elementy se podařilo zaklonovat a osekvenovat. Sekvence byly zpracovány v programu Geneious 11.1.4 a porovnány s konsensus sekvencí získanou z analýz pomocí programu RepeatExplorer. Průměrná identita klonů s konsensus sekvencí byla 96,1 % a identita s konsensus sekvencí pro jednotlivé mobilní elementy je uvedena v Tabulce 9. Oba sekvenované klony repetice *Pd-Mariner* měly stejnou identitu s konsensus sekvencí, stejně jako klony repetice *Lc-P element*. Sekvence klonů použitých pro přípravu sond na TSA-FISH jsou uvedeny v Příloze I.

Tabulka 9: Přehled zaklonovaných mobilních elementů u studovaných druhů modrásků.

Druh	Mobilní element	Identita s konsensus sekvencí [%]
<i>Polyommatus dorylas</i>	<i>BEL/Pao</i>	98,1–99,2
	<i>Mariner</i>	98,95
<i>Polyommatus ripartii</i>	<i>Mariner</i>	95,3–96,7
	<i>Ty3/Gypsy</i>	95,2–95,3
<i>Lysandra coridon</i>	<i>P element</i>	99,8
	<i>Ty3/Gypsy</i>	91,1–99,5

4.2. Analýza přítomnosti mobilních elementů u příbuzných druhů modrásků

Pro ověření přítomnosti studovaných mobilních elementů u příbuzných druhů modrásků byla použita metoda PCR. Jako vnitřní pozitivní kontrola byla amplifikována část genu pro 18S rRNA. Pro každý master mix byla připravena i negativní kontrola. Výsledky provedené analýzy jsou shrnuty v Tabulce 10 (fotografie gelů z elektroforézy produktů PCR jsou v Příloze II).

Tabulka 10: Výsledky analýzy studovaných mobilních elementů u vybraných druhů modrásků. Ve sloupci označeném **n**, je zapsán haploidní počet chromozomů daného druhu. Symbol * značí, že studovaný element byl u daného vzorku detekován, **0** značí, že nikoli.

		<i>Pd- BEL/Pao</i>	<i>Pd- Mariner</i>	<i>Pr- Mariner</i>	<i>Pr- Ty3/Gypsy</i>	<i>Lc- P element</i>	<i>Lc- Ty3/Gypsy</i>
Druh	n						
<i>P. icarus</i>	23	0	0	*	0	0	*
<i>P. celina</i>	?	0	0	*	0	0	*
<i>P. dorylas 1</i>	148–150	*	*	*	0	0	*
<i>P. dorylas 2</i>	148–150	*	*	*	0	0	*
<i>P. nivescens 1</i>	190–191	*	*	*	0	0	*
<i>P. nivescens 2</i>	190–191	*	*	*	0	0	*
<i>P. nivescens 3</i>	190–191	*	*	*	0	0	*
<i>P. thersites 1</i>	24	0	*	*	0	0	*
<i>P. thersites 2</i>	24	0	*	*	0	0	*
<i>P. thersites 3</i>	24	0	*	*	0	0	*
<i>P. daphnis</i>	23	0	0	*	*	0	*
<i>P. amandus</i>	22–24	0	*	*	*	0	*
<i>P. escheri 1</i>	23	0	0	0	0	0	*
<i>P. escheri 2</i>	23	0	0	0	0	0	*
<i>P. escheri 3</i>	23	0	0	0	0	0	*
<i>P. stempfferi 1</i>	23	0	0	0	0	0	0
<i>P. stempfferi 2</i>	23	0	0	0	0	0	0
<i>P. stempfferi 3</i>	23	0	0	0	0	0	0
<i>P. ripartii 1</i>	90	0	*	*	*	0	0
<i>P. ripartii 2</i>	90	0	0	*	*	0	0
<i>P. ripartii 3</i>	90	0	0	*	*	0	*
<i>P. fulgens 1</i>	108–110	0	0	*	*	0	0
<i>P. fulgens 2</i>	108–110	0	*	*	0	0	0
<i>P. fulgens 3</i>	108–110	0	*	*	*	0	0
<i>L. coridon</i>	86–92	0	0	0	0	*	*
<i>L. hispana</i>	84	0	0	0	0	*	*
<i>L. bellargus</i>	45	0	0	0	0	*	*
<i>L. punctifera</i>	24	0	0	0	0	0	0

U druhů, kde bylo k dispozici více jedinců, byla analýza pomocí PCR provedena na více různých genomových DNA. Díky tomu byla odhalena vnitrodruhová variabilita u *P. ripartii* ve výskytu repetice *Pd-Mariner* a *Lc-Ty3/Gypsy*. U druhu *P. fulgens* byla nalezena vnitrodruhová variabilita v přítomnosti mobilního elementu *Pd-Mariner* a *Pr-Ty3/Gypsy*.

U druhů, kde byly dříve repetice analyzovány pomocí programu RepeatExplorer, se výsledky bioinformatické a PCR analýzy většinou shodují. Jedinou výjimkou je

přítomnost elementu *Pd-Mariner* u *P. thersites*. Až na *Pd-BEL/Pao* a *Lc-P element* však repetice byly nalezeny u dalších druhů modrásků, které nebyly zahrnuty v původní bioinformatické studii.

Element *Pd-Mariner* byl programem RepeatExplorer nalezen jen u druhů *P. dorylas* a *P. nivescens*. U referenčního druhu *P. thersites* tuto repetici nedetekoval. Analýza pomocí PCR však amplifikovala element *Pd-Mariner* u všech tří zmíněných druhů, a také u *P. amandus*, jednoho jedince *P. ripartii* (*P. ripartii* 1) a u dvou jedinců *P. fulgens* (*P. fulgens* 2, *P. fulgens* 3), viz Tabulku 10. Kvůli rozporům mezi výsledky analýz pomocí programu RepeatExplorer a metodou PCR byl počet kopií elementu *Pd-Mariner* u druhů *P. dorylas*, *P. nivescens* a *P. thersites* testován pomocí qPCR (viz kapitolu 4.5.) a u *P. thersites* bylo Sangerovým sekvenováním ověřeno, že byl skutečně amplifikován element *Pd-Mariner*.

Mobilní element *Pr-Mariner* byl dle očekávání nalezen u všech jedinců *P. ripartii* a *P. fulgens* a nebyl detekován u druhu *P. escheri*. Zároveň byl ale nalezen i u celého dalšího kladu tvořeného druhu: *P. icarus*, *P. celina*, *P. dorylas*, *P. nivescens*, *P. thersites*, *P. daphnis* a *P. amandus*.

Repetice *Pr-Ty3/Gypsy* měla být podle bioinformatické analýzy přítomná u *P. ripartii* a *P. fulgens*. Metoda PCR však tento element nenalezla u jednoho ze tří použitých jedinců *P. fulgens* (*P. fulgens* 2, viz Tabulku 10). U referenčního druhu *P. escheri* tato repetice nalezena nebyla, stejně jako při bioinformatické analýze, naopak pomocí PCR byl element *Pr-Ty3/Gypsy* nalezen i u druhů *P. daphnis* a *P. amandus* ze sesterského kladu.

Repetice *Lc-Ty3/Gypsy* byla nalezena u *L. coridon*, *L. bellargus* a *L. hispana*, což je výsledek shodný s analýzou pomocí programu RepeatExplorer. Element *Lc-Ty3/Gypsy* byl dále nalezen i u druhů: *P. icarus*, *P. celina*, *P. dorylas*, *P. nivescens*, *P. thersites*, *P. daphnis*, *P. amandus*, *P. escheri* a také u jednoho ze tří jedinců *P. ripartii* (*P. ripartii* 3, viz Tabulku 10).

4.3. Analýza přítomnosti repetic u vybraných druhů mravenců

U některých druhů modrásků je známo, že jejich housenky jsou myrmekofilní (Pierce a kol., 2002), proto bylo zkoumáno, zda se u mravenců nevyskytují stejné mobilní elementy jako u modrásků. Mezi druhy by totiž mohlo dojít k horizontálnímu přenosu genů. Bylo analyzováno celkem 13 druhů mravenců pomocí PCR. U žádného ze studovaných mravenců nebyl nalezen žádný z analyzovaných mobilních elementů (viz fotografie gelů v Příloze III).

4.4. Lokalizace mobilních elementů *Lc-P element* a *Lc-Ty3/Gypsy* na chromozomech

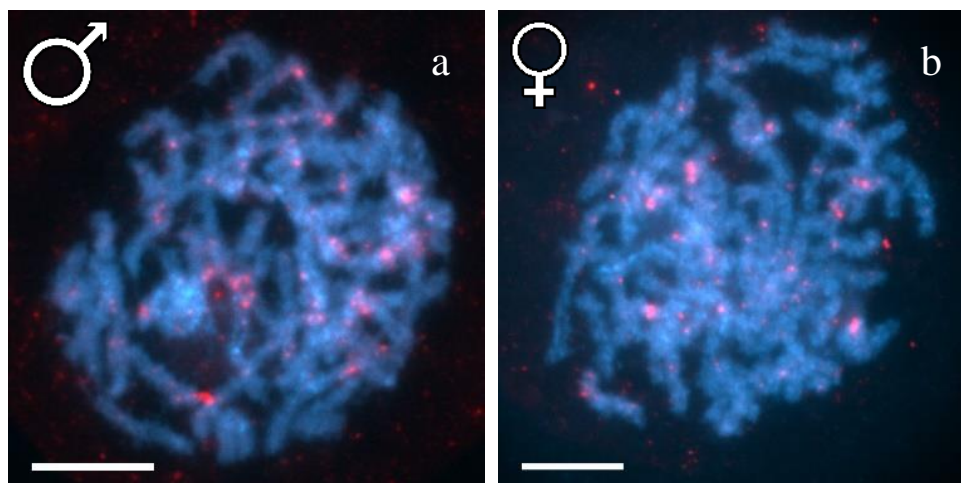
Pro lokalizaci vybraných mobilních elementů byla použita metoda fluorescenční *in situ* hybridizace s tyramidovou amplifikací signálu (TSA-FISH). Pro vizualizaci repetice byly v naší laboratoři dostupné chromozomální preparáty pouze z druhů *L. bellargus* a *L. coridon*, na ostatních studovaných druzích tedy TSA-FISH provedena nebyla.

Lc-P element byl u *L. bellargus* lokalizován průměrně ve 42,306 hybridizačních signálech v jednom jádře (Tabulka 11), celkem byly spočítány signály u 49 jader, a to u jednoho samce a dvou samic. Dvě jádra ukazuje Obrázek 3.

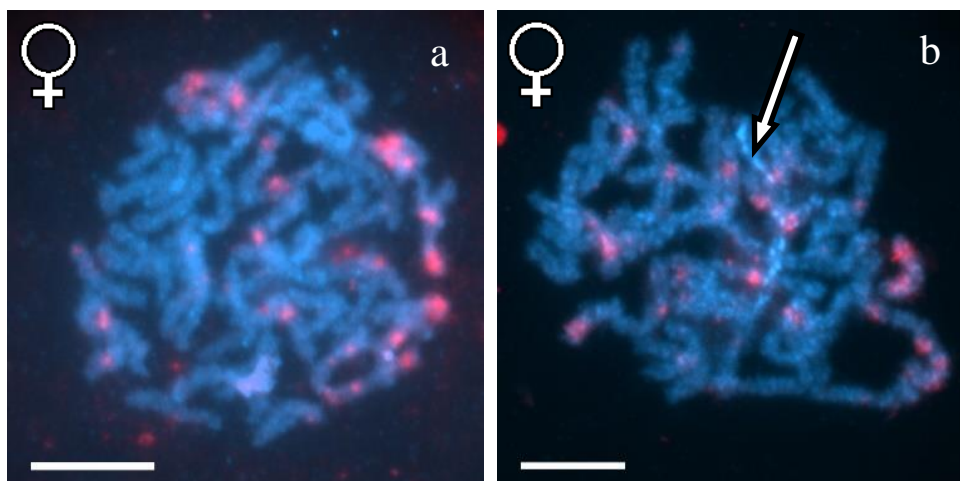
Mobilní element *Lc-Ty3/Gypsy* se u druhu *L. bellargus* vyskytuje průměrně ve 26,511 signálech v jednom jádře (Tabulka 11). Vyhodnoceno bylo 47 jader ze dvou samců a dvou samic. Dvě jádra jsou na Obrázku 4.

Lc-P element byl u druhu *L. coridon* detekován v jednom jádře průměrně ve 31,846 signálech (Tabulka 11). Signály byly spočítány u 39 jader z jednoho samce a tří samic. Dvě jádra jsou na Obrázku 5.

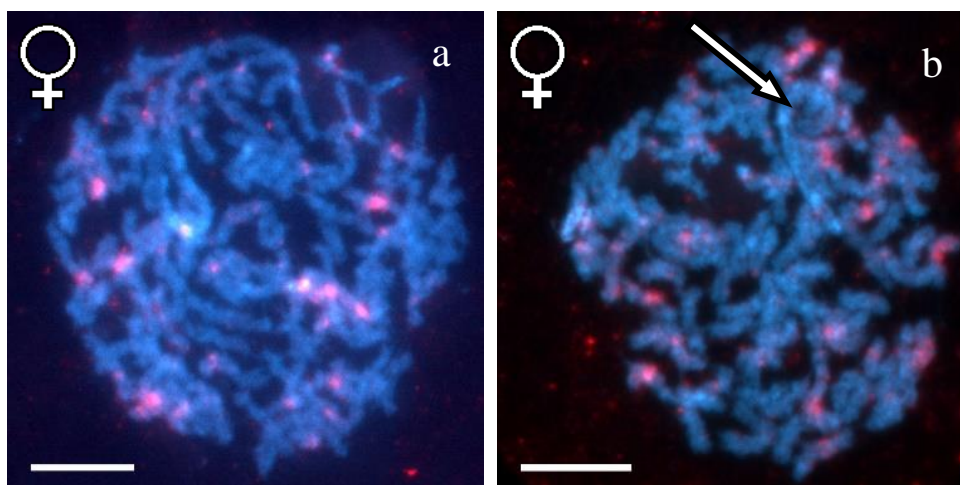
Element *Lc-Ty3/Gypsy* se u druhu *L. coridon* vyskytuje průměrně ve 43,000 hybridizačních signálech (Tabulka 11). Signály byly spočítány u 60 jader ze dvou samic. Navíc se tento element výrazně akumuluje po celé délce jednoho autozomu (Obrázek 6a).



