

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Analýza pohlavních chromozomů modrásků (Lycaenidae)

Diplomová práce

Bc. Monika Kreklová

Školitel: RNDr. Petr Nguyen, Ph.D.

České Budějovice 2020

Kreklová M (2020) Analýza pohlavních chromozomů modrásků (Lycaenidae) [Analysis of sex chromosomes of blue butterflies (Lycaenidae). Mgr. Thesis, in Czech] – 58 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

The present thesis investigates karyotypes and sex chromosomes in selected species of blue butterflies of the subfamily Polyommatae by means of molecular cytogenetics and bioinformatics.

Finanční podpora:

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

Prohlášení:

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

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

V Českých Budějovicích dne 22. 5. 2020

.....

Bc. Monika Kreklová

Poděkování:

V první řadě bych chtěla poděkovat mému školiteli Petrovi za vedení mé diplomové práce, za všechny jeho cenné rady a připomínky, za trpělivost, kterou se mnou měl, a hlavně za možnost pracovat v jeho laboratoři na opravdu zajímavém tématu. Zároveň bych také chtěla poděkovat Petrovi Kouteckému, Mgr. Scheinostovi a Dr. Lehnerové za jejich ochotnou pomoc. Dále děkuji Aničce za pomoc se zpracováním bioinformatických dat a poskytnutí výsledků array CGH, Irence s Kájou, za poskytnutí chromozomálních preparátů a velký dík patří také Martě, která mi neváhala kdykoliv se vším poradit či pomoci. Zároveň děkuji všem spolupracovníkům za přátelskou atmosféru v naší laboratoři. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem svým přátelům a hlavně rodině, bez jejichž podpory bych studium jen těžko zvládala.

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Pohlavní chromozomy	1
1.1.1. Chromozom Z.....	2
1.1.2. Chromozom W.....	3
1.2. Neo-pohlavní chromozomy.....	6
1.3. Nestabilita genomu modrásků (Lycaenidae)	9
2. Cíle práce	11
3. Metody.....	12
3.1. Molekulárně-cytogenetická analýza	12
3.1.1. Materiál.....	12
3.1.3. Příprava chromozomálních preparátů.....	14
3.1.4. Izolace genomové DNA (gDNA).....	14
3.1.5. Syntéza telomerického templátu (TTAGG) _n	15
3.1.6. PCR s 18S-Gal-primery	15
3.1.7. Značení hybridizačních sond.....	16
3.1.8. Barvení lakto-aceto-orceinem	16
3.1.9. Genomová <i>in situ</i> hybridizace (GISH).....	17
3.1.10. Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace telomerických sekvencí (telo-FISH).....	18
3.1.11. FISH s 18S rDNA sondou (rDNA FISH).....	18
3.2. Bioinformatická analýza.....	19
3.2.1. Identifikace pohlavně vázaných „scaffoldů“ u ostruháčka <i>Calycopis cecrops</i>	19
3.2.2. Identifikace pohlavně vázaných transkriptů u modráška <i>Polyommatus icarus</i>	20
4. Výsledky	22
4.1. Molekulárně-cytogenetická analýza	22
4.2. Bioinformatická analýza.....	36
5. Diskuze	41
6. Souhrn	48
7. Literatura.....	49

1. Úvod

1.1. Pohlavní chromozomy

Doposud bylo popsáno přes 130 000 druhů motýlů (Beccaloni a kol. 2003), z nichž byla karyotypována pouze malá část a jen u několika druhů byly identifikovány jednotlivé chromozomy. Důvodem je uniformita malých a početných motýlích metafázních chromozomů. Identifikaci jednotlivých chromozomálních párů v karyotypu motýlů klasickými cytogenetickými metodami také komplikuje absence lokalizované centromery a nefunkčnost klasických proužkovacích technik (Traut a kol. 2007). Jen v některých případech tak bylo možné identifikovat skupinu větších chromozomů, které lze snadno odlišit od zbytku komplementu (Lukhtanov a kol. 1997, Fuková a kol. 2005). Chromozomy ve stádiu pachytene mohou někdy vykazovat specifický chromomerový vzor, což Traut (1976) využil k mapování některých chromozomů bource morušového (*Bombyx mori*). Nicméně tato metoda neumožňuje identifikovat všechny chromozomy, jelikož některé nevykazují dostatečně variabilní chromomerový vzor. Díky rozvoji molekulárně-cytogenetických metod jsme však dnes schopni identifikovat přímo jednotlivé chromozomy v pachytenních komplementech motýlů pomocí metody fluorescenční *in situ* hybridizace a jejích variant (Yoshido a kol. 2005a, Goldsmith a Marec 2010).

Motýli (Lepidoptera) mají společně s ptáky a většinou hadů (výjimku tvoří recentně popsaná konstituce XX/XY u některých zástupců nadčeledi Henophidia; Gamble a kol. 2017) chromozomální určení pohlaví typu *Abxaxas*, kde je samičí pohlaví heterogametické, tj. určené konstitucí chromozomů Z0 nebo WZ, zatímco samčí pohlaví je homogametické, tedy ZZ. Jsou tak společně se sesterskou skupinou chrostíků (Trichoptera) jedinými hmyzími zástupci s výhradně heterogametickými samicemi (Traut a kol. 2007). Z toho důvodu se předpokládá, že se tento způsob determinace pohlaví vyvinul u jejich společného předka, a to již před více jak 300 miliony let (Kawahara a kol. 2019). Zatímco systém Z0/ZZ patrně u motýlů a chrostíků představuje ancestrální stav, konstituce WZ/ZZ byla nalezena u většiny motýlů řazených do odvozeného taxonu Ditrysia, který zahrnuje 98 % všech žijících druhů. Kromě základní konstituce u motýlů také často nacházíme numerické varianty jako je W_1W_2Z/ZZ a $WZ_1Z_2/Z_1Z_1Z_2Z_2$, které jsou výsledkem chromozomálních přestaveb. Systém Z0/ZZ může vzniknout také druhotně ztrátou chromozomu W (Traut a Marec 1996).

U motýlů není, až na bource *B. mori*, dodnes zcela známá molekulární podstata určení pohlaví. U jedinců Z0/ZZ je pohlaví patrně dáno počtem pohlavních chromozomů (Sahara kol. 2011). Vývoj samice je indukovan přítomností jednoho chromozomu Z. Jsou-li přítomné dva

chromozomy Z, vyvine se samec. Stejně tak tomu je například u ptáků, kde je diferenciace pohlaví určena pravděpodobně množstvím genové dávky genu DMRT1 („*Doublesex and mab-3 related transcription factor 1*“) nacházejícím se na chromozomu Z (Smith a kol 2009, Lambeth a kol. 2014). Kiuchi a kol. (2014) identifikovali u bource morušového, *B. mori*, Z-vázaný gen *Masc* („*Masculinizer*“), který je klíčový pro determinaci pohlaví. Nicméně autoři ukázali, že je tento gen kontrolován faktorem *Fem* nacházejícím se na chromozomu W, který určuje samičí pohlaví. Z tohoto genu je transkribována krátká *Fem* piRNA („piwi interacting RNA“), antisense RNA ke genu *Masc*, která umlčuje jeho expresi, což vede k vývoji samičího pohlaví (Tazima 1964, Kiuchi a kol. 2014). Dosud není známo, zda jde u motýlů o univerzální mechanismus determinace pohlaví, protože u martináče *Samia cynthia* ssp. z příbuzné čeledi Saturniidae byla role chromozomu W v determinaci pohlaví vyloučena (Yoshido a kol. 2016).