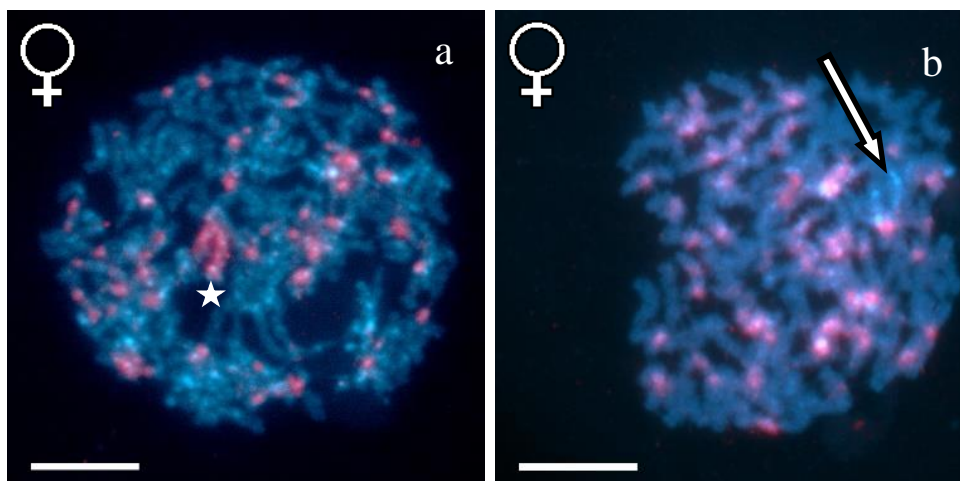
Obrázek 3: Výsledky FISH se sondou pro *Lc-P element* na chromozomálních preparátech samce a samice *Lysandra bellargus*. Chromozomy pachytenních jader jsou obarveny DAPI (modrá), hybridizační signály jsou pseudo-obarveny červeně, měřítko odpovídá 10 μm .



Obrázek 4: Výsledky FISH se sondou pro *Lc-Ty3/Gypsy* na pachytenních jádrech ze samic *Lysandra bellargus*. Šipka na obrázku **b** označuje pohlavní chromozom W. Chromozomy jsou obarveny DAPI (modrá), hybridizační signály jsou pseudo-obarveny červeně, měřítko odpovídá 10 μm .



Obrázek 5: Výsledky FISH se sondou pro *Lc-P element* na pachytenních jádrech ze samic *Lysandra coridon*. Šipka na obrázku **b** označuje pohlavní chromozom W. Chromozomy jsou obarveny DAPI (modrá), hybridizační signály jsou pseudo-obarveny červeně, měřítko odpovídá 10 μm .



Obrázek 6: Výsledky FISH se sondou pro *Lc-Ty3/Gypsy* na pachytenních jádrech ze samic *Lysandra coridon*. Hvězdička na obrázku **a** označuje autozom, který akumuluje mobilní element *Lc-Ty3/Gypsy* po celé své délce. Šipka na obrázku **b** označuje pohlavní chromozom W. Chromozomy jsou obarveny DAPI (modrá), hybridizační signály jsou pseudo-obarveny červeně, měřítko odpovídá 10 μ m.

Tabulka 11: Počty signálů u jednotlivých druhů a elementů.

	<i>Lysandra bellargus</i>		<i>Lysandra coridon</i>	
	<i>Lc-P element</i>	<i>Lc-Ty3/Gypsy</i>	<i>Lc-P element</i>	<i>Lc-Ty3/Gypsy</i>
Průměr	42,306	26,511	31,846	43,000
Směrodatná odchylka	7,332	3,797	3,873	5,030

Lc-P element vykazuje četnější výskyt u druhu *L. bellargus*, zatímco repetice *Lc-Ty3/Gypsy* je četnější u druhu *L. coridon*. Tyto transpozony se v genomu vyskytují na různých místech a některé chromozomy neobsahují studované repetice vůbec. Pokud byl daný element na chromozomu detekován, většinou se jednalo o jeden intersticiální hybridizační signál, vzácněji obsahoval jeden chromozom hybridizačních signálů více (maximálně tři). Přestože u motýlů jsou mobilní elementy typickou složkou pohlavního chromozomu W, nevykazují zkoumané repetice akumulaci na tomto chromozomu.

4.5. qPCR

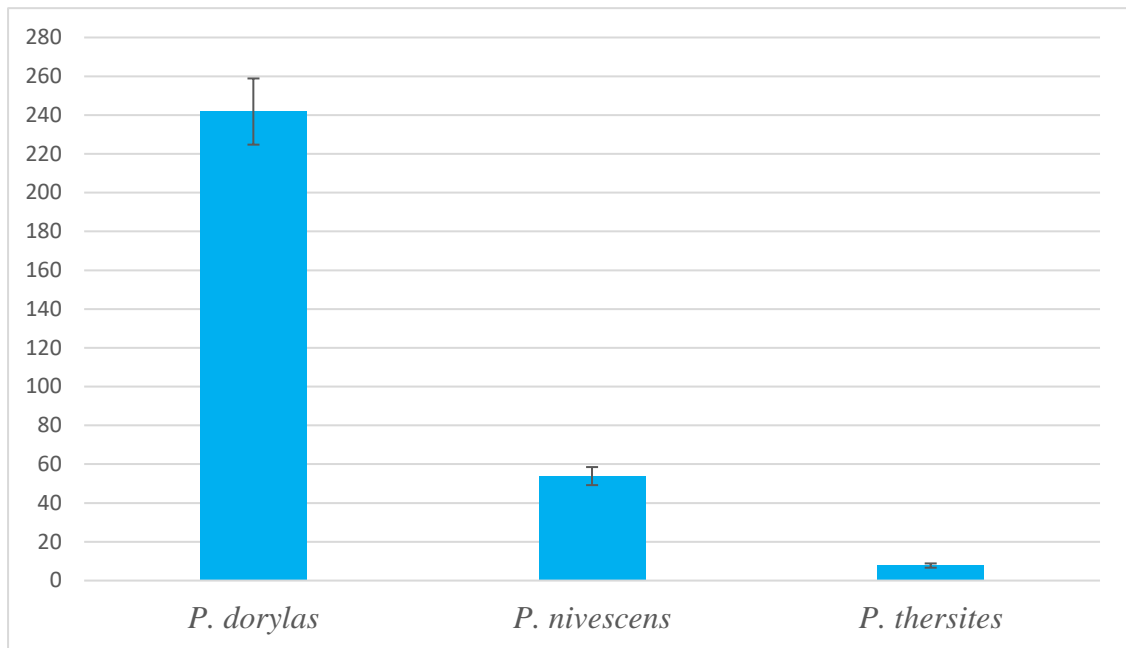
Na základě výsledků provedené detekce mobilních elementů pomocí PCR byla provedena také kvantitativní PCR, která umožňuje odhadnout relativní počet kopií studovaných repetit v genomu studovaného organismu. Analýza metodou PCR totiž odhalila element *Pd-Mariner* u druhů *Polyommatus dorylas*, *P. nivescens*, *P. thersites*, zatímco bioinformatická analýza předpokládala jeho výskyt jen u druhů *P. dorylas* a *P. nivescens*. Metoda qPCR byla použita za účelem zjištění abundance elementu *Pd-Mariner* u druhu *P. thersites* ve srovnání s ostatními druhy.

Po proběhnutí samotné qPCR byla vždy provedena analýza křivky tání, která prokázala amplifikaci jediného produktu. Účinnost jednotlivých reakcí byla 82,7–92,7 % (Tabulka 12) a byla použita při stanovení relativního počtu kopií repetice *Pd-Mariner* v genomech studovaných modrásků. Pro výpočet byl použit vzorec uvedený v kapitole 3.9.

Stanovený relativní počet kopií repetice *Pd-Mariner* v haploidním genomu byl: 242 kopií u druhu *P. dorylas*, 54 kopií u *P. nivescens* a 8 kopií u druhu *P. thersites* (Tabulka 12 a Obrázek 7).

Tabulka 12: Relativní počet kopií elementu *Pd-Mariner* stanovený na základě výsledků qPCR.

Druh	Vzorek I	Vzorek II	Vzorek III	Účinnost u referenčního genu [%]	Účinnost u studovaného elementu [%]	Průměr	Směrodatná odchylka
<i>P. dorylas</i>	217,748	255,428	252,253	83,100	91,000	241,810	17,063
<i>P. nivescens</i>	60,321	49,517	51,748	82,700	87,600	53,862	4,657
<i>P. thersites</i>	8,885	6,256	8,081	92,700	92,000	7,740	1,100



Obrázek 7: Graf znázorňující výsledky kvantitativní PCR pro mobilní element *Pd-Mariner*. Na svislé ose jsou relativní počty kopií repetice *Pd-Mariner*. Výška sloupců odpovídá průměru vypočítanému z hodnot naměřených u tří jedinců daného druhu. Chybové úsečky na sloupcích znázorňují směrodatnou odchylku.

5. Diskuze

Cílem této bakalářské práce bylo zkoumat možný vliv mobilních elementů na chromozomální rozpady u modrásků rodů *Polyommatus* a *Lysandra*. Mobilní elementy se mohou podílet na chromozomálních přestavbách (Klein a O'Neill, 2018), což bylo v rámci hmyzu zjištěno například u zástupců rodu *Drosophila* (Lim a Simmons, 1994; Evgen'ev a kol., 2000). Také u modrásků bylo navrženo, že transpozony mohou způsobovat genomovou nestabilitu (diskutováno v Kandul a kol., 2004).

5.1. Analýza mobilních elementů u vybraných druhů modrásků a mravenců

U jednotlivých linií modrásků byly bioinformaticky vybrány repetice, které se zdají být přítomny jen u druhů s vysokým počtem chromozomů (viz kapitolu 1.4.). Bioinformatická analýza pomocí programu RepeatExplorer byla však provedena jen na omezeném počtu druhů modrásků, a proto byly v této práci nejen ověřovány výsledky této analýzy, ale byla také zjišťována přítomnost studovaných transpozonů i u dalších příbuzných druhů. Účelem bylo zjistit, zda se studované repetice vyskytují specificky jen u modrásků s vysokým počtem chromozomů v dané linii i při studiu většího počtu druhů. Takový výsledek by naznačoval, že přítomnost mobilních elementů může mít vliv na fragmentaci karyotypu a evoluci modrásků.

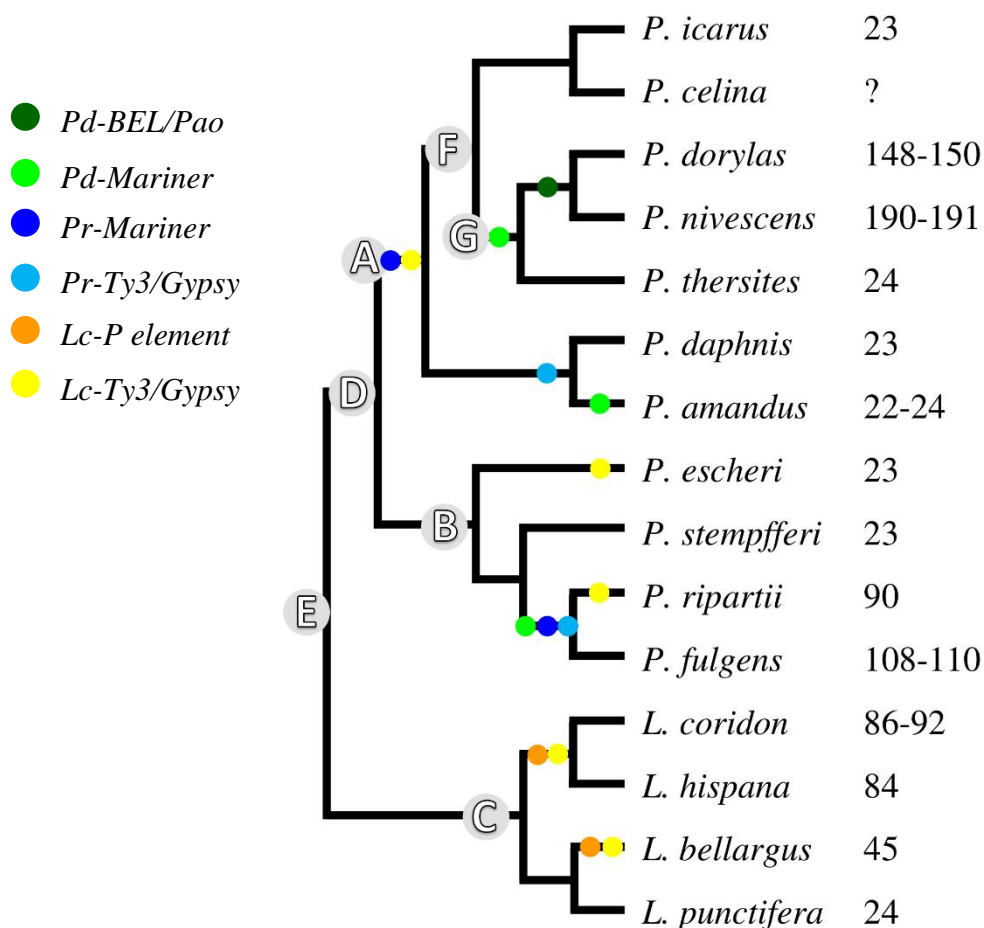
K tomuto účelu byla použita metoda PCR, která je dostatečně citlivá, aby odhalila mobilní elementy i pokud jsou v genomu přítomny jen v několika málo kopiích. Výsledky provedené analýzy (Tabulka 10) mohou posloužit také k odhadnutí, kdy během evoluce studovaných modrásků došlo ke zisku či ztrátě daného mobilního elementu.

Analýza pomocí PCR potvrdila výsledky získané v programu RepeatExplorer v rámci druhů testovaných oběma přístupy, až na případ elementu *Pd-Mariner* (viz kapitolu 4.2. a 4.5.). Tato repetice se v rámci prvního kladu nachází u druhů *P. dorylas* ($n = 148-150$), *P. nivescens* ($n = 190-191$), *P. thersites* ($n = 24$) a *P. amandus* ($n = 22-24$) (Obrázek 8), což jsou druhy, které mají jak vysoký, tak nízký počet chromozomů, takže element *Pd-Mariner* u těchto druhů pravděpodobně nemá vliv na fragmentaci karyotypu. Protože program RepeatExplorer nedetekoval element *Pd-Mariner* u *P. thersites*, byla provedena analýza počtu kopií daného elementu metodou qPCR. Ta ukázala, že se tento element vyskytuje v genomu *P. thersites* pouze v několika málo kopiích, a proto nebyl detekován při bioinformatické analýze. Tato analýza byla totiž provedena na sekvenačních čteních odpovídající méně než jednomu ekvivalentu genomu a při náhodném výběru sekvenačních čtení pro analýzu je velká šance, že sekvence, které se v genomu vyskytují v několika málo kopiích nebudou vybrány

nebo budou ve výběru podreprezentovány. Zajímavý je také výskyt elementu *Pd-Mariner* u druhu *P. amandus*. Jedním z možných vysvětlení je, že sem byl přenesen například horizontálním přenosem nebo mezidruhovým křížením od skupiny se společným předkem G (Obrázek 8). U druhého kladu se element *Pd-Mariner* nachází pouze u druhů s vysokým počtem chromozomů: *P. ripartii* (n = 90) a *P. fulgens* (n = 108–110) (Obrázek 8), takže zde by tento mobilní element mohl mít vliv na počet chromozomů. V bioinformatické analýze však tento element nebyl u druhů *P. ripartii* a *P. fulgens* detekován. Z toho lze usuzovat, že se tato repetice nachází v genomech zmíněných druhů jen v málo kopiích, a proto nebyla odhalena programem RepeatExplorer, stejně jako u *P. thersites*. Kromě důvodů zmíněných výše zde může hrát roli i fakt, že při bioinformatické analýze byly hodnoceny jen sekvence, které představují alespoň 0,01 % analyzovaných sekvenačních čtení. Distribuce repetice *Pd-Mariner* by šla vysvětlit i její přítomností u společného předka D (Obrázek 8) a její následnou ztrátou v minimálně čtyřech nezávislých případech.

Repetice *Pr-Mariner* se v rámci druhého kladu, kde byla objevena, nachází pouze u druhů s vysokým počtem chromozomů: *P. ripartii* (n = 90) a *P. fulgens* (n = 108–110) (Obrázek 8), takže tato repetice by mohla mít vliv na fragmentaci karyotypu. Nicméně element *Pr-Mariner* se nachází také u všech druhů se společným předkem A (Obrázek 8). To by mohlo naznačovat, že tento element se mohl objevit u společného předka rodu *Polyommatus* (znázorněn písmenem D) a později se dvakrát nezávisle ztratil u druhů *P. escheri* (n = 23) a *P. stempfferi* (n = 23). Druhou možností je, že element *Pr-Mariner* byl přenesen horizontálním přenosem nebo mezidruhovým křížením od některého z druhů se společným předkem A ke společnému předkovi druhů *P. ripartii* a *P. fulgens*.

Mobilní element *Pd-BEL/Pao* se nachází pouze u druhů *P. dorylas* (n = 148–150) a *P. nivescens* (n = 190–191) (Obrázek 8), což jsou druhy, které mají v rámci prvního kladu nejvíce chromozomů. To naznačuje, že element *Pd-BEL/Pao* by u těchto druhů mohl způsobovat fragmentaci karyotypu.



Obrázek 8: Znázornění přítomnosti mobilních elementů v kladogramu studovaných modrásků. (Kladogram byl sestaven na základě poskytnutých výsledků fylogenetické analýzy od Vila a kol., nepublikováno.) Barevná kolečka znázorňují přítomnost mobilních elementů (viz vysvětlivky v levé části). Písmena znázorňují společného předka dané skupiny. Čísla napravo odpovídají haploidnímu počtu chromozomů u daného druhu (Kandul a kol., 2004; Wiemers a kol., 2010; Talavera a kol., 2013; Vershinina a Lukhtanov, 2017).

Repetice *Pr-Ty3/Gypsy* se v rámci druhého kladu, kde byla objevena (společný předek B), nachází pouze u druhů s vysokým počtem chromozomů: *P. ripartii* ($n = 90$) a *P. fulgens* ($n = 108-110$) (Obrázek 8), takže u této skupiny by element *Pr-Ty3/Gypsy* mohl mít vliv na fragmentaci karyotypu. Tento element se kromě zmíněných druhů nachází také v genomu *P. daphnis* ($n = 23$) a *P. amandus* ($n = 22-24$) (Obrázek 8). Tyto druhy patří do prvního kladu a zdá se, že zde výskyt repetice *Pr-Ty3/Gypsy* nijak nekoreluje s počtem chromozomů. I v tomto případě se mohl element objevit u jedné ze skupin a do druhé být poté přenesen. Další možností je varianta, že element *Pr-Ty3/Gypsy* vznikl u společného předka D (Obrázek 8). V takovém případě by musely následovat tři nezávislé ztráty tohoto elementu, a to u společného předka F, u *P. escheri* a *P. spempfferi* (Obrázek 8).

Obě repetice *Lc-P element* a *Lc-Ty3/Gypsy* se v rámci třetího kladu nachází pouze u druhů s vysokým počtem chromozomů: *L. coridon* (n = 86–92), *L. hispana* (n = 84) a *L. bellargus* (n = 45) (Obrázek 8), takže i v tomto případě mohou mít mobilní elementy vliv na počet chromozomů. *Lc-P element* možná vznikl u společného předka *L. coridon* a *L. hispana*, a poté byl přenesen k *L. bellargus*. K tomu mohlo dojít například mezidruhovým křížením, které bylo dokumentováno mezi *L. coridon* a *L. bellargus* (Talavera a kol., 2013). Nebo mohl vzniknout u společného předka celého kladu (v Obrázku 8 označen jako C) a následně vymizet u *L. punctifera*. Repetice *Lc-Ty3/Gypsy* se navíc nachází u celého prvního kladu a také u *P. escheri* (n = 23) a *P. ripartii* (n = 90) z druhého kladu (viz Obrázek 8). Zde by bylo asi nejpravděpodobnější, že tento element se nacházel u společného předka všech zkoumaných modrásků (v Obrázku 8 vyznačen jako E) a postupně se ztratil u *P. stempfferi*, *P. fulgens* a *L. punctifera*.

Studované repetice vykazovaly obecně mozaikovitou distribuci v rámci fylogenetických vztahů modrásků rodů *Polyommatus* a *Lysandra*. Podobné výsledky byly získány např. u fylogenetické distribuce mobilních elementů u ryb (Shao a kol., 2019). Tato distribuce se sice dá vždy vysvětlit přes přítomnost dané repetice u společného předka a její ztrátu v některých liniích. U některých ze zkoumaných repetic by to však vyžadovalo poměrně velké množství nezávislých událostí. Jako pravděpodobné se tedy zdá, že roli v evoluci repetic u modrásků bude hrát jejich horizontální přenos a mezidruhové křížení, které bylo dokumentováno například u rodu *Lysandra* (Talavera a kol., 2013), takže je možné, že k němu dochází i u jiných druhů modrásků.

Horizontální přenos mobilních elementů byl již pozorován u některých druhů hmyzu. Studie z roku 2017 analyzovala 13 řádů hmyzu a objevila, že průměrně 2,08 % genomu je odvozeno od mobilních elementů získaných horizontálním přenosem během posledních 10 milionů let. Nejvíce takových mobilních elementů bylo nalezeno u bodalky stájové (*Stomoxys calcitrans*), kde představují 24,6 % genomu (Peccoud a kol., 2017). Při jiné studii z roku 2019 bylo zjištěno, že mobilní elementy z nadrodin *Copia*, *Jockey* a *Mariner* získané horizontálním přenosem se výrazně akumulují u řádu Lepidoptera oproti jiným zkoumaným řádům patřícím mezi členovce (Arthropoda). U retrotranspozonů z nadrodiny *Jockey* bylo nalezeno výrazně méně událostí horizontálního přenosu než u zbývajících dvou nadrodin. To může naznačovat, že RNA transpozony se přenášejí méně než DNA transpozony, protože RNA intermediát je méně stabilní. Jedním z možných vysvětlení, proč bylo u řádu Lepidoptera pozorováno výrazně více událostí horizontálního přenosu mobilních elementů je, že k přenosu repetit dochází přes nějaký vektor. Tím by mohly být DNA viry bakuloviry, které se běžně

nachází u řádu Lepidoptera, ale u jiných řádů jsou vzácné (Reiss a kol., 2019). V genomech některých motýlů a můr byly nalezeny sekvence pocházející od bakulovirů a některé původní integrované sekvence byly upraveny a poskytují určitou ochranu proti patogenům. Ke zdokumentovanému horizontálnímu přenosu mobilních elementů v rámci řádu Lepidoptera došlo mezi rody *Bombyx* a *Maculinae* (Novikova a kol., 2007; Sormacheva a kol., 2012) a také mezi černopáskou bavlníkovou (*Helicoverpa armigera*) a mšicí bavlníkovou (*Aphis gossypii*) (Wang a kol., 2012).

K horizontálnímu přenosu může také dojít mezi parazitoidem a jeho hostitelem, jak bylo ukázáno například u parazitoidní vosičky *Ascogaster reticulatus* a jejího hostitele *Adoxophyes honmai* (Yoshiyama a kol., 2001). Bylo by dobré zjistit, zda se mobilní elementy studované v této práci nachází u parazitoidů zkoumaných modrásků. V naší laboratoři bohužel nebyly k dispozici vzorky parazitoidů pro takovou analýzu.

Dalším potenciálním zdrojem pro horizontální přenos mobilních elementů mohou být mravenci, kde byl tento proces zaznamenán například u *Solenopsis invicta* (Lee a Wang, 2018). Většina zástupců čeledi modráskovití (Lycaenidae) má určité spojení s mravenci, které může být fakultativní nebo obligátní (Pierce a kol., 2002). V rámci této bakalářské práce však studované transpozony nebyly nalezeny u žádného z 13 druhů testovaných mravenců, a zdá se tedy, že mezi těmito mravenci a studovanými modráskami nedochází k horizontálnímu přenosu genů pro analyzované repetice. Nicméně by mohlo být přínosné otestovat stejným způsobem i další druhy mravenců.

Co se týče potenciálního vlivu zkoumaných mobilních elementů na fragmentaci genomu u modrásků, lze tento vliv na základě prezentovaných výsledků (viz kapitulu 4.2., Tabulku 10) zamítnout pouze u repetice *Pd-Mariner*, která byla v rámci jednoho kladu nalezena u druhů s vysokým i nízkým počtem chromozomů. Ostatní elementy byly nalezeny (alespoň v rámci jednoho kladu) specificky pouze u druhů s fragmentovaným karyotypem. Některé transpozony byly sice u sesterských skupin nalezeny i u modrásků s nízkým počtem chromozomů, nicméně pokud ve fylogenetické distribuci studovaných elementů hraje roli mezidruhové křížení a horizontální přenos, tak toto zjištění nevyvrací hypotézu o vlivu repetice na fragmentaci genomu. Transposon, který se dostane do nového genomu, totiž uniká hostitelovým obranným mechanismům a může tak způsobit nestabilitu karyotypu (Drezen a kol., 2017). U rodu *Drosophila* bylo navíc prokázáno, že mezidruhové křížení může zvýšit rychlost transpozice, jelikož u hybridů je snížena metylace DNA, což může způsobit nižší kontrolu mobilních elementů (Labrador a kol., 1999; Fontdevila, 2005).

Výsledky PCR analýzy také odhalily možnou vnitrodruhovou variabilitu u tří zkoumaných mobilních elementů: *Lc-Ty3/Gypsy*, *Pd-Mariner* a *Pr-Ty3/Gypsy* (viz kapitolu 4.2., Tabulku 10). Je možné, že u *P. ripartii* právě dochází ke ztrátě nebo zisku elementu *Lc-Ty3/Gypsy*, jelikož byl nalezen pouze u jednoho ze tří analyzovaných jedinců. Stejně je to i s elementem *Pd-Mariner* u *P. ripartii*. U tohoto elementu byla nalezena také vnitrodruhová variabilita u *P. fulgens*. Element byl nalezen pouze u dvou jedinců ze tří testovaných a stejně je to i s elementem *Pr-Ty3/Gypsy* u *P. fulgens*. Je tedy možné, že právě probíhá nějaký evoluční proces, který povede buďto k zafixování těchto elementů, nebo k jejich ztrátě. Jenou z možností také je, že u některých jedinců nebyly zmíněné repetice nalezeny, protože u nich došlo ke změně nebo ztrátě sekvence, na kterou byly navrženy primery, ale jiná část elementu může být v genomu přítomna. Podobný výsledek byl získán při analýze repetice *Ty* v genomech 41 dostupných kmenů *Saccharomyces cerevisiae* (Bleykasten-Grosshans a kol., 2013).

5.2. Lokalizace repetice *Lc-P element* a *Lc-Ty3/Gypsy* na chromozomech

Dalším z cílů této práce bylo lokalizovat vybrané mobilní elementy na chromozomech. Účelem bylo zjistit, zda se tyto elementy akumulují například na pohlavních chromozomech, nebo zda jsou rozmístěny rovnoměrně na většině chromozomů.

Oba vizualizované elementy se v genomech *L. coridon* a *L. bellargus* nachází na různých místech a některé chromozomy studované repetice vůbec neobsahují. Elementy vykazují podobnou distribuci na chromozomech obou studovaných druhů a podobný je i počet signálů (viz kapitolu 4.4. – Obrázky: 3, 4, 5 a 6 a Tabulku 11). Nejvyšší směrodatnou odchylku mají data získaná u druhu *L. bellargus* při detekci *Lc-P elementu* (Tabulka 11). To je zřejmě způsobeno tím, že se na chromozomech nachází množství velmi malých signálů, které mohou zanikat při překryvu chromozomů. Celkově může být počet signálů podhodnocen vlivem překrývajících se chromozomů a jednotlivých signálů, což je způsobeno vysokým počtem chromozomů u studovaných druhů. Některé chromozomy mohly v analyzovaných jádrech také chybět, jelikož vlivem překryvů nebylo možné chromozomy spočítat a zkontrolovat tak úplnost všech jader. Počty hybridizačních signálů neodpovídají odhadovaným počtům kopií elementů stanoveným na základě bioinformatické analýzy a velikosti genomů *L. coridon* a *L. bellargus*. Odhadovaný počet kopií v genomu byl v řádu desítek u *Lc-P elementu* a v řádu stovek u repetice *Lc-Ty3/Gypsy* (Dalíková, nepublikováno). Tento výrazný rozdíl oproti odhadu naznačuje, že jednotlivé signály získané fluorescenční *in situ* hybridizací obsahují více kopií studovaných repetice a je tedy možné, že studované repetice se vkládají specificky do určitých míst v genomu (viz například Sultana a kol., 2017). Sekvenčně specifické vkládání

repetic bylo nalezeno například u retroelementu TRAS1 v genomu bource morušového (*Bombyx mori*) a můry zelené (*Mamestra brassicae*). Bylo zjištěno, že tento transpozon se specificky vkládá do telomerických oblastí chromozomů (Okazaki a kol., 1995; Mandrioli, 2002). U *P elementu* může navíc při transpozici docházet k novému vkládání poblíž původní sekvence, což je u DNA transpozonů časté (Kazazian, 2011).