1.1.1. Chromozom Z

Na rozdíl od chromozomu W, byl chromozom Z u *B. mori* osekvenován společně s celým genomem hned dvěma nezávislými skupinami z Číny a Japonska (Xia a kol. 2004, Mita a kol. 2004). Svým molekulárním složením je podobný autozomům. Je tvořen euchromatinem a obsahuje řadu genů. Z-vázané geny jsou často zapojovány v larválním vývoji, adaptaci na prostředí či reprodukční izolaci (Kroemer a kol. 2011).

Jelikož jsou geny na chromozomu Z u heterogametického pohlaví v hemizygotním stavu, jsou jejich recesivní mutace vystaveny působení selekce. Na druhou stranu malá efektivní velikost populace chromozomu Z, která může být ještě snížena rozdílnou reprodukční úspěšností samců, může zvyšovat sílu genetického driftu a tím vést k rychlé fixaci mutací. Výsledkem těchto procesů je patrně tzv. efekt rychlé evoluce chromozomu Z („*Faster-Z effect*“), popsáný například u ptáků a hadů, podle kterého se geny na chromozomu Z vyvíjí rychleji než autozomální geny (Mank a kol. 2010). Nicméně zatímco u ptáků je efekt rychlé evoluce chromozomu Z způsoben zejména genetickým driftem, tj. efektivní velikostí populace chromozomu Z, u motýlů, kteří mají obecně větší efektivní velikost populace než ptáci, je tento efekt připisován spíše pozitivní selekci (Sackton a kol. 2014).

Genetické mapy chromozomu Z byly sestaveny nejen u modelového organismu *B. mori* (Bombycidae), ale i u dalších druhů jako je například drsnokřídlec *Biston betularia* (Geometridae; Van't hof a kol. 2013). Ačkoliv jsou tyto druhy od sebe poměrně vzdálené, byla mezi nimi potvrzena shodná lokalizace genů vázaných na chromozom Z, jako je například

gen *trióza-fosfát izomeráza* (*Tpi*) a gen *period* (Van't hof a kol. 2013). Gen *Tpi* byl také detekován na chromozomu Z u babočky *Heliconius melpomene* (Nymphalidae; Jiggins a kol. 2005), otakárka *Papilio glaucus* (Papilionidae; Scriber a kol. 1996) a zavíječe *Ostrinia nubilalis* (Crambidae; Dopman 2004). Komparativní genomová analýza Fraïsse a kol. (2017) ukázala, že ve srovnání s pohlavně vázanými geny *B. mori* (N = 300) bylo u zástupce bazální čeledi Hepialidae, hrotnokřídlece *Triodia sylvina* na chromozom Z vázáno 67 % jejich ortologů a u zástupce odvozenější čeledi Adelidae, adély *Nemophora degeerella*, to bylo dokonce 93 %. Bylo tak ukázáno, že chromozom Z obsahuje syntenní bloky konzervované v rámci řádu motýlů. Konzervovanost syntenie chromozomu Z je v souladu s Ohnovo hypotézou, která předpokládá, že genetický obsah pohlavního chromozomu X savců je extrémně konzervovaný (Ohno citovaný v Pathak a Stock 1974). Evoluční stabilita se tak jeví jako obecná vlastnost pohlavních chromozomů X a Z. Na základě porovnání genetické mapy genů okáče *Biston betularia* s genomem bource *B. mori* byla však pozorována větší míra intrachromozomálních přestaveb na chromozomu Z ve srovnání s autozomy, u nichž je zpravidla pořadí genů značně konzervované (Van't Hof a kol. 2013). Tyto výsledky potvrzují, že na chromozomu Z dochází v evoluci také k dynamickým chromozomálním přestavbám v podobě inverzí, díky kterým může hrát chromozom Z významnou roli v adaptivní evoluci a procesu speciace (Van't Hof a kol. 2013).

1.1.2. Chromozom W

Stejně jako chrostíci mají i bazální motýli chromozomální určení pohlaví Z0/ZZ. Jednou z výjimek je nadčeď Hepialoidea a čeď Tischeriidae, u kterých byl detekován pohlavní chromozom W (Voleníková 2015, Lukhtanov 2000). Ten však zpravidla nacházíme až u většiny zástupců pokročilé skupiny Ditrysia s výjimkou bazálních čeledí Psychidae a Tineidae. Chromozom W tedy vznikl v průběhu evoluce motýlů mnohokrát nezávisle (Dalíková a kol. 2017). Původ pohlavního chromozomu W je možné vysvětlit třemi způsoby. První dvě hypotézy tvrdí, že chromozom W je autozomálního původu. Dle první chromozom W vznikl prostřednictvím přeměny ancestrálního chromozomu Z zpět na autozom a následnému vzniku pohlavních chromozomů Z a W z jiného páru autozomů (Fraïsse a kol. 2017). Ačkoliv je takováto přeměna nezvyklá, například Vicoso a Bachtrog (2015) zjistily, že k ní došlo opakovaně u některých druhů much a komárů. Druhá hypotéza předpokládá, že ancestrální chromozom Z ze systému Z0/ZZ zřúzoval s autozomem, jehož maternálně děděný homolog diferencioval v chromozom W (Traut a Marec 1997). Dle třetí hypotézy pak chromozom W vznikl *de novo* z nadpočetného chromozomu B (Lukhtanov 2000). Srovnávací analýza

pohlavně vázaných genů provedená Fraïsse a kol. (2017) podporuje nekanonický vznik chromozomu W z B chromozomu u ditrisijních motýlů. Práce Dalíkové a kol. (2017) bere v potaz mnohočetný původ chromozomu W a naznačuje dva možné scénáře vzniku pohlavního chromozomu W: i) dvě nezávislé adopce chromozomu B u čeledi Tischeriidae a skupiny Ditraysia nebo ii) chromozomální fúzi autozomu s ancestrálním chromozomem Z u čeledi Tischeriidae a adopci chromozomu B u skupiny Dytrisia.

Podobně jako u savců, také u motýlů najdeme v interfázních komplementech pohlavně specifický heterochromatin, avšak u heterogametického pohlaví. Sex chromatin motýlů je tvořen právě chromozomem W (Ito 1977), což dokazuje jeho absence u jedinců s chromozomálním určením pohlaví Z0 (Traut a kol. 2007) a barvicí sondy připravené laserovou mikrodisekcí sex chromatinu např. u obaleče *Cydia pomonella*, které při fluorescenční *in situ* hybridizaci specificky hybridizovaly právě s chromozomem W (Fuková a kol. 2007).

Rozdílná morfologie pohlavních chromozomů W a Z je jasně patrná ve stádiu pachytene, kdy tyto chromozomy vykazují odlišný chromomerový vzor. U bivalentu WZ tak lze u některých druhů identifikovat chromozom W díky jeho heterochromatinové struktuře. Avšak míra odlišnosti v chromomerovém vzoru se může mezi chromozomy Z a W mezi jednotlivými druhy značně lišit (Traut a Marec 1997).

Sahara a kol. (2003) identifikovali na chromozomu W dva možné typy repetitivních sekvencí a to W-specifické repetice a repetice, které jsou běžné u obou pohlaví a vyskytují se také na autozomech. Je známo, že repetitivní sekvence podléhají rychlé evoluci, která je navíc na chromozomu W ještě umocněna absencí rekombinace v důsledku samičí achiasmatické meiózy. Práce Vítková a kol. (2007) porovnávala chromozom W zástupců čeledi Pyralidae prostřednictvím barvicích sond a komparativní genomové hybridizace a odhalila, že chromozom W druhu *Cadra cautella* byl složený zejména z repetitivních sekvencí, které jsou běžné pro obě pohlaví. Tyto však nebyly detekovány u blízce příbuzných druhů *Ephestia kuehniella*, *Plodia interpunctella* a *Galeria mellonella*. Z toho vyplývá, že sekvenční složení chromozomu W se v průběhu evoluce rychle mění i mezi blízce příbuznými druhy.