Zajímavý výsledek byl získán vizualizací elementu *Lc-Ty3/Gypsy* u druhu *L. coridon*. Tato repetice se akumuluje po celé délce jednoho autozomu (viz kapitolu 4.4. – Obrázek 6a). Tento výsledek byl patrný u většiny jader, ne však u všech. Absence tohoto typu signálu v některých jádrech může být způsobena nepřítomností daného chromozomu, nebo jeho zakrytím jinými autozomy. Bylo by tedy dobré tento výsledek dále ověřit. Akumulace mobilního elementu na autozomech byla pozorována například u vrubounovitých brouků (Scarabaeinae), u kterých hybridizační signál elementu *Mariner* tvoří až polovinu některých autozomů (Oliveira a kol., 2013). Akumulace transpozonů je u motýlů častá na pohlavním chromozomu W (Traut a kol., 2007; Fuková a kol., 2007). To však v této práci u vizualizovaných repetic pozorováno nebylo. Chromozom W byl na některých jádrech dobře viditelný díky výraznému DAPI pozitivnímu barvení. Hybridizační signály se však na tomto chromozomu rozhodně neakumulovaly a v případě elementu *Lc-Ty3/Gypsy* u *L. bellargus* se zdá, že chromozom W studované repetice neobsahuje vůbec (viz Obrázek 4b). Tato práce však nebyla zaměřena na studium pohlavních chromozomů, takže by bylo dobré dále ověřit přítomnost studovaných mobilních elementů na chromozomu W například pomocí genomové *in situ* hybridizace. Absence transpozonů na pohlavním chromozomu W spolu s faktem, že u modrásků nejsou pohlavní chromozomy fragmentované (Kreklová, 2020), dále podporuje hypotézu o vlivu těchto mobilních elementů na fragmentaci karyotypu u modrásků.

6. Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo analyzovat repetice, které byly v předchozí studii identifikované jako specifické pro vybrané druhy modrásků rodů *Polyommatus* a *Lysandra* s vysokým počtem chromozomů. Jednotlivé studované repetice byly v této práci zaklonovány, osekvenovány a dále testovány. Pomocí metody PCR byla zjišťována jejich přítomnost u příbuzných druhů modrásků. To ve většině případů potvrdilo výsledky předchozí bioinformatické analýzy, kterým se vymykal jen transpozon *Pd-Mariner*. Ten byl tímto vyloučen z repetice s možným podílem na rozpadech chromozomů u modrásků. Distribuce zkoumaných repetice v genomech vybraných modrásků je v některých případech poměrně nahodilá a nelze ji jednoduše vysvětlit přítomností u společných předků a následnými ztrátami u některých druhů. To nasvědčuje tomu, že při šíření mobilních elementů mezi modrásky hraje roli mezidruhové křížení a horizontální přenos. K horizontálnímu přenosu by mohlo docházet mezi myrmekofilními modrásky a mravenci, což bylo ověřováno v této práci detekcí transpozonů u 13 vybraných druhů mravenců metodou PCR. U těchto mravenců však nebyla nalezena žádná ze studovaných repetice, takže se zdá, že zde k horizontálnímu přenosu mezi těmito druhy nedochází.

I přes přítomnost studovaných repetice i u některých druhů modrásků se standardním počtem chromozomů, naznačují výsledky této práce, že mobilní elementy by u studovaných druhů mohly mít vliv na fragmentaci karyotypu, protože transpozon, který se nově dostane do genomu například právě mezidruhovým křížením nebo horizontálním přenosem, může nějaký čas unikat hostitelovým regulačním mechanismům a způsobit například chromozomální zlomy.

Vliv zkoumaných repetice na fragmentaci genomu podporuje i fakt, že se nenacházejí na pohlavním chromozomu W, jak bylo v této práci zjištěno fluorescenční *in situ* hybridizací. Právě pohlavní chromozomy totiž, na rozdíl od autozomů, rozpadům u modrásků nepodléhají. Tato bakalářská práce tedy přináší celou řadu zajímavých výsledků, které podporují hypotézu o roli mobilních elementů při karyotypové evoluci u modrásků rodů *Polyommatus* a *Lysandra*.

7. Literatura

- Ahola V, Lehtonen R, Somervuo P, Salmela L, Koskinen P, Rastas P, a kol. (2014) The Glanville fritillary genome retains an ancient karyotype and reveals selective chromosomal fusions in Lepidoptera. *Nature Communications* 5: 4737. [\[Odkaz\]](#)
- Andrenacci D, Cavaliere V, Lattanzi G (2020) The role of transposable elements activity in aging and their possible involvement in laminopathic diseases. *Ageing Research Reviews* 57: 100995. [\[Odkaz\]](#)
- Bao W, Jurka MG, Kapitonov VV, Jurka J (2009) New superfamilies of eukaryotic DNA transposons and their internal divisions. *Molecular Biology and Evolution* 26(5): 983–993. [\[Odkaz\]](#)
- Bleykasten-Grosshans C, Friedrich A, Schacherer J (2013) Genome-wide analysis of intraspecific transposon diversity in yeast. *BMC Genomics* 14: 399. [\[Odkaz\]](#)
- Boto L (2010) Horizontal gene transfer in evolution: facts and challenges. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277(1683): 819–827. [\[Odkaz\]](#)
- Brown KS, Von Schoultz B, Suomalainen E (2004) Chromosome evolution in Neotropical Danainae and Ithomiinae (Lepidoptera). *Hereditas* 141(3): 216–236. [\[Odkaz\]](#)
- Bureš P, Zedek F (2014) Holokinetic drive: centromere drive in chromosomes without centromeres. *Evolution* 68(8): 2412–2420. [\[Odkaz\]](#)
- Dinca V, Dapporto L, Vila R (2011a) A combined genetic-morphometric analysis unravels the complex biogeographical history of *Polyommatus icarus* and *Polyommatus celina* common blue butterflies. *Molecular Ecology* 20(18): 3921–3935. [\[Odkaz\]](#)
- Dinca V, Lukhtanov VA, Talavera G, Vila R (2011b) Unexpected layers of cryptic diversity in wood white *Leptidea* butterflies. *Nature Communications* 2: 324. [\[Odkaz\]](#)
- Drezen JM, Josse T, Bézier A, Gauthier J, Hugué E, Herniou EA (2017) Impact of lateral transfers on the genomes of Lepidoptera. *Genes* 8(11): 315. [\[Odkaz\]](#)
- Evgen'ev MB, Zelentsova H, Poluectova H, Lyozin GT, Veleikodvorskaja V, Pyatkov KI, Zhivotovsky LA, Kidwell MG (2000) Mobile elements and chromosomal evolution in the *virilis* group of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(21):11337–11342. [\[Odkaz\]](#)
- Fontdevila A (2005) Hybrid genome evolution by transposition. *Cytogenetic and Genome Research* 110: 49–55. [\[Odkaz\]](#)
- Fuková I, Traut W, Kubičková S, Marec F (2007) Repetitive elements on the codling moth W chromosome. *Chromosome Research* 15: 77.
- Gasior SL, Wakeman TP, Xu B, Deininger PL (2006) The human LINE-1 retrotransposon creates DNA double-strand breaks. *Journal of Molecular Biology* 357(5): 1383–1393. [\[Odkaz\]](#)
- Guo M, Wu Y (2013) Fighting an old war with a new weapon—silencing transposons by Piwi-interacting RNA. *IUBMB Life* 65(9): 739–747. [\[Odkaz\]](#)
- Havecker ER, Gao X, Voytas DF (2004) The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biology* 5(6): 225. [\[Odkaz\]](#)

- Kandul NP, Lukhtanov VA, Dantchenko AV, Coleman JWS, Sekercioglu CH, Haig D, Pierce NE (2004) Phylogeny of *Agrodiaetus* Hübner 1822 (Lepidoptera: Lycaenidae) inferred from mtDNA sequences of COI and COII and nuclear sequences of EF1- α : karyotype diversification and species radiation. *Systematic Biology* 53(2): 278–298. [\[Odkaz\]](#)
- Kandul NR, Lukhtanov VA, Pierce NE (2007) Karyotypic diversity and speciation in *Agrodiaetus* butterflies. *Evolution* 61(3): 546–559. [\[Odkaz\]](#)
- Kapitonov VV, Jurka J (2001) Rolling-circle transposons in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(15): 8714–8719. [\[Odkaz\]](#)
- Kapitonov VV, Jurka J (2006) Self-synthesizing DNA transposons in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(12): 4540–4545. [\[Odkaz\]](#)
- Kapitonov VV, Jurka J (2007) *Helitrons* on a roll: eukaryotic rolling-circle transposons. *Trends in Genetics* 23(10): 521–529. [\[Odkaz\]](#)
- Kazazian HH (2011) Mobile DNA: Finding Treasure in Junk. *FT Press*, New Jersey.
- Keeling PJ (2009) Functional and ecological impacts of horizontal gene transfer in eukaryotes. *Current Opinion in Genetics and Development* 19(6): 613–619. [\[Odkaz\]](#)
- Klein SJ, O'Neill RJ (2018) Transposable elements: genome innovation, chromosome diversity, and centromere conflict. *Chromosome Research* 26: 5–23. [\[Odkaz\]](#)
- Kraaijeveld K (2010) Genome size and species diversification. *Evolutionary Biology* 37(4): 227–233. [\[Odkaz\]](#)
- Kreklová M (2020) Analýza pohlavních chromozomů modrásků (Lycaenidae). Magisterská práce. Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta, České Budějovice.
- Kristensen N, Skalski A (1999) Phylogeny and palaeontology. In Handbook of Zoology Vol. IV, Arthropoda: Insecta. *Walter de Gruyter*, Berlin 1: 7–25. [\[Odkaz\]](#)
- Labrador M, Farre M, Utzet F, Fontdevila A (1999) Interspecific hybridization increases transposition rates of *Osvaldo*. *Molecular Biology and Evolution* 16(7): 931–937. [\[Odkaz\]](#)
- Lavoie CA, Platt RN, Novick PA, Counterman BA, Ray DA (2013) Transposable element evolution in *Heliconius* suggests genome diversity within Lepidoptera. *Mobile DNA* 4: 21. [\[Odkaz\]](#)
- Lee CC, Wang J (2018) Rapid expansion of a highly germline-expressed *Mariner* element acquired by horizontal transfer in the fire ant genome. *Genome Biology and Evolution* 10(12): 3262–3278. [\[Odkaz\]](#)
- Lim JK, Simmons JM (1994) Gross chromosome rearrangements mediated by transposable elements in *Drosophila melanogaster*. *Bioessays* 16(4): 269–275. [\[Odkaz\]](#)
- Llorens C, Futami R, Covelli L, Dominguez-Escriba L, Viu JM, Tamarit D, Aguilar-Rodriguez J, Vicente-Ripolles M, Fuster G, Bernet GP, Maumus F, Munoz-Pomer A, Sempere JM, Latorre A, Moya A (2011) The *Gypsy* Database (GyDB) of mobile genetic elements: release 2.0. *Nucleic Acids Research* 39: D70–74. [\[Odkaz\]](#)

- Lukhtanov (2015) The blue butterfly *Polyommatus (Plebicula) atlanticus* (Lepidoptera, Lycaenidae) holds the record of the highest number of chromosomes in the non-polyploid eukaryotic organisms. *Comparative Cytogenetics* 9(4): 683–690. [\[Odkaz\]](#)
- Lukhtanov VA, Dinca V, Friberg M, Šichová J, Olofsson M, Vila R, Marec F, Wiklund C (2018) Versatility of multivalent orientation, inverted meiosis, and rescued fitness in holocentric chromosomal hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(41): E9610–E9619. [\[Odkaz\]](#)
- Luo S, Lu J (2017) Silencing of transposable elements by piRNAs in *Drosophila*: An evolutionary perspective. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* 15(3): 164–176. [\[Odkaz\]](#)
- Mandrioli M (2002) Cytogenetic characterization of telomeres in the holocentric chromosomes of the lepidopteran *Mamestra brassicae*. *Chromosome Research* 10(4): 279–286. [\[Odkaz\]](#)
- Mediouni J, Fuková I, Frydrychová R, Dhouibi MH, Marec F (2004) Karyotype, sex chromatin and sex chromosome differentiation in the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae). *Caryologia* 57(2): 184–194. [\[Odkaz\]](#)
- Melters DP, Paliulis LV, Korf IF, Chan SWL (2012) Holocentric chromosomes: convergent evolution, meiotic adaptations, and genomic analysis. *Chromosome Research* 20(5): 579–593. [\[Odkaz\]](#)
- Mola LM, Papeschi AG (2006) Holokinetic chromosomes at a glance. *Journal of Basic and Applied Genetics* 17(1): 17–33.
- Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AGB, Worm B (2011) How many species are there on earth and in the ocean? *PLOS Biology* 9(8): e1001127. [\[Odkaz\]](#)
- Mustafin RN (2018) Functional dualism of transposon transcripts in evolution of eukaryotic genomes. *Russian Journal of Developmental Biology* 49(6): 339–355. [\[Odkaz\]](#)
- 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(6): 792–793. [\[Odkaz\]](#)
- Novikova O, Sliwinska E, Fet V, Settele J, Blinov A, Woyciechowski M (2007) CR1 clade of non-LTR retrotransposons from *Maculinea* butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae): evidence for recent horizontal transmission. *BMC Evolutionary Biology* 7: 93. [\[Odkaz\]](#)
- Okazaki S, Ishikawa H, Fujiwara H (1995) Structural analysis of TRAS1, a novel family of telomeric repeat-associated retrotransposons in the silkworm, *Bombyx mori*. *Molecular and Cellular Biology* 15(8): 4545–4552. [\[Odkaz\]](#)
- Oliveira SG, Cabral-de-Mello DC, Moura RC, Martins C (2013) Chromosomal organization and evolutionary history of *Mariner* transposable elements in Scarabaeinae coleopterans. *Molecular Cytogenetics* 6: 54. [\[Odkaz\]](#)
- Osanai-Futahashi M, Suetsugu Y, Mita K, Fujiwara H (2008) Genome-wide screening and characterization of transposable elements and their distribution analysis in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38(12): 1046–1057. [\[Odkaz\]](#)