Vzhledem k heterochromatinové povaze a velkému množství repetic, nebylo dosud možné chromozom W řádně osekvenovat, a proto víme o jeho molekulárním složení velmi málo. Analýzy Abe a kol. (2005) odhalily na chromozomu W bource *B. mori* přítomnost značného množství LTR („long terminal repeat“) a non-LTR retrotranspozonů, retropozonů, DNA transpozonů a jejich derivátů, které dohromady tvoří hlavní složku chromozomu W. Dodnes bylo identifikováno jen několik genů ležících na chromozomu W. Například

prostřednictvím polyploidizace a indukovaných translokací a delecí se podařilo Abe a kol. (2008) na chromozomu W *B. mori* lokalizovat výše zmíněný feminizační faktor *Fem*. Dalším zaměřeným genem na chromozomu W u *B. mori* je *Esd* („egg size-determining“) mající vliv na velikost vajíčka (Kawamura 1988). Marec a kol. (2001) na základě pozorování segregace pohlavních chromozomů mutantních linií *E. kuehniella*, předpokládají na chromozomu W přítomnost tzv. „male-killing“ faktoru znemožňujícího samčí vývoj. Van't Hof a kol. (2013) identifikovali na terminální části chromozomu W druhu *B. betularia* kopii Z-vázaného genu *laminin A*, který je lokalizován také na konci chromozomu Z. Autoři se domnívají, že k přenosu tohoto genu na chromozom W došlo druhotně prostřednictvím ektopické rekombinace.

V případě autozomálního původu chromozomu W lze předpokládat jeho postupnou degradaci, tj. akumulaci mobilních elementů a škodlivých mutací (Steinemann a kol. 1992), zapříčiněnou samičí achiasmatickou meiózou (Maeda 1939). Diferenciace a postupná ztráta genového obsahu je dle klasického modelu evoluce pohlavních chromozomů způsobena např. efektem tzv. Mullerovy rohatky („Muller's ratchet“), podle které vzhledem k nízké pravděpodobnosti zpětných mutací dochází při absenci rekombinace k akumulaci škodlivých mutací (Muller 1964, Charlesworth 1978). Společně s Mullerovou rohatkou má vliv na degradaci chromozomu W také genetické svezení se („genetic hitchhiking“), při kterém dochází k fixaci mutací, které jsou v těsné vazbě s výhodnými alelami (Rice 1987) a selekce na pozadí („background selection“), která znemožňuje fixaci nové prospěšné mutace vázané na nevýhodnou alelu (Charlesworth 1994, Traut a kol. 1999). Vzhledem k achiasmatické samičí meióze na chromozomu W motýlů navíc není přítomna žádná pseudoautozomální oblast jako je tomu například u chromozomu Y člověka (Pask a Graves 1999) a degradaci podléhá celý chromozom.

Nicméně molekulární složení pohlavního chromozomu W, tedy velké množství repetitivních sekvencí a mobilních elementů, je podobné molekulárnímu složení nadpočetných chromozomů B (Houben a kol. 2014). Jak již bylo zmíněno, současné poznatky naznačují nekanonický původ chromozomu W ditrisijních motýlů, a tak lze předpokládat, že chromozom W byl na repetitivní sekvence bohatý již od samého počátku a jeho současné molekulární složení není výsledkem diferenciace původního autozomu. Studium diferenciace pohlavního chromozomu W je tak možné jen u druhů s odvozenými neo-pohlavními chromozomy.

1.2. Neo-pohlavní chromozomy

Stejně jako autozomy, také pohlavní chromozomy motýlů podléhají chromozomálním přestavbám. Jednou z významných přestaveb pohlavních chromozomů jsou jejich fúze s autozomy za vzniku tzv. neo-pohlavních chromozomů. Neo-pohlavní chromozomy se běžně vyskytují u obratlovců, jako například u šupinatých plazů a ryb (Pennell a kol. 2015). Výsledky studie na koljuškách *Gasterosteus aculeatus* dokonce ukázaly, že nově vzniklý neo-X chromozom nese geny, které přispívají k reprodukční bariéře mezi blízkými příbuznými druhy. Chromozomální přestavby mezi pohlavními chromozomy a autozomy vedoucí ke vzniku neo-pohlavních chromozomů tak mohou hrát významnou roli ve speciaci (Kitano a kol. 2009). U hmyzu byly detekovány neo-pohlavní chromozomy různého stáří například u octomilek *Drosophila pseudoobscura*, *Drosophila miranda* a *Drosophila albomicans*. Jejich neo-pohlavní chromozomy reprezentují různá stadia molekulární degradace pohlavních chromozomů (Bachtrog 2013). Z toho důvodu jsou neo-pohlavní chromozomy vhodné pro studium diferenciací pohlavních chromozomů u taxonů, jejichž chromozomální systémy určení pohlaví jsou značně staré, a tedy i dobře diferencované. Ačkoliv jsou ptáci nejpočetnější obratlovcí skupinou s heterogametickými samicemi, neo-pohlavní chromozomy se zde objevují spíše výjimečně (Pennell a kol. 2015), například v nadčeledi Sylvioidea (Pala a kol. 2012, Dierickx a kol. 2020). Sigeman a kol. (2019) však při komparativní analýze čeledí Alaudidae a Panuridae identifikovali největší ptačí pohlavní chromozom sestávajícího dokonce ze čtyř chromozomů kuřete, jmenovitě Z, 3, 4A a 5.

Ačkoliv je u motýlů známa vysoká konzervovanost ve složení genomu mezi různými druhy, kdy modální karyotyp motýlů $n = 31$ představuje zároveň ancestrální organizaci jejich genomu (Ahola a kol. 2014), byly u mnoha skupin v nedávné době detekovány mnohočetné pohlavní chromozomy (Yoshido a kol. 2005b, Šíchová a kol. 2015). Existují dvě možná vysvětlení jejich vzniku. Například u systémů W_1W_2Z a WZ_1Z_2 mohly vzniknout chromozomy W_1 a W_2 nebo Z_1 a Z_2 rozpadem ancestrálního W či Z (Suomalainen 1969a). Mnohonásobná fragmentace pohlavních chromozomů vedla u bělásků rodu *Leptidea* ke vzniku druhově specifického pohlavního systému s mnohočetnými pohlavními chromozomy (Pospíšilová 2020). Na druhou stranu lze předpokládat, že mnohočetné pohlavní chromozomy vznikají fúzí (či translokacemi) ancestrálního chromozomu W nebo Z s autozomem, které jsou poté označovány jako neo- WZ_1Z_2 či neo- ZW_1W_2 (Suomalainen 1969b, Šíchová a kol. 2015).