- Peccoud J, Loiseau V, Cordaux R, Gilbert C (2017) Massive horizontal transfer of transposable elements in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(18): 4721–4726. [\[Odkaz\]](#)
- Pierce NE, Braby MF, Heath A, Lohman DJ, Mathew J, Rand DB, Travassos MA (2002) The ecology and evolution of ant association in the Lycaenidae (Lepidoptera). *Annual Review of Entomology* 47(1): 733–771. [\[Odkaz\]](#)
- 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. [\[Odkaz\]](#)
- Rebollo R, Horard B, Hubert B, Vieira C (2010) Jumping genes and epigenetics: Towards new species. *Gene* 454: 1–7. [\[Odkaz\]](#)
- Reiss D, Mialdea G, Miele V, de Vienne DM, Peccoud J, Gilbert C, Duret L, Charlat S (2019) Global survey of mobile DNA horizontal transfer in arthropods reveals Lepidoptera as a prime hotspot. *PLoS Genetics* 15(2): e1007965. [\[Odkaz\]](#)
- Robinson R (1971) *Lepidoptera Genetics*. Pergamon Press, Oxford.
- Sambrook J (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Third Edition* (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sela N, Kim E, Ast G (2010) The role of transposable elements in the evolution of non-mammalian vertebrates and invertebrates. *Genome Biology* 11(6): R59. [\[Odkaz\]](#)
- Shao F, Han MJ, Peng ZG (2019) Evolution and diversity of transposable elements in fish genomes. *Scientific Reports* 9: 15399. [\[Odkaz\]](#)
- Sormacheva I, Smyshlyaev G, Mayorov V, Blinov A, Novikov A, Novikova O (2012) Vertical evolution and horizontal transfer of cr1 non-LTR retrotransposons and *Tc1/Mariner* DNA transposons in Lepidoptera species. *Molecular Biology and Evolution* 29(12): 3685–3702. [\[Odkaz\]](#)
- Sotero-Caio CG, Platt RN II, Suh A, Ray DA (2017) Evolution and diversity of transposable elements in vertebrate genomes. *Genome Biology and Evolution* 9(1): 161–177. [\[Odkaz\]](#)
- Stork NE (2018) How many species of insects and other terrestrial arthropods are there on Earth? *Annual Review of Entomology* 63(1): 31–45. [\[Odkaz\]](#)
- Strotz LC, Simoes M, Girard MG, Breikreuz L, Kimmig J, Lieberman BS (2018) Getting somewhere with the Red Queen: chasing a biologically modern definition of the hypothesis. *Biology Letters* 14(5): 20170734. [\[Odkaz\]](#)
- Sultana T, Zamborlini A, Cristofari G, Lesage P (2017) Integration site selection by retroviruses and transposable elements in eukaryotes. *Nature Reviews Genetics* 18: 292–308. [\[Odkaz\]](#)
- Šíchová 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 Evolutionary Biology* 15: 89. [\[Odkaz\]](#)
- Šíchová J, Ohno M, Dinca V, Watanabe M, Sahara K, Marec F (2016) Fissions, fusions, and translocations shaped the karyotype and multiple sex chromosome constitution of the

- northeast-Asian wood white butterfly, *Leptidea amurensis*. *Biological Journal of the Linnean Society* 118(3): 457–471. [\[Odkaz\]](#)
- Talavera G, Lukhtanov VA, Rieppel L, Pierce NE, Vila R (2013) In the shadow of phylogenetic uncertainty: The recent diversification of *Lysandra* butterflies through chromosomal change. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 69(3): 469–478. [\[Odkaz\]](#)
- Talla V, Suh A, Kalsoom F, Dinca V, Vila R, Friberg M, Wiklund C, Backström N (2017) Rapid increase in genome size as a consequence of transposable element hyperactivity in wood-white (*Leptidea*) butterflies. *Genome Biology and Evolution* 9(10): 2491–2505. [\[Odkaz\]](#)
- Thomas-Bulle C, Piednoel M, Donnart T, Filee J, Jollivet D, Bonnivard E (2018) Mollusc genomes reveal variability in patterns of LTR-retrotransposons dynamics. *BMC Genomics* 19: 821. [\[Odkaz\]](#)
- Traut W, Sahara K, Marec F (2007) Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sexual Development* 1(6): 332–346. [\[Odkaz\]](#)
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012) Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40(15): 115. [\[Odkaz\]](#)
- Vershinina AO, Lukhtanov VA (2017) Evolutionary mechanisms of runaway chromosome number change in *Agrodiaetus* butterflies. *Scientific Reports* 7: 8199. [\[Odkaz\]](#)
- Wallau GL, Ortiz MF, Loreto ELS (2012) Horizontal transposon transfer in Eukarya: detection, bias, and perspectives. *Genome Biology and Evolution* 4(8): 801–811. [\[Odkaz\]](#)
- Wang J, Wang A, Han Z, Zhang Z, Li F, Li X (2012) Characterization of three novel SINE families with unusual features in *Helicoverpa armigera*. *PLOS One* 7(2): e31355. [\[Odkaz\]](#)
- White MJD (1973) Animal cytology and evolution. *Cambridge University Press*, Cambridge.
- Wiemers M, Stradomsky B, Vodolazhsky D (2010) A molecular phylogeny of *Polyommatus* s. str. and *Plebicula* based on mitochondrial COI and nuclear ITS2 sequences (Lepidoptera: Lycaenidae). *European Journal of Entomology* 107(3): 325–336. [\[Odkaz\]](#)
- Xia QY, Wang J, Zhou ZY, Li RQ, Fan W, Cheng DJ, Cheng TC, Qin JJ, Duan J, Xu HF a kol. (2008) The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38(12): 1036–1045. [\[Odkaz\]](#)
- Yoshiyama M, Tu Z, Kainoh Y, Honda H, Shono T, Kimura K (2001) Possible horizontal transfer of a transposable element from host to parasitoid. *Molecular Biology and Evolution* 18(10): 1952–1958. [\[Odkaz\]](#)

8. Přílohy

Příloha I: Sekvence klonů mobilních elementů (po odstranění sekvencí primerů) použitých jako sondy pro TSA-FISH. Klon *Lc-Ty3/Gypsy* amplifikovaný primery Lc_Ty3_F2 a Lc_Ty3_R2 nebyl celý prosekvenován, neosekvenovaná část je nahrazena písmeny **n** a její délka byla odhadnuta na základě konsensus sekvence. Všechny sekvence jsou uvedeny ve formátu FASTA.

> *Lc-P element* klon amplifikovaný primery Lc_P_F1 a Lc_P_R1 (1387 bp)

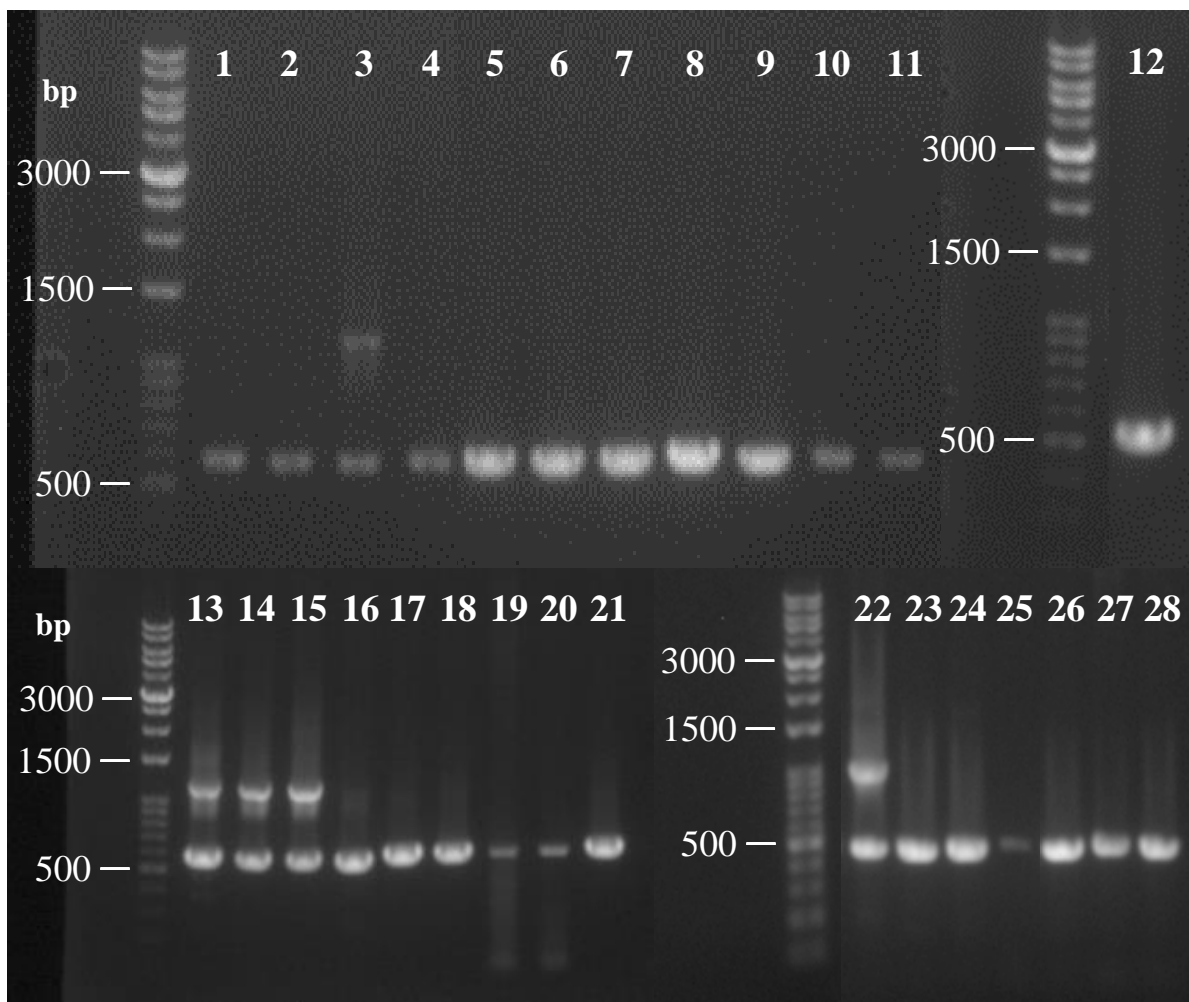
```
ATCCTGCTTAAGGCTTCTTAGGGCTGATTGAAAGGCTGCACATATGCGACTACATATTAAGGCTATA
TGTTTTAAGCCACATTTGACAACAGCACTCACACATCTTTTAAAATATTTTTCAAATCGATGCCTG
AGGTGGCTCCTTGGCAGTAATAAAAGGCAAGTGGTTGCTGCCATTTAAACACTGCTCCTCTTAGCAT
AAAACTAAGGCATGGTCAGCAAAGTCATTAGTTTTTTTTATTAAATCTACAAATCCTGTGACTTTA
TCTTTGTTTTTGTTCATAGTTTAGTGAGTCTCCAATGACATCTCATCAAAGATTATCGAACAAAGTT
TTTTGTTCTCTTTCCAAGATGCGACCTGAAATAAATATTTTTAATGTAGTGATATAAAAATAACAAA
AAATATTGTGACAAATACCTCTGTAGTGGTGACATTTGAAATAAGTAATAACTAACCTTTTCTTTCA
TTAATTTGAAAAGTTGTGGACAAATTCCCGTTTTCTATATTAATTTGGACACCATGTTATTTAGTGT
AGACCTAGATGGCAATATAAATATATTGTGCAGAACTTATACCCCTTGGGGCTTTGCTTCATTATG
CACATCGCTAATAATTTTTCTTCATTAGTGAACCTTCTGCCTTTCTTATTTTTGTTGCAAAGTTTAA
TTTGCATGTTTATAATTTTTCTAGCGTATGGATTCATATCATTTGTTAGTTTTTCAAATAACTGTTT
TTTCATAAAAGCTAAGGCTCTTTTGGCTCTCATGTAAAAATCTTTTTGCCGCTTAGCTCTTTGGTAC
TCTTGATAAATACACTTTGCCGTTGGTGTCAAATCTTTTATTTTATGAATGATACGCTTTCTTGCTT
TTAGCACCATCAAATGTCTGGTTTTCTCAATTTGATTTGAGGCTAAAAGTATATAAAAATTTTGAATT
ATTTACATAAAACATAACACAATTGGCAAAGATAAGATAAGAAGTTATAAATATTAATTATTAACCC
ACTTTCTAGTCAATATAAATTATGAACAGCAAATAACTATTATATCATCTGACTTTGAAACAGAATA
CTAATACAGAAATCAACAACCCATTTAATGTTATAAGGCACATAAATATTATAATTTTTAAAGGGCT
TAGATCATTTTTCTTTTTGTAAGAAGTAAATTAACATTAGTTCTTGAACGATAGCTGTAAAAATGAATG
TATAATATGTTTATTTTACCTGAGTGTTATTTCACTGATAAATGGGATGTTCCAGATACACTCTCAAG
ATTACTGGAAAATTTGGTTTACTGCTTCTGCAAAAACAAATTTATTCTTAAATTTCTTTTTAGGAAACAA
AATATACAAATACCTGTACAGTAAGTTGAAGTTACATATGGATTTTG
```

>*Lc-Ty3/Gypsy* klon amplifikovaný primery Lc_Ty3_F1 a Lc_Ty3_R1 (2141 bp)