Vzhledem k vysokému obsahu repetitivních sekvencí mohou být pohlavní chromozomy náchylnější k ektopické rekombinaci, způsobující chromozomální přestavby

(Pennell a kol. 2015). Na základě komparativní analýzy mezi obratlovci Pennell a kol. (2015) zjistili, že do fúze autozomů a pohlavních chromozomů je chromozom Y zapojen častěji než chromozom X. Navíc u ptáků k akumulaci repetitivních sekvencí nedochází pouze na chromozomu W, ale také na chromozomu Z. Bellott a kol. (2010) zjistili, že se na kuřecím chromozomu Z nachází menší hustota genů než na autozomech, avšak zároveň obsahuje o 60 % více repetitivních sekvencí. Hromadění repetitivních sekvencí na chromozomu Z je tak pravděpodobně způsobené sníženým množstvím jeho rekombinace a menší velikostí efektivní populace. Podobně byla u motýlů potvrzena vyšší tendence k inter- a intrachromozomálním přestavbám u malých chromozomů, které mají vyšší podíl repetitivních sekvencí, zatímco u velkých chromozomů byla pozorována větší stabilita (Aholá a kol. 2014). Můžeme proto předpokládat, že repetitivní sekvence na pohlavních chromozomech motýlů zprostředkovávají fúze mezi autozomy a pohlavními chromozomy.

Vzniklé fúze by pak mohly být fixovány prostřednictvím meiotického drivu. Při samičí meióze jen jedna ze čtyř vznikajících buněk dává vzniknout vajíčku, zatímco zbylé tři pólové buňky zanikají. Samičí meióza je tak asymetrická a homologní chromozomy spolu soutěží o začlenění do vaječné buňky. Vlivem meiotického drivu pak může docházet k nenáhodné segregaci chromozomů, a tedy preferenčnímu začlenění určitých chromozomů do vaječné buňky (Sandler a Novitski 1957). Obdobou meiotického drivu je pak centromerický drive, při kterém rozhoduje o začlenění do vaječné buňky velikost centromery s přiléhajícím kinetochorem a množství na něj navázaných mikrotubulů (de Villena a Sapienza 2001). Bylo potvrzeno, že u některých savců vlivem meiotického drivu pohlavní chromozomální systém XY_1Y_2 převažuje u druhů s karyotypem složeným zejména z dvouramenných chromozomů, zatímco systém X_1X_2Y je nejčastěji u jedinců s převahou akrocentrických chromozomů (Yoshida a Kitano 2012). Zatímco se u obratlovců s heterogametickými samci často vyskytují mnohonásobné pohlavní systémy (Yoshida a Kitano 2012), u ptáků, jejichž samice jsou heterogametické, mnohonásobné pohlavní systémy až na výjimku tučňáků rodu *Pygoscelis* chybí (Gunki a kol. 2017). Pokorná a kol. (2014) se domnívají, že je za to zodpovědný právě meiotický drive. Podle jejich hypotézy o začlenění do vajíčka u ptáků soutěží během samičí meiózy oba pohlavní chromozomy a drive by vedl k vychýlení poměru pohlaví. Nicméně motýli mají tzv. holokinetické chromozomy, tj. postrádají strukturně vymezenou centromeru a kinetochor pokrývá téměř celou délku chromozomu (Murakami a Imai 1974), které dle některých názorů představují adaptaci bránící centromerickému drivu (Malik a Henikoff 2009).

Díky holocentrické struktuře chromozomů také dochází k řádné segregaci produktů chromozomálních přestaveb (fúze a fragmentace). Všechny fragmenty vzniklé rozpadem chromozomu jsou navázány na dělicí vřeténko a nemohou tak být ztraceny během buněčného dělení jako by tomu bylo u metacentrických chromozomů. Podobně nenastává problém ani v případě chromozomální fúze, při které by v případě metacentrických chromozomů vznikaly dicentrické můstky (Kandul a kol. 2004). Podle výsledků analýzy provedené u bělásků rodu *Leptidea* Lukhtanovem a kol. (2018) je správná segregace multivalentů zajištěna prostřednictvím invertované meiózy (tzv. postredukční dělení). Při ní na rozdíl od kanonického tzv. preredučního dělení dochází nejprve k segregaci sesterských chromatid v meióze I (Banno a kol. 1995). U samic motýlů může přispět k balancované segregaci také achiasmatická meióza, při které nedochází ke crossing overu. Kombinace holokinetické aktivity a invertované meiózy tak teoreticky umožňuje rychlou karyotypovou evoluci u druhů s holokinetickými chromozomy (Lukhtanov a kol. 2018).

Jak již bylo zmíněno, neo-pohlavní chromozomy jsou vhodné pro studium diferenciace pohlavních chromozomů. Přesněji ty části neo-pohlavních chromozomů, o kterých víme, že jsou autozomálního původu. Využitím kombinace komparativní genomové a cytogenetické analýzy se podařilo Mongue a kol. (2017) potvrdit přítomnost neo-pohlavních chromozomů neo-Z a neo-W u monarchy *Danaus plexippus* a dalších druhů rodu *Danaus*. Neo-pohlavní chromozomy jsou tak společným znakem pro celý rod *Danaus* a vznikly tedy nejméně před 5 miliony let. Bylo také prokázáno, že tento neo-Z chromozom vznikl fúzí ancestrálního chromozomu Z a autozomu, který je homeologní k chromozomu 16 *B. mori*. Současně se autorům podařilo prostřednictvím cytogenetických metod vizualizovat bipartitní strukturu chromozomu W, kdy dvě třetiny chromozomu byly silně heterochromatizované, zatímco zbylá třetina vykazovala euchromatinové oblasti, což podporuje fúzi ancestrálního pohlavního chromozomu W a autozomu.

Také u všech doposud testovaných zástupců čeledi Tortricidae byly detekovány dva velké elementy odpovídající páru pohlavních chromozomů (Šíchová a kol. 2013). Komparativní fyzické mapování u obaleče *Cydia pomonella* ukázalo, že jde o neo-pohlavní chromozomy vzniklé fúzí pohlavního chromozomu a autozomu odpovídajícímu chromozomu 15 referenčního druhu *B. mori* (Nguyen a kol. 2013). Tato fúze byla potvrzena i u dalších zástupců čeledi Tortricidae, a proto se zdá, že neo-pohlavní chromozomy vznikly již u společného předka podčeledí Tortricinae a Olethreutinae (Nguyen a kol. 2013).

Podobně jako u čeledi Tortricidae byl pozorován velký chromozomální pár u zástupců čeledi Pyralidae, Oecophoridae a Gelechiidae (Ennis 1976). Carabajal Paladino a kol. (2016)

identifikovali tento chromozomální pár jako pohlavní chromozomy u makadlovky *Tuta absoluta* z čeledi Gelechiidae. Testováním karyotypů zástupců nadčeledi Gelechioidea, která zahrnuje zmíněné čeledi Oecophoridae a Gelechiidae, byla potvrzena fúze pohlavních chromozomů s autozomy, které se objevily u společného předka tří hlavních linií nadčeledi Gelechioidea (Sohn a kol. 2016). Carabajal Paladino a kol. (2019) identifikovali u *T. absoluta* na neo-pohlavních chromozomech dva původně autozomální syntenní bloky, které jsou homeologní k autozomům 7 a 27 *B. mori*. Analýzy zástupců studovaných skupin ukázaly, že autozom 7 zfúzoval s pohlavním chromozomem u společného předka všech nadčeledí čeledi Gelechioidea. Takto vzniklý neo-pohlavní chromozom navíc u zástupců tribu Gnoreschemini (podčeď Gelechiinae) zfúzoval ještě s chromozomem 27.

Ačkoli tedy bylo u obratlovců s mnohočetnými pohlavními chromozomy zjištěna vyšší míra fúzí pohlavních chromozomů s autozomy u linií se samčím heterogametickými pohlavím (XX/XY) než u linií s heterogametickými samicemi (WZ/ZZ) (Pennell a kol. 2015), dochází k fúzím autozomů s pohlavními chromozomy u motýlů často a opakovaně. V mnoha případech fúzí s autozomy chromozom W i Z a neo-pohlavní chromozomy pak představují velký chromozomální pár (Carabajal Paladino a kol. 2019).

1.3. Nestabilita genomu modrásků (Lycaenidae)

Motýli a můry jsou známi svými stabilními karyotypy zachovanými mezi značně vzdálenými skupinami. Většina zástupců si udržela ancestrální počet chromozomů $n = 31$ (Robinson 1931). Ovšem u některých skupin jsou modální počty chromozomů nižší. Například modrásci (Lycaenidae) mají nejčastější počet chromozomů $n = 23-24$ (de Lesse 1960 citovaný v Robinson 1971). Nicméně právě u čeledi Lycaenidae najdeme největší rozptyl v počtu chromozomů, který kolísá od $n = 10$ po $n = 225$ chromozomů. Vlivem odlišných chromozomálních přestaveb se tak blízké příbuzné druhy navzájem drasticky liší v počtu chromozomů (Kandul a kol. 2004).

Téměř všichni modrásci s odvozeným vysokým počtem chromozomů patří do tří blízké příbuzných skupin podtribu Polyommatus, dříve rozlišovaných jako rody *Agrodiaetus* ($n = 10-125$), *Lysandra* ($n = 24-92$) a *Plebicula* ($n = 134-225$) (Kandul a kol. 2004). Rody *Plebicula* a *Agrodiaetus* patří dle nejnovější taxonomické analýzy do rodu *Polyommatus* (Talavera a kol. 2013a). V práci de Lesse (1969 citovaný v Schmitt a kol. 2001) bylo u modráska *Lysandra coridon* identifikováno $n = 87-88$ u španělské a francouzské populace, zatímco jedinci z Balkánu nesli sádku s vyššími počty chromozomů $n = 90-92$. Jednotlivé

populace tohoto druhu tedy vykazují dokonce intraspecifickou variabilitu v počtu chromozomů napříč Evropou. Ke zmnožení počtu chromozomů v rámci těchto rodů čeledi Lycaenidae pravděpodobně nedochází prostřednictvím polyploidizace, ale prostřednictvím mnohonásobných chromozomálních fúzí a rozpadů, protože je relativní velikost chromozomů nepřímo úměrná jejich počtu (Lorković 1990 citovaný v Kandul a kol. 2007). Jednoznačný důkaz potvrzující toto tvrzení však stále chybí.

Jelikož se nestabilita karyotypu objevila u modrásků minimálně třikrát v podčeledi Polyommatinae, lze předpokládat, že má tato skupina motýlů predispozici pro chromozomální přestavby. Kandul a kol. (2004) zvažují možnost, že karyotypová diverzifikace u skupiny *Agrodiaetus* by mohla být způsobena šířením mobilních elementů horizontálním přenosem z příbuzných rodů *Lysandra* a *Plebicula*. Vzhledem k tomu, že u rodu *Agrodiaetus* došlo v relativně krátkém časovém období k extrémní mezidruhové karyotypové diverzifikaci ($n = 10-125$), Kandul a kol. (2007) provedli srovnávací fylogenetickou analýzu, aby otestovali, zda v tomto rodu chromozomální přestavby přispívají ke vzniku nových druhů. Zjistili, že počty chromozomů mezi mladými sympatrickými páry jsou mnohem odlišnější než mezi odpovídajícími alopatickými páry. Potvrdili tak přímou roli chromozomálních přestaveb ve finálních fázích procesu speciace. Další fylogenetické komparativní analýzy u rodu *Agrodiaetus* odhalily korelaci mezi množstvím změn v karyotypu a délkou fylogenetických větví (Vershina a Lukhtanov 2017). Zároveň byla u těchto rodů potvrzená zvýšená diverzifikační rychlost (Kandul a kol. 2007, Talavera a kol. 2013b). Ačkoliv se rod *Agrodiaetus* oddělil teprve před 2,3 miliony lety, je tvořen více jak 120 druhy. Mnohem starší rod *Lysandra*, který sice obsahuje pouze kolem patnácti druhů (Talavera a kol. 2013a), se oddělil již před 4,9 miliony lety. Nicméně bylo prokázáno, že k diverzifikaci tohoto rodu došlo výrazně později, a to teprve zhruba před 1.45 miliony lety (Talavera a kol. 2013b).

Jelikož se například u podrodu *Agrodiaetus* častěji setkáváme s vyššími počty chromozomů, než je ancestrální počet $n = 23/24$, dochází u modrásků patrně častěji k fragmentacím než k chromozomálním fúzím. Nicméně, například u modráska s vysokým počtem chromozomů *Polyommatus (Agrodiaetus) damone damone* byly v karyotypu pozorovány dva výrazně velké chromozomy (Lukhtanov a kol. 1997). Ačkoli dle Ennise (1976) je pravděpodobné, že velké chromozomy jsou výsledkem fúze autozomů, White (1946 citovaný v Robinson 1971) se domníval, že největší chromozomy pozorované u modrásků s vysokým počtem chromozomů představují pohlavní chromozomy. To by naznačovalo, že pohlavní chromozomy dokážou zatím neznámým způsobem odolávat chromozomálním fragmentacím (White 1946 citovaný v Robinson 1971).

2. Cíle práce

Díky mezidruhové karyotypové variabilitě jsou modrásci vhodným modelovým systémem pro studium role chromozomálních změn při procesu speciace. Předběžná data naznačují, že v karyotypové evoluci modrásků došlo k opakovaným fúzím mezi pohlavními chromozomy a autozomy (Provazníková I a Nguyen P, nepublikované výsledky).

Cílem této práce je proto stanovení velikosti genomu a analýza pohlavních chromozomů vybraných druhů modrásků prostřednictvím molekulárně cytogenetických metod a testování následujících hypotéz: i) ke zvyšování počtu chromozomů u modrásků dochází polyploidizací, ii) velký chromozomální pár pozorovaný v karyotypech modrásků s vysokým počtem chromozomů je výsledkem autozomálních fúzí a iii) v evoluci modrásků došlo k fragmentaci pohlavních chromozomů.

3. Metody

3.1. Molekulárně-cytogenetická analýza

3.1.1. Materiál

Studované druhy modrásků podčeledi Polyommatinae byly odchyceny z přírodních populací České republiky a Španělska. Výjimku představoval pouze druh *Polyommatus dorylas* jehož housenky byly pro cytogenetickou analýzu poskytnuty Pavlem Skálou ze záchovného chovu pocházejícího z české populace. Seznam všech testovaných druhů využitých při hybridizacích a průtokové cytometrii je spolu s místem původu uveden v Tab. I a II. Pro stanovení velikostí genomu byl jako standard vybrán laboratorní kmen WT-C zavíječe moučného (*Ephestia kuehniella*), jenž byl chován při teplotě 21 ± 1 °C a fotoperiodě 12 h den a 12 h noc na pšeničném šrotu, doplněném sušenými pivovarskými kvasnicemi (Marec 1990). Odchycení samci modrásků byli zamrazeni ponořením do tekutého dusíku a uchováni při -80 °C. Oplozené samice modrásků byly v plastové krabičce ponechány při normálním denním a nočním režimu, kde nakladly vajíčka na živnou rostlinu. Vylíhlé housenky byly chovány do 5. instaru a poté použity na přípravu chromozomálních preparátů, zamraženy a uchovány při -80 °C. Živnou rostlinou housenek modráska jetelového (*Polyommatus bellargus*) a modráska vikvicového (*Lysandra coridon*) byla čičorka pestrá (*Coronilla varia*), jedinci modráska jehlicového (*Polyommatus icarus*) byli krmeni štírovníkem růžkatým (*Lotus corniculatus*) a housenky modráska komodincového (*Polyommatus dorylas*) úročníkem bolhojem (*Anthyllis vulneraria*). Jedinci španělského druhu *Polyommatus escheri* byly živeny na kozinci (*Astragalus monspessulanus*).