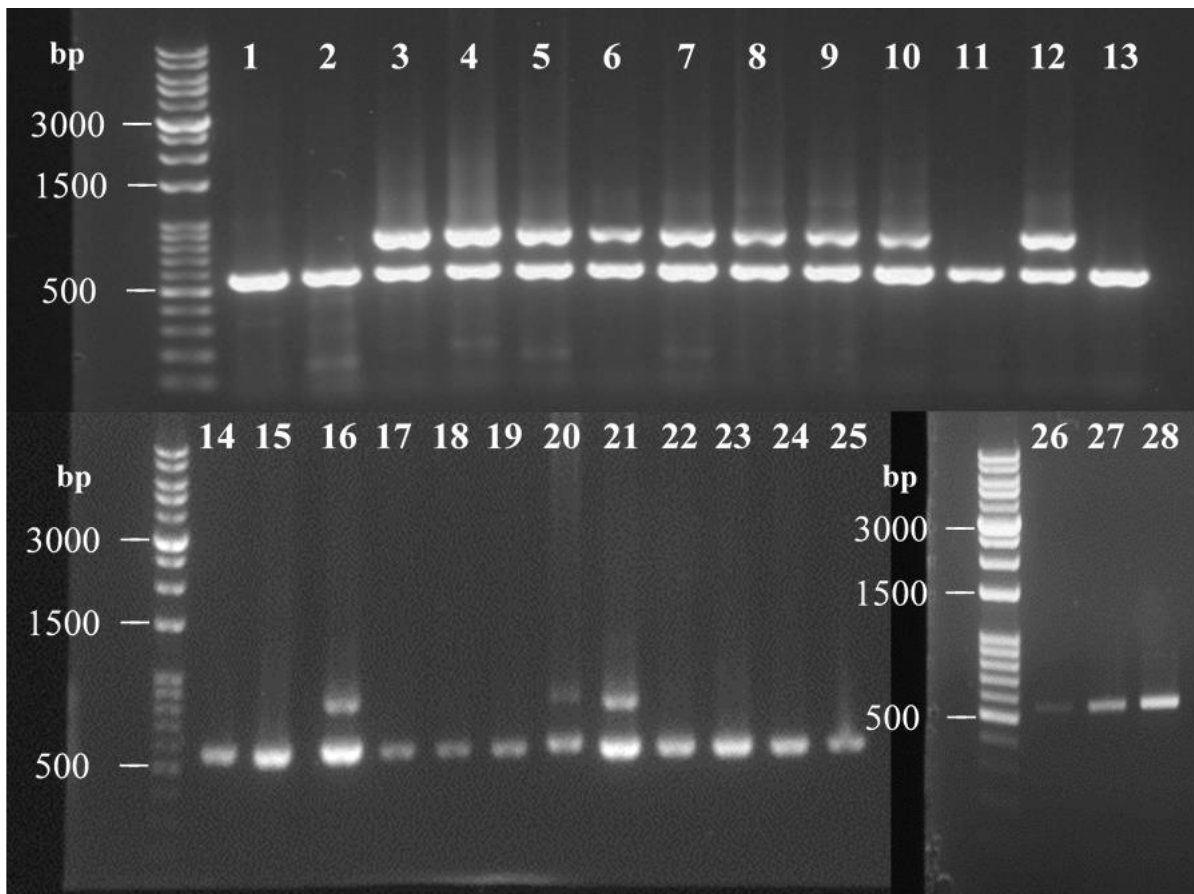
```
CGAAAAGGTTAGAGAAATGATTGACAAAATGTTAGAGGCTGGTATCATTAGAGACTCAACATCAGAA
TACGCAAGCCCTATTGTTCTAGTTAAAAAGAAAACGGGAAGCAAAGACTTTGTGTAGATTAATAATT
CTAAACACCTTACATCATTCGTTACGCCTGATGGGCAATATGAATTTAACCACATGCCTTTTGGCCT
TGCCAATGCACCAGCAGTTTTCCAACGAATGATGAATAAGGTGTTAGGCTCTTCTAGATTTACTAAA
GCTACTGCCTACATAGATGATGTTCTTATTTATGGCATGAATGTTGAGGATTGCTTGGATAAATTA
AACACGTCCCTTATTTACTAGAAAACGCCATTTGACTCTTAATTTAGATAAATGCGAATTTTTTATG
TGACCGAATCGATTATCTAGGTTATGAAATTAGCTCTGAAGGAGTGCAGCCCGGTAATCATAAAAATA
GAAAGTGTTCAAATTTTTCTCAGCCTGTAAATCAACAGGGTATACGTCAGTTTCTCGGATTGGTTA
GTTACTTCCGCAAGTTTATTTCAAATTTTTGCACAGTTATCTTATCCCTTGAGTAAATTTATAAAAA
GGATGTCAATTTTGTCTGGACTGATAAACAAAATAATTGTTTTAACGAACTCAAGCGTAGACTTATT
ACTAGACCCATTTTAGCTATTTATGACCCATCAGCTGAACTTCAACTTCATACTGATGCTAGCAAA
ATTGGTGTAGGTGGTATTTTAAATGCAACGGCTTAAAGAAAATGACACATTTAAACCAGTAGCTTTTT
ACAGTCGCCAACCTCTCCTGAGGAAAAGAATTTTCACTCTTACGAGCTGGAGACCCTGGCTTTAAT
```


AAGTAATACTTTATTGCAATTTCTATAAAATTTTATTCAAGGGTAATTTTATTGAGAGTATGTTTAGA
TTTTTTCTAGTGCTGTAAAATAAAACAATGTATTAAAGAAAAGGAAGTTGCATTTGACTTCCCTCA
ATAGAGTTTCGACGTTGATAGCAATTGGCGGGAGTTGGCGGGAATACCTGGGTATAAAATAGAGGGTT
TGAGCCCTATTTGGCGGATTCTGGTATCAACGTTGACCTCGGCAGGTTATACTGGTAAGTCACTTTA
AGAATTTCTTATACTTATTATAATTATTTGCTGTATTGATGTAACGTGCTCACAGTGAGTTAGACCT
AATGTTAATTACTCTTAGTTGGAGGTGATTTAATAATTATTATTAAGATGTCTGTTAAAATAAAG
TATTATAATTGTGATCTAGAGTTTTTATTACATATCAGAAGTGACACGTACACGCCTACAAAATTGC
TTTTGTTTATTTGAAAACCTCAACTGTATTTCTCTTTTAGTGGTATCATATACTAAAGCATTCC
ACTTTTTGTGTGTTTGAGACGCAATGGAACACGAATCGCGAAAGA

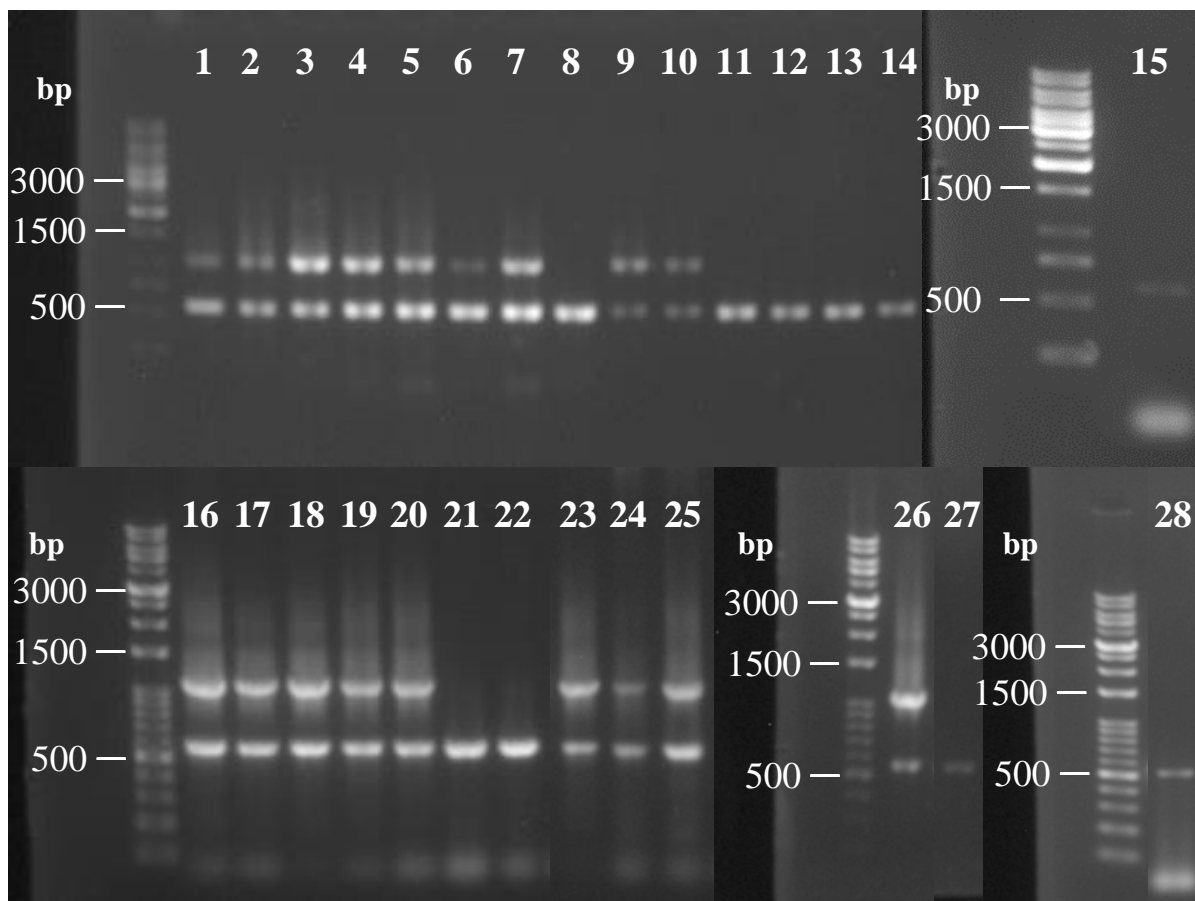
Příloha II: Obrázková dokumentace gelové elektroforézy k PCR analýze studovaných mobilních elementů u modrásků.



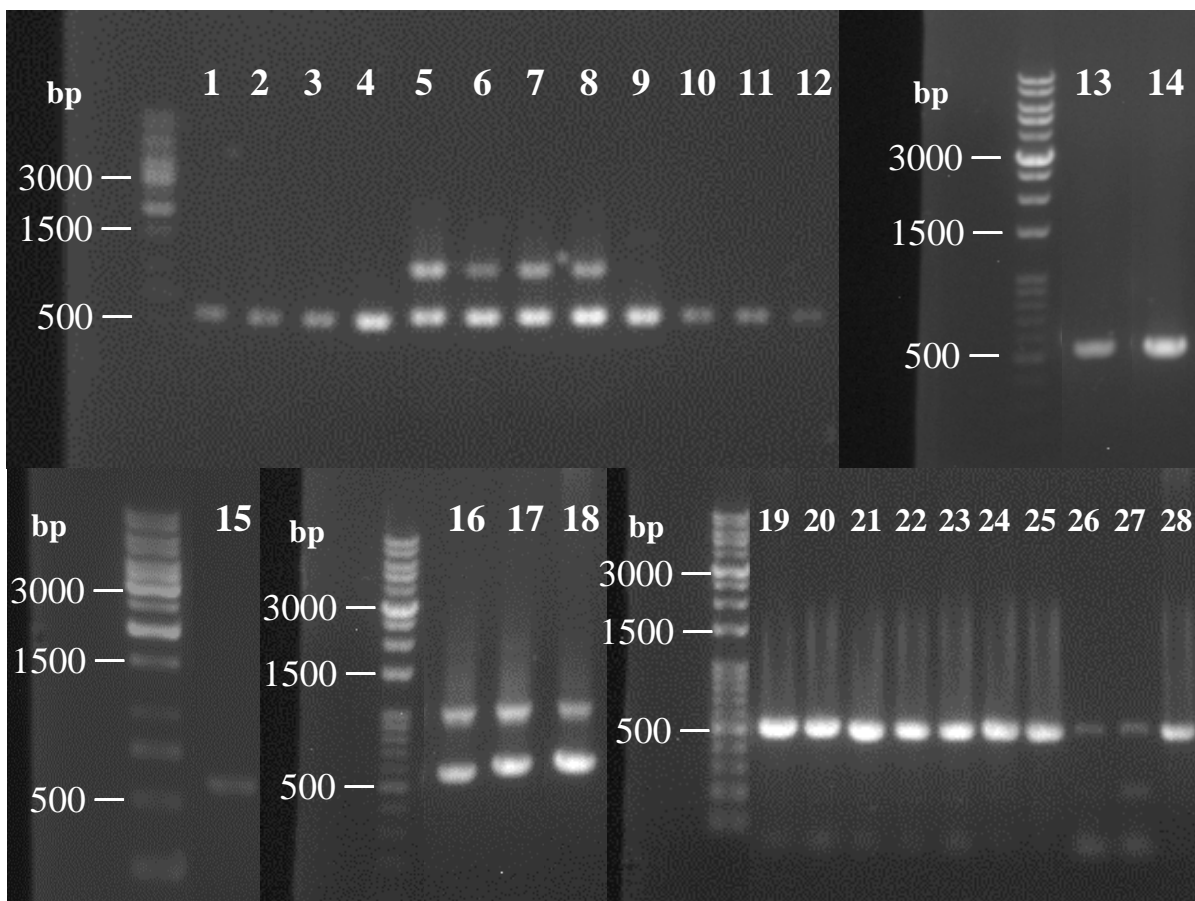
Obrázek 1: Výsledky detekce elementu *Pd-BEL/Pao*. Očekávaná velikost amplifikovaného elementu: 1190 bp. Očekávaná velikost vnitřní kontroly (amplifikace části 18S rDNA): 571 bp. **1:** *P. icarus*, **2:** *P. celina*, **3:** *P. dorylas* 1, **4:** *P. thersites* 1, **5:** *P. amandus*, **6:** *P. escheri* 1, **7:** *P. ripartii* 1, **8:** *P. fulgens* 1, **9:** *L. hispana*, **10:** *L. bellargus*, **11:** *L. punctifera*, **12:** *P. ripartii* 3, **13:** *P. nivescens* 1, **14:** *P. nivescens* 2, **15:** *P. nivescens* 3, **16:** *P. daphnis*, **17:** *P. escheri* 2, **18:** *P. escheri* 3, **19:** *P. stempfferi* 1, **20:** *P. stempfferi* 2, **21:** *L. coridon*, **22:** *P. dorylas* 2, **23:** *P. thersites* 2, **24:** *P. thersites* 3, **25:** *P. stempfferi* 3, **26:** *P. ripartii* 2, **27:** *P. fulgens* 2, **28:** *P. fulgens* 3.