Tab. I: Seznam druhů testovaných prostřednictvím hybridizací včetně počtu chromozomů v haploidním komplementu a místem odchyty.

Druh	Počet chromozomů (2n)	Lokalita odchyty
<i>Polyommatus icarus</i>	46 ^a	České Budějovice, CZ
<i>Polyommatus escheri</i>	46 ^b	Přírodní park Montseny, Barcelona, ESP
<i>Lysandra bellargus</i>	90 ^a	Hády, Brno, CZ
<i>Lysandra coridon</i>	174-184 ^c	Týnčany, CZ
<i>Polyommatus dorylas</i>	298-302 ^d	záchovný chov, Pavel Skála, CZ

^aNguyen a kol. (2010); ^bde Lesse (1953) citovaný v Robinson (1971); ^cde Lesse (1969) citovaný v Schmitt a kol. (2001); ^dLorković (1990) citovaný ve Wiemers (2003).

Tab. II: Seznam druhů testovaných prostřednictvím průtokové cytometrie včetně počtu chromozomů v diploidním komplementu a místem odchyty.

Druh	Počet chromozomů (2n)	Lokalita odchyty
<i>Polyommatus icarus</i>	46 ^a	Suchdol nad Lužnicí, CZ
<i>Polyommatus icarus</i>	46 ^a	Přírodní park Montseny, Barcelona, ESP
<i>Polyommatus escheri</i>	46 ^b	Přírodní park Montseny, Barcelona, ESP
<i>Polyommatus thersites</i>	48 ^c	Přírodní park Montseny, Barcelona, ESP
<i>Polyommatus hispana</i>	168 ^d	Figols, Barcelona, ESP a Peguera, Majorca, ESP
<i>Lysandra coridon</i>	174-184 ^e	Hády, Brno, CZ
<i>Polyommatus ripartii</i>	180 ^f	Přírodní park Montseny, Barcelona, ESP
<i>Polyommatus fulgens</i>	206 ^f	Přírodní park Montseny, Barcelona, ESP

^aNguyen a kol. (2010); ^bde Lesse (1953) citovaný v Robinson (1971); ^cLorković (1941) citovaný v Kandul a kol. (2004); ^dDescimon a Mallet (2009); ^ede Lesse (1969) citovaný v Schmitt a kol. (2001); ^fMunguira a kol. (1994).

3.1.2. Měření velikosti genomu

Měření velikosti genomu druhů uvedených v Tab. II bylo provedeno na průtokovém cytometru CyFlow SL (zdrojem světla je laser o vlnové délce 532 nm; Partec GmbH., Münster, Německo) ve spolupráci s Mgr. Petrem Kouckým, Ph.D. v Laboratoři molekulární biologie

roślin PřF JU v Českých Budějovicích. Analýza byla provedena použitím mozkové tkáně zamražených samců. Jako standard byl využit zavíječ *E. kuehniella* se známou velikostí genomu $1C = 0,45$ pg (Buntrock a kol. 2012). Detailní postup měření velikosti genomu prostřednictvím průtokové cytometrie včetně zpracování dat je popsán v bakalářské práci Kreklová (2017). Velikost genomu byla vždy měřena na třech jedincích jednoho druhu, výjimkou byl druh *P. fulgens* u kterého byl z důvodu nedostatku materiálu měřen pouze jeden jedinec.

3.1.3. Příprava chromozomálních preparátů

Chromozomální preparáty byly připraveny tzv. „spreading“ metodou podle práce Mediouni a kol. (2004). Larvy modrásků byly v posledním instaru pitvány ve fyziologickém roztoku (Glaser 1917 citovaný v práci Lockwood 1961; 0,9% NaCl, 0,042% KCl, 0,025% CaCl₂, 0,02% NaHCO₃). Vypitvané křídlní imaginální disky byly inkubovány nejprve v hypotonického roztoku 0,075 M KCl po dobu 10 min s následnou fixací 15-30 min ve fixáži dle Carnoye (etanol, chloroform a kyselina mravenčí v poměru 6:3:1). Ovaria byla přímo fixována na 15-30 min bez předcházející hypotonizace. Takto fixované tkáně byly následně přeneseny wolframovou jehlou na podložní sklo očištěné v kyselém etanolu (1% HCl v etanolu) a macerovány v kapce 60% kyseliny octové. Po maceraci bylo sklíčko přeneseno na histologickou ploténku vyhřátou na 45 °C, kde byla kapka s materiálem rozprostřena po sklíčku pomocí wolframové jehly až do téměř úplného vypaření. Takto připravené chromozomální preparáty byly odvodněny v etanolové řadě (po 30-60 s v 70 %, 80 % a 100 % etanolu) a uchovány v mrazáku při -80 °C do dalšího použití. Zbýlá těla housenek (samic i samců) byla jednotlivě zamražena v tekutém dusíku pro pozdější izolaci genomové DNA a skladována v mrazáku při teplotě -80 °C.

3.1.4. Izolace genomové DNA (gDNA)

Ze zamražených housenek či imág byla provedena extrakce gDNA pomocí cetyltrimethylamoniumbromidu (CTAB) dle protokolu Winnepenninckx a kol. (1993). Tkáň byla homogenizována a inkubována 15-17 h při teplotě 37 °C v extrakčním pufru (0,1 g tkáň/2,5 ml extrakčního pufru) obsahujícího 2% CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8), 40 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 0,2% β-merkaptioetanol a 0,1 mg/ml proteinázu K. Po inkubaci byl přidán stejný objem chloroformu s následnou centrifugací 15 min při 9 000 rpm a teplotě 4 °C. Do nové zkumavky byla opatrně odebraná pouze vodná fáze s gDNA. K vodné fázi byla přidána

RNáza A jejíž výsledná koncentrace byla 50 mg/ml extrakčního pufru. Směs byla inkubována 30 min při teplotě 37 °C. Poté byla směs spolu s 2/3 objemu isopropanolu precipitována 2 h při pokojové teplotě. Vysrážená DNA byla centrifugována při teplotě 4 °C, 9 000 rpm na 15 min. Pelet byl pak ještě dvakrát promyt 70% etanolem a nakonec rozpuštěn ve vodě.

Koncentrace takto izolované gDNA byla změřena prostřednictvím Qubit 3.0 fluorometru (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a její kvalita zkontrolována spektrofotometricky na přístroji NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, USA).