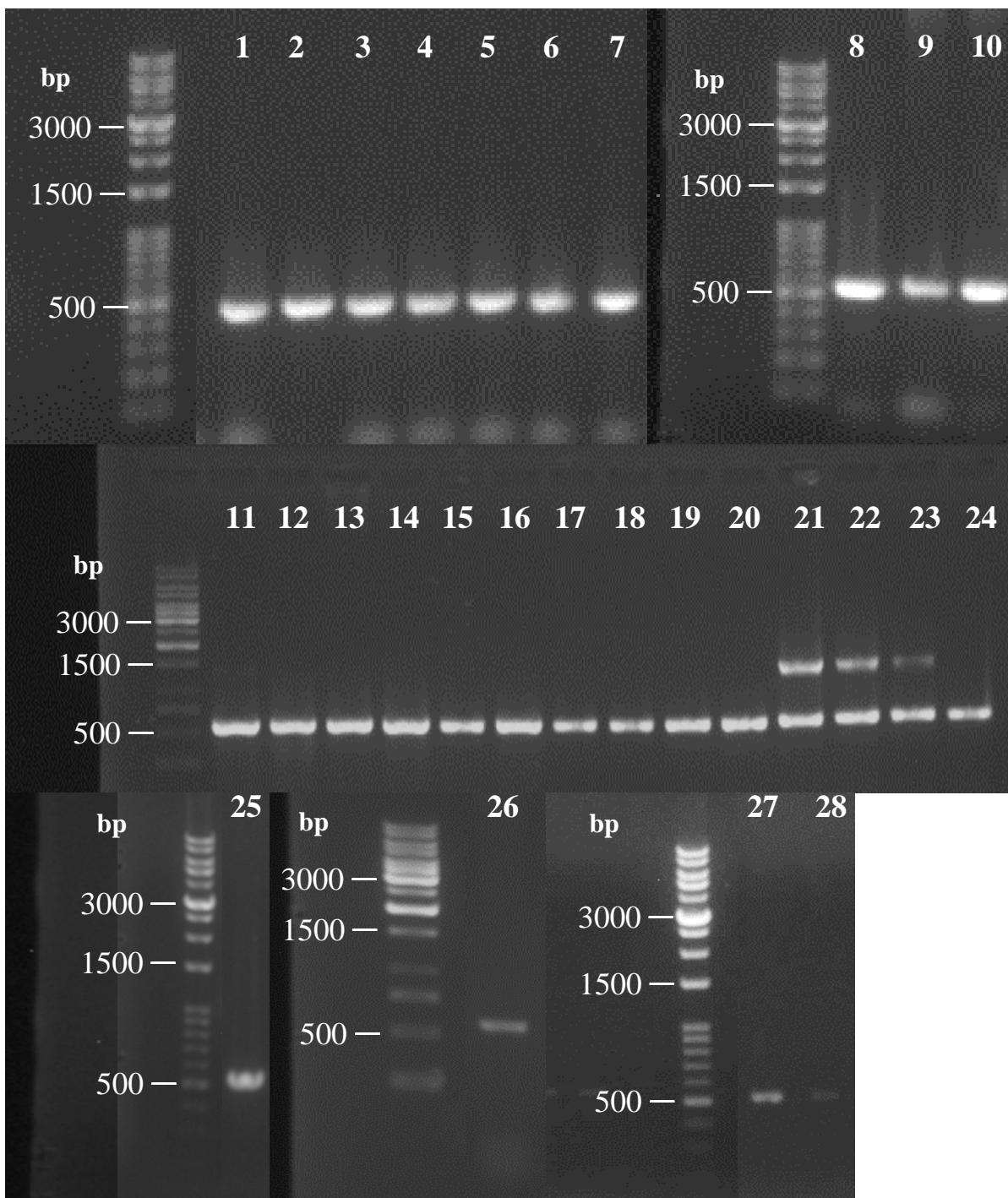
Obrázek 2: Výsledky detekce elementu *Pd-Mariner*. Očekávaná velikost amplifikovaného elementu: 851 bp. Očekávaná velikost vnitřní kontroly (amplifikace části 18S rDNA): 571 bp.
1: *P. icarus*, **2:** *P. celina*, **3:** *P. dorylas* 1, **4:** *P. dorylas* 2, **5:** *P. nivescens* 1, **6:** *P. nivescens* 2, **7:** *P. nivescens* 3, **8:** *P. thersites* 1, **9:** *P. thersites* 2, **10:** *P. thersites* 3, **11:** *P. daphnis*, **12:** *P. amandus*, **13:** *P. escheri* 1, **14:** *P. escheri* 2, **15:** *P. escheri* 3, **16:** *P. ripartii* 1, **17:** *P. ripartii* 2, **18:** *P. ripartii* 3, **19:** *P. fulgens* 1, **20:** *P. fulgens* 2, **21:** *P. fulgens* 3, **22:** *L. coridon*, **23:** *L. hispana*, **24:** *L. bellargus*, **25:** *L. punctifera*, **26:** *P. stempfferi* 1, **27:** *P. stempfferi* 2, **28:** *P. stempfferi* 3.



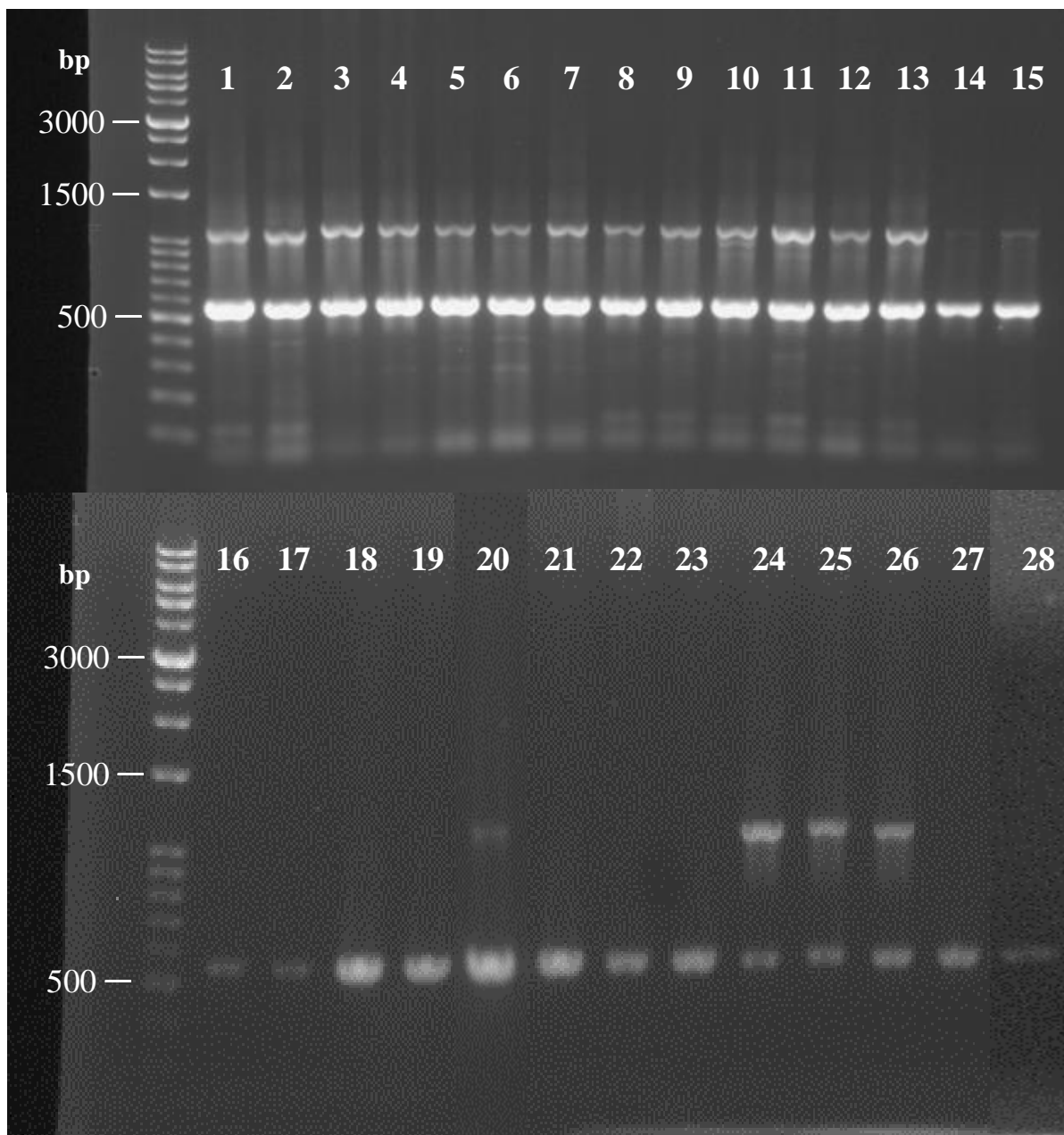
Obrázek 3: Výsledky detekce elementu *Pr-Mariner*. Očekávaná velikost amplifikovaného elementu: 1104 bp. Očekávaná velikost vnitřní kontroly (amplifikace části 18S rDNA): 571 bp. **1:** *P. icarus*, **2:** *P. celina*, **3:** *P. dorylas* 1, **4:** *P. nivescens* 1, **5:** *P. thersites* 1, **6:** *P. daphnis*, **7:** *P. amandus*, **8:** *P. escheri* 1, **9:** *P. ripartii* 1, **10:** *P. fulgens* 1, **11:** *L. coridon*, **12:** *L. hispana*, **13:** *L. bellargus*, **14:** *L. punctifera*, **15:** *P. stempfferi* 1, **16:** *P. dorylas* 2, **17:** *P. nivescens* 2, **18:** *P. nivescens* 3, **19:** *P. thersites* 2, **20:** *P. thersites* 3, **21:** *P. escheri* 2, **22:** *P. escheri* 3, **23:** *P. ripartii* 2, **24:** *P. fulgens* 2, **25:** *P. fulgens* 3, **26:** *P. ripartii* 3, **27:** *P. stempfferi* 2, **28:** *P. stempfferi* 3.



Obrázek 4: Výsledky detekce elementu *Pr-Ty3/Gypsy*. Očekávaná velikost amplifikovaného elementu: 1050 bp. Očekávaná velikost vnitřní kontroly (amplifikace části 18S rDNA): 571 bp. **1:** *P. icarus*, **2:** *P. celina*, **3:** *P. dorylas* 1, **4:** *P. nivescens* 1, **5:** *P. daphnis*, **6:** *P. amandus*, **7:** *P. ripartii* 1, **8:** *P. fulgens* 1, **9:** *L. coridon*, **10:** *L. hispana*, **11:** *L. bellargus*, **12:** *L. punctifera*, **13:** *P. thersites* 1, **14:** *P. escheri* 1, **15:** *P. stempfferi* 1, **16:** *P. ripartii* 2, **17:** *P. ripartii* 3, **18:** *P. fulgens* 3, **19:** *P. dorylas* 2, **20:** *P. nivescens* 2, **21:** *P. nivescens* 3, **22:** *P. thersites* 2, **23:** *P. thersites* 3, **24:** *P. escheri* 2, **25:** *P. escheri* 3, **26:** *P. stempfferi* 2, **27:** *P. stempfferi* 3, **28:** *P. fulgens* 2.

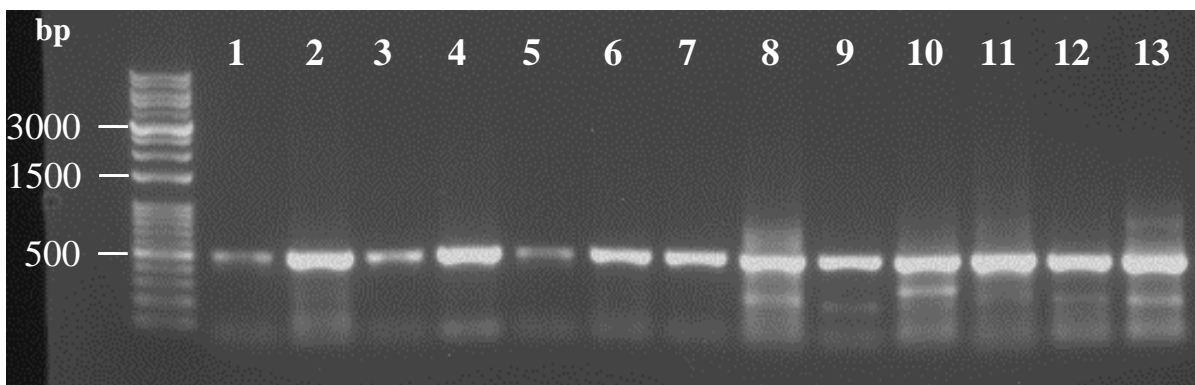


Obrázek 5: Výsledky detekce elementu *Lc-P element*. Očekávaná velikost amplifikovaného elementu: 1429 bp. Očekávaná velikost vnitřní kontroly (amplifikace části 18S rDNA): 571 bp. **1:** *P. dorylas* 2, **2:** *P. nivescens* 2, **3:** *P. nivescens* 3, **4:** *P. thersites* 2, **5:** *P. thersites* 3, **6:** *P. escheri* 2, **7:** *P. escheri* 3, **8:** *P. ripartii* 2, **9:** *P. fulgens* 2, **10:** *P. fulgens* 3, **11:** *P. icarus*, **12:** *P. celina*, **13:** *P. dorylas* 1, **14:** *P. nivescens* 1, **15:** *P. thersites* 1, **16:** *P. daphnis*, **17:** *P. amandus*, **18:** *P. escheri* 1, **19:** *P. ripartii* 1, **20:** *P. fulgens* 1, **21:** *L. coridon*, **22:** *L. hispana*, **23:** *L. bellargus*, **24:** *L. punctifera*, **25:** *P. ripartii* 3, **26:** *P. stempfferi* 1, **27:** *P. stempfferi* 2, **28:** *P. stempfferi* 3.

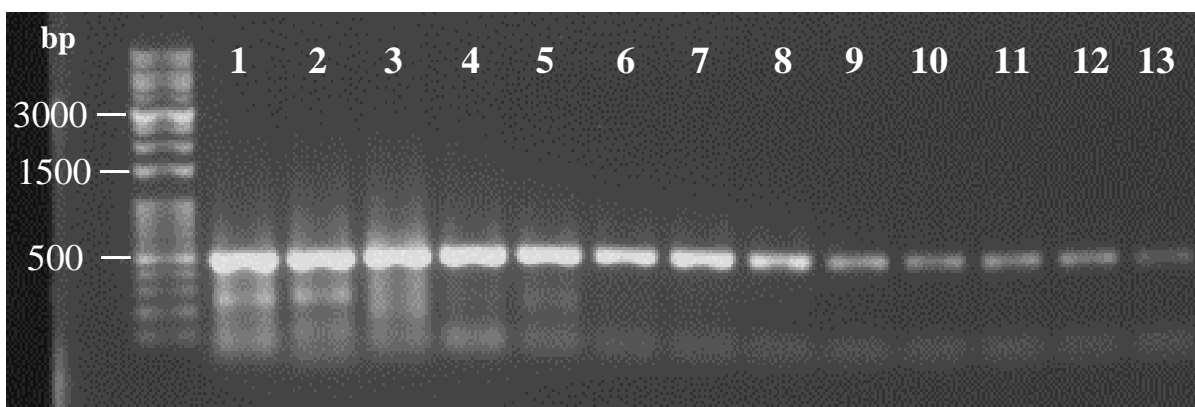


Obrázek 6: Výsledky detekce elementu *Lc-Ty3/Gypsy*. Očekávaná velikost amplifikovaného elementu: 1130 bp. Očekávaná velikost vnitřní kontroly (amplifikace části 18S rDNA): 571 bp. **1:** *P. icarus*, **2:** *P. celina*, **3:** *P. dorylas* 1, **4:** *P. dorylas* 2, **5:** *P. nivescens* 1, **6:** *P. nivescens* 2, **7:** *P. nivescens* 3, **8:** *P. thersites* 1, **9:** *P. thersites* 2, **10:** *P. thersites* 3, **11:** *P. daphnis*, **12:** *P. amandus*, **13:** *P. escheri* 1, **14:** *P. escheri* 2, **15:** *P. escheri* 3, **16:** *P. stempfferi* 1, **17:** *P. stempfferi* 2, **18:** *P. ripartii* 1, **19:** *P. ripartii* 2, **20:** *P. ripartii* 3, **21:** *P. fulgens* 1, **22:** *P. fulgens* 2, **23:** *P. fulgens* 3, **24:** *L. coridon*, **25:** *L. hispana*, **26:** *L. bellargus*, **27:** *L. punctifera*, **28:** *P. stempfferi* 3.

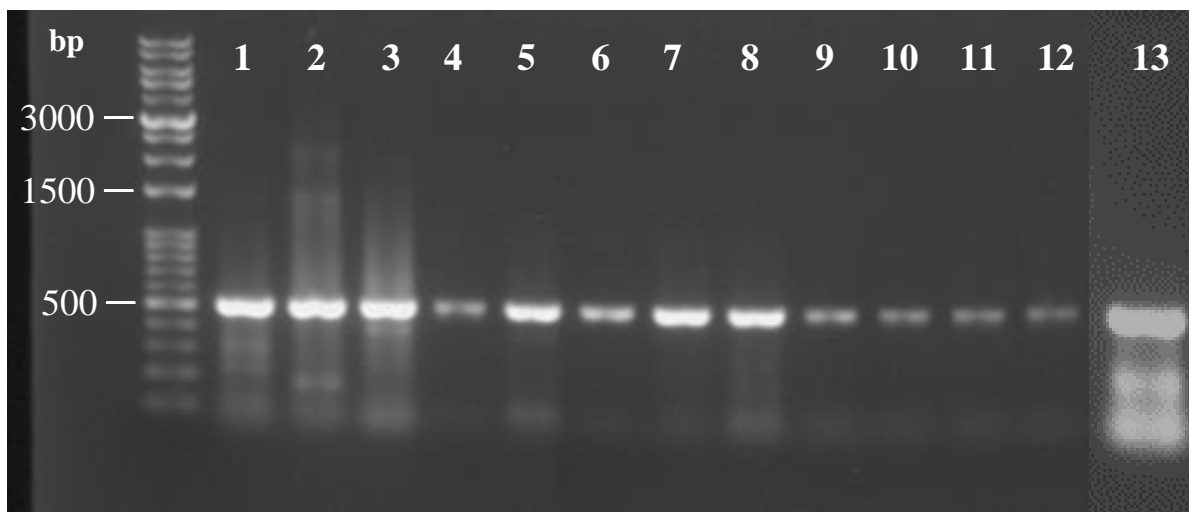
Příloha III: Obrázková dokumentace gelové elektroforézy k PCR analýze studovaných mobilních elementů u mravenců.



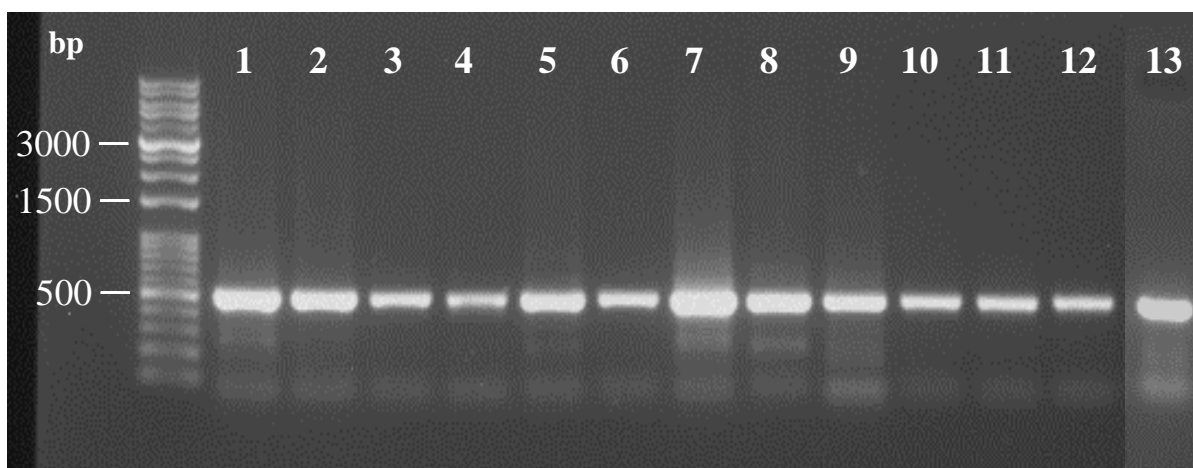
Obrázek 7: Výsledky detekce elementu *Pd-BEL/Pao* u mravenců. Očekávaná velikost amplifikovaného elementu: 1190 bp. Očekávaná velikost vnitřní kontroly (amplifikace části 18S rDNA): 516 bp. **1:** *Myrmica sabuleti*, **2:** *Tapinoma erraticum*, **3:** *Tetramorium cf. caespitum*, **4:** *Formica rufibarbis*, **5:** *Lasius alienus*, **6:** *Lasius fuliginosus*, **7:** *Myrmica ruginodis*, **8:** *Lasius flavus*, **9:** *Dolichoderus quadripunctatus*, **10:** *Camponotus ligniperda*, **11:** *Formica sanguinea*, **12:** *Formica pratensis*, **13:** *Liometopum microcephalum*.



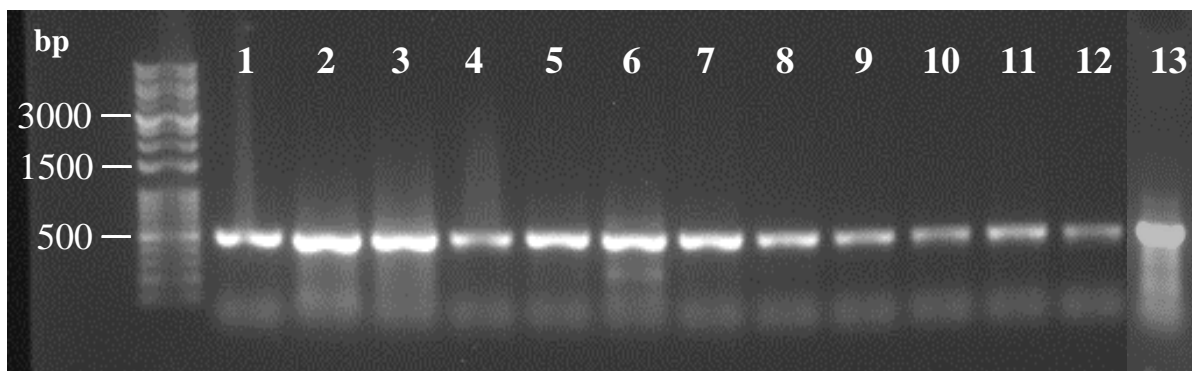
Obrázek 8: Výsledky detekce elementu *Pd-Mariner* u mravenců. Očekávaná velikost amplifikovaného elementu: 851 bp. Očekávaná velikost vnitřní kontroly (amplifikace části 18S rDNA): 516 bp. **1:** *Myrmica sabuleti*, **2:** *Tapinoma erraticum*, **3:** *Tetramorium cf. caespitum*, **4:** *Formica rufibarbis*, **5:** *Lasius alienus*, **6:** *Lasius fuliginosus*, **7:** *Myrmica ruginodis*, **8:** *Lasius flavus*, **9:** *Dolichoderus quadripunctatus*, **10:** *Camponotus ligniperda*, **11:** *Formica sanguinea*, **12:** *Formica pratensis*, **13:** *Liometopum microcephalum*.



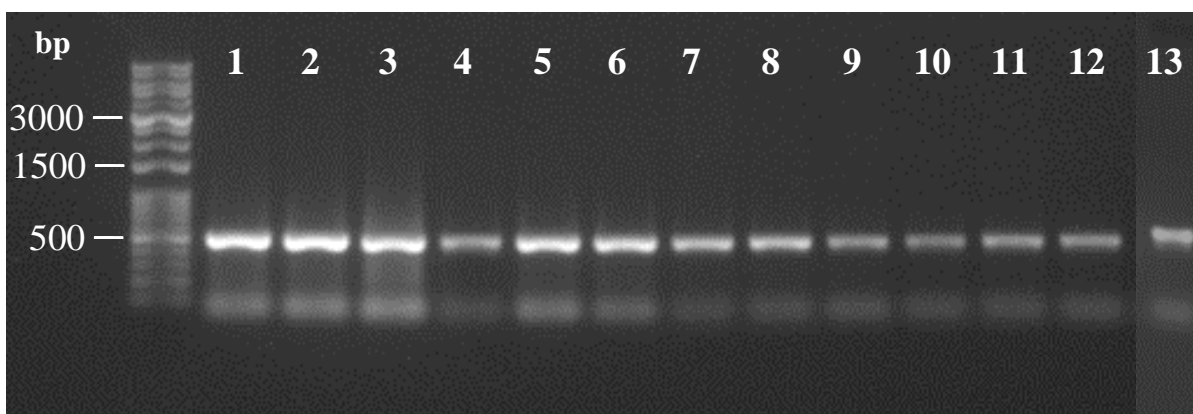
Obrázek 9: Výsledky detekce elementu *Pr-Mariner* u mravenců. Očekávaná velikost amplifikovaného elementu: 1104 bp. Očekávaná velikost vnitřní kontroly (amplifikace části 18S rDNA): 516 bp. **1:** *Myrmica sabuleti*, **2:** *Tapinoma erraticum*, **3:** *Tetramorium cf. caespitum*, **4:** *Formica rufibarbis*, **5:** *Lasius alienus*, **6:** *Lasius fuliginosus*, **7:** *Myrmica ruginodis*, **8:** *Lasius flavus*, **9:** *Dolichoderus quadripunctatus*, **10:** *Camponotus ligniperda*, **11:** *Formica sanguinea*, **12:** *Formica pratensis*, **13:** *Liometopum microcephalum*.



Obrázek 10: Výsledky detekce elementu *Pr-Ty3/Gypsy* u mravenců. Očekávaná velikost amplifikovaného elementu: 1050 bp. Očekávaná velikost vnitřní kontroly (amplifikace části 18S rDNA): 516 bp. **1:** *Myrmica sabuleti*, **2:** *Tapinoma erraticum*, **3:** *Tetramorium cf. caespitum*, **4:** *Formica rufibarbis*, **5:** *Lasius alienus*, **6:** *Lasius fuliginosus*, **7:** *Myrmica ruginodis*, **8:** *Lasius flavus*, **9:** *Dolichoderus quadripunctatus*, **10:** *Camponotus ligniperda*, **11:** *Formica sanguinea*, **12:** *Formica pratensis*, **13:** *Liometopum microcephalum*.



Obrázek 11: Výsledky detekce elementu *Lc-P element* u mravenců. Očekávaná velikost amplifikovaného elementu: 1429 bp. Očekávaná velikost vnitřní kontroly (amplifikace části 18S rDNA): 516 bp. **1:** *Myrmica sabuleti*, **2:** *Tapinoma erraticum*, **3:** *Tetramorium cf. caespitum*, **4:** *Formica rufibarbis*, **5:** *Lasius alienus*, **6:** *Lasius fuliginosus*, **7:** *Myrmica ruginodis*, **8:** *Lasius flavus*, **9:** *Dolichoderus quadripunctatus*, **10:** *Camponotus ligniperda*, **11:** *Formica sanguinea*, **12:** *Formica pratensis*, **13:** *Liometopum microcephalum*.



Obrázek 12: Výsledky detekce elementu *Lc-Ty3/Gypsy* u mravenců. Očekávaná velikost amplifikovaného elementu: 1130 bp. Očekávaná velikost vnitřní kontroly (amplifikace části 18S rDNA): 516 bp. **1:** *Myrmica sabuleti*, **2:** *Tapinoma erraticum*, **3:** *Tetramorium cf. caespitum*, **4:** *Formica rufibarbis*, **5:** *Lasius alienus*, **6:** *Lasius fuliginosus*, **7:** *Myrmica ruginodis*, **8:** *Lasius flavus*, **9:** *Dolichoderus quadripunctatus*, **10:** *Camponotus ligniperda*, **11:** *Formica sanguinea*, **12:** *Formica pratensis*, **13:** *Liometopum microcephalum*.