3.1.5. Syntéza telomerického templátu (TTAGG)_n

Telomerický templát byl připraven prostřednictvím beztemplátové polymerázové řetězové reakce (PCR) popsané v Sahara a kol. (1999) s použitím primerů „forward“ (F) o sekvenci 5'-TAGGTTAGGTTAGGTTAGGT-3', a „reverse“ (R) o sekvenci 5'-CTAACCTAACCTAACCTAAC-3'. Složení reakce o objemu 100 µl bylo následující: 0,5 µM primer F, 0,5 µM primer R, 1x *Ex Taq* pufr, 0,8 mM dNTP mix, 2 U *Ex Taq* polymerázy (TaKaRa, Otsu, Japonsko). Při pozdějším opakování metody docházelo k syntéze krátkých amplikonů, proto byla snížena iniciální koncentrace obou primerů na 0,25 µM, čímž se zvýšila průměrná délka produktů. Teplotní profil reakce sestával z počáteční denaturace 90 s při 94 °C, následované 30 cykly denaturace 45 s při 94 °C, annealingu 30 s při 52 °C a syntézy 60 s při 72 °C. Závěrečná syntéza při 72 °C trvala 10 min. Následně byla provedena precipitace PCR produktu přidáním 1/10 celkového objemu 3 M octanu sodného a 2,5násobku 100% etanolu a inkubací 1 h v -80 °C. Vysrážená DNA byla centrifugována 20 min, 14 000 rpm při 4 °C, promyta 70% etanolem a opět centrifugována při 4 °C, 14 000 rpm na 5 min. Poté byl částečně oschlý pelet byl rozpuštěn přes noc ve vodě při teplotě 4 °C.

Získaný telomerický templát byl znovu přečištěn použitím kitu Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) a následně byla změřena jeho koncentrace pomocí Qubit 3.0 fluorometru (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) dle protokolu výrobce.

3.1.6. PCR s 18S-Gal-primery

Pomocí metody PCR byl amplifikován gen pro 18S ribozomální RNA (rDNA) z gDNA obaleče *Cydia pomonella* se specifickými primery F: 5'-CGATACCGCGAATGGCT-CAATA-3' a R: 5'-ACAAAGGGCAGGGACGTAATCAAC-3' (Fuková a kol. 2005). Složení reakce o objemu 25 µl bylo: 10 ng templátové DNA, 0,5 µM primer F, 0,5 µM

primer R, 0,2 mM dNTP, 1x *Ex Taq* pufr, 2 U *Ex Taq* polymeráza (TaKaRa, Otsu, Japonsko). Reakce probíhala v termocykléru s počáteční denaturací při 94 °C po dobu tří minut. Poté následovalo 30x opakování denaturace 1 min při teplotě 94 °C, nasedání primerů 1 min při 50 °C, syntéza 1 min při teplotě 72 °C. Závěrečná syntéza při teplotě 72 °C trvala 5 min.

PCR produkt byl poté přečištěn prostřednictvím kitu Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA) podle protokolu výrobce a následně byla změřena jeho koncentrace pomocí Qubit 3.0 fluorometru (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

3.1.7. Značení hybridizačních sond

Samičí izolovaná gDNA, telomerický templát vyrobený prostřednictvím beztemplátové PCR a templátová rDNA byly značeny metodou tzv. „nick translace“ fluorochromem Cy3-dUTP (Jenna Bioscience, Jena, Germany) nebo biotin-16-dUTP. Značící reakce o objemu 40 µl obsahovala ve všech reakcích 2 µg DNA, 1x nick translační pufr (5 mM Tris-HCl, 0,5 mM MgCl₂, 0,0005% BSA; pH 7,5), 10 mM β-merkaptoetanol, 50 µM dATP, 50 µM dCTP, 50 µM dGTP, 10 µM dTTP, 20 µM Cy3-dUTP/Fluorescein-12-dUTP/biotin-16-dUTP, 40 U DNA polymeráza I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a 0,01 U DNáza I. Značící reakce gDNA byla inkubována v 15 °C po dobu 3,5 h, v případě telomerické DNA a rDNA byla zkrácena doba inkubace na 1 h. Reakce byla zastavena přidáním 10x „loading“ pufru (50% glycerol, 250 mM EDTA, 5,9 mM bromphenol blue), jež byl v celkovém objemu 1x koncentrovaný.

3.1.8. Barvení lakto-aceto-orceinem

Chromozomální preparáty byly vyjmuty z mrazáku a odvodněny prostřednictvím etanolové řady (70% - 80% - 100% po dobu 30-60 s). Pro detekci W-specifického heterochromatinu byly preparáty obarveny 2,5% lakto-aceto-orceinem (2,5% orcein v 30% kyselině octové a 30% kyselině mléčné). Po 55 min inkubace při pokojové teplotě byl orcein odmyt destilovanou vodou. Ochlé chromozomální preparáty byly připravené k inspekci pod fázovým kontrastem mikroskopem Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Jena, Německo) s chlazenou CCD kamerou XM10. Pozice vyfocených chromozomálních komplementů byly zaznamenány pro dokumentaci pozdějších hybridizačních experimentů. Digitální snímky pořízené pomocí programu cellSens 1.9 (Olympus Europa Holding, Hamburg, SRN) byly upravovány v programu Adobe Photoshop, verze 9.0.

Odmytí imerzního oleje z preparátů bylo provedeno jejich ponořením na 1 min do xylenu a následně 1 min benzenu, který byl poté opláchnut destilovanou vodou. Inkubací chromozomálních preparátů 2 min v metanolu s kyselinou octovou (3:1) došlo k odmytí navázaného orceinu. Takto ošetřené chromozomální preparáty bylo možné použít pro fluorescenční *in situ* hybridizaci.

3.1.9. Genomová *in situ* hybridizace (GISH)

Pro detekci pohlavního chromozomu W na chromozomálních preparátech byla použita metoda genomové *in situ* hybridizace, která využívá fluorescenčně značené celogenomové sondy (Mediouni a kol. 2004).

Před samotnou denaturací preparátů bylo provedeno jejich ošetření roztokem RNázy A (100 µg/ml) inkubací 1 h v 37 °C, následované 30 min blokováním v 5x Denhardtovo reagens ve vodní lázni vyhřáté na 37 °C. Preparáty byly denaturovány při teplotě 68 °C 70% formamidem v 2x SSC po dobu 3,5 min a poté ihned odvodněny ve studeném 70 % etanolu (1 min) s následným dokončením etanolové řady (po 30-60 s v 80% a 100% etanolu).

Hybridizační směs na každý preparát obsahovala 250 ng samičí značené sondy, kompetitorovou DNA a 25 µg sonikované DNA z lososích spermií (Sigma-Aldrich). Jako specifický kompetitor byla použita samčí DNA (3 µg), která byla nejprve fragmentována inkubací 20 min při 99 °C. Hybridizační směs byla přesrážena přidáním 1/10 objemu 3 M octanu sodného a 2,5násobku objemu ledového 100% etanolu. Hybridizační směs byla při teplotě 4 °C centrifugována 20 min na 14 000 rpm. Vysrážená sonda byla promyta studeným 70% etanolem a znovu 10 min stočena. Vysrážená DNA byla při teplotě 37 °C rozpuštěna ve 50% deionizovaném formamidu a 10% dextran sulfátu v 2x SSC po dobu 30-45 min a denaturována při teplotě 90 °C po dobu 5 min a poté okamžitě zchlazena na ledu.

Na denaturované chromozomální preparáty bylo nanášeno 10 µl hybridizační směsi. Preparát byl překryt krycím sklem (24 x 50 mm) jehož okraje byly překryty kaučukovým lepidlem Fixogum (Marabuwerke GmbH, Tamm, SRN). Chromozomální preparáty byly takto hybridizovány po dobu 3 dnů při teplotě 37 °C.

Po třech dnech hybridizace bylo kaučukové lepidlo odstraněno a krycí skla odmočena ponořením do 1% Tritonu X-100 v 0,1x SSC. Chromozomální preparáty byly následně omyty v 1% Tritonu X-100 v 0,1x SSC vyhřátém na teplotu 62 °C po dobu 5 min a poté byly promyty 2 min v 1% Ilfotolu (Ilford). Na částečně oschlé preparáty byl nanášen roztok DAPI (2-(4-amidinophenyl)-1H-indole-6-carboxamidin) v DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan)

o finální koncentraci 0,5 µg/ml. Poté byl preparát překryt krycím sklem (24 x 50 mm) jehož okraje byly utěsněny lakem na nehty.

Dokumentace výsledků byla provedena ve fluorescenčním mikroskopu Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss, Jena, Německo). Vzhledem k zaznamenaným pozicím jader na chromozomálních preparátech dříve obarvených orceinem bylo snadné tytéž chromozomální komplementy znovu dohledat a zdokumentovat chlazenou CCD kamerou XM10 pomocí programu cellSens 1.9 (Olympus Europa Holding, Hamburg, SRN). V případě nebarvených preparátů byly pozice jednotlivých jader zaznamenány pro případ opakované hybridizace.

3.1.10. Fluorescenční *in situ* hybridizace telomerických sekvencí (telo-FISH)

Chromozomální preparáty, na kterých byla provedena GISH byly opakovaně hybridizovány tentokrát s telomerickou sondou. Preparáty byly nejdříve inkubovány 10-15 min ve vodě a následně byl pinzetou odstraněn lak na nehty. Krycí sklo bylo odmočeno v 2x SSC a preparáty byly poté dvakrát promyty v 2x SSC po dobu 5 min při pokojové teplotě. Následně byla provedena postfixace čerstvě připraveným 4% paraformaldehydem v 2x SSC po dobu 10 min. Preparáty byly znovu promyty třikrát v 2x SSC. Inkubací preparátů 10 min při teplotě 70 °C v 50% formamidu s 1% Tritonem X-100 v 0,1x SSC došlo k odmytí staré sondy a k denaturaci chromozomů, která byla zastavena ponořením na 2 min do vychlazeného 70% etanolu. Dále byly preparáty odvodněny etanolovou řadou. Tímto způsobem byly chromozomální preparáty denaturované a zbavené původní sondy, a tudíž připravené na aplikaci dalšího hybridizačního mixu.

Další postup telo-FISH byl stejný jako pro GISH (viz výše) až na složení hybridizačního mixu, které bylo následující: 150 ng značené telomerické sondy a 25 µg sonikované DNA z lososích spermii (Sigma-Aldrich).

3.1.11. FISH s 18S rDNA sondou (rDNA FISH)

Třetí hybridizací provedenou na chromozomálních preparátech byla fluorescenční *in situ* hybridizace s nepřímou detekcí biotinylované 18S rDNA sondy, která detekuje klastry genů pro hlavní ribozomální RNA (Fuková a kol. 2005).

Chromozomální preparáty byly opět zbaveny navázané sondy a denaturovány stejným postupem jako při předchozí hybridizaci. Hybridizační mix obsahoval 30 ng 18S rDNA sondy značené bitinem a 25 µg sonikované DNA z lososích spermii (Sigma-Aldrich). Jeho příprava byla stejná jako v případě GISH.

Následující den bylo provedeno odmytí nenavázané sondy. Krycí skla byla odstraněna krátkým ponořením preparátů do 50% formamidu v 2x SSC. Poté byla sklíčka třikrát promyta po 5 min v 50% formamidu v 2x SSC tentokrát vyhřátém na 46 °C. Při stejné teplotě byl odmyt formamid nejdříve ponořením 5 x 2 min do 2x SSC a poté byla skla třikrát promyta v 0,1x SSC vyhřátém na 62 °C po dobu 5 min. Nakonec byla sklíčka promyta v 0,1% Tween 20 v 4x SSC při pokojové teplotě po dobu 15 min.

Po promytí byla nescifická vazebná místa blokována 20 min inkubací blokujícím roztokem 2.5% BSA v 4x SSC za pokojové teploty. Inkubací skel 30 min se streptavidinem konjugovaným se Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc, West Grove, PA, US) došlo k detekci navázané sondy. Nenavázaný streptavidin byl odmyt 3 x 3 min v 0,1% Tween 20 v 4x SSC vyhřátém na 37 °C.

Poté byly preparáty znovu blokovány 2,5% BSA v 4x SSC tentokrát po dobu 10 min. Pro amplifikaci signálu byla sklíčka při teplotě 37 °C inkubována 30 min s antistreptavidinem (Vector Labs. Inc, Burlingame, CA, USA). Po opětovném odmytí 3x 3 min v 0,1% Tween 20 v 4x SSC při 37 °C, bylo zopakováno blokování a inkubace 20 min se streptavidinem konjugovaným s Cy3. Nenavázané protilátky byly odmyty 3x 3 min v 0,1% Tween 20 v 4x SSC o teplotě 37 °C.

Chromozomální preparáty byly nakonec krátce promyty v 1% Ilfotolu (Ilford). Téměř oschlé preparáty byly obarveny DAPI v DABCO a překryty krycím sklem jehož okraje byly utěsněny lakem na nehty. Výsledky byly dokumentovány pod fluorescenčním mikroskopem stejně jako v předchozích případech. Všechny snímky byly nakonec pseudokolorovány, složeny a upravovány v programu Adobe Photoshop, verze 9.0.

3.2. Bioinformatická analýza

3.2.1. Identifikace pohlavně vázaných „scaffoldů“ u ostruháčka *Calycopis cecrops*

Resekvenační data druhu *Calycopis cecrops* byla poskytnuta Dr. Qian Cong. Data byla sekvenována na platformě Illumina HiSeq 2500 (Illumina, San Diego, USA) metodou párových čtení („paired end“). Do analýzy byly zahrnuty 3 samci a 3 samice (Cong a kol. 2017; jedinci NVG-3306, NVG-3307, NVG-3515, NVG-4945, NVG-4946 a NVG-4947).

Srovnání hloubky čtení mezi pohlavími bylo provedeno podle práce Mongue a kol. (2017). Sekvence byly nejprve očištěny od technických sekvencí a filtrovány na základě kvality pomocí softwaru Trimmomatic (verze 0.36; Bolger a kol. 2014). Byly odstraněny sekvence s délkou kratší než 75 bp a s průměrnou kvalitou („Phred score“) přes čtyři báze < 20

(parametr „SLIDINGWINDOW:4:20“). Kvalita filtrovaných dat byla ověřena pomocí programu FastQC (verze 0.11.5; Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, UK, dostupný z <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Z databáze LepBase (Challis a kol. 2016) byla získána genomová sekvence *Calycopis cecrops* verze 1.1 s maskovanými repeticemi (Cong a kol. 2016), jenž byl indexován prostřednictvím programu Bowtie2 (verze 2-2.2.9) a následně byly k této referenci namapovány sekvence jednotlivých filtrovaných knihoven použitím parametru „sensitive local alignment“ (Langmead a Salzberg 2012). Výsledné alignmenty byly zpracovány pomocí softwaru Bedtools (verze 2.26.0; Quinlan a Hall 2010). Pomocí nástrojů genomecov a groupby byl zjištěn medián pokrytí na bázi („per base coverage“) pro každý „scaffold“.

V programu RStudio (Boston, MA, USA) byla provedena následná analýza a vizualizace porovnávající pokrytí mezi samci a samicemi, při které byly nejdříve odfiltrovány „scaffoldy“ s chybějícími nebo nulovými hodnotami a „scaffoldy“ kratší než 10 Kbp. Hodnota medianu pokrytí pro každý „scaffold“ u daného jedince byla normalizována jeho celkovým průměrným pokrytím. Nakonec byla pro každý „scaffold“ spočítána \log_2 hodnota poměru průměrného pokrytí samce a samice (M:F). Za pohlavně vázané „scaffoldy“ byly považovány ty s hodnotou $\log_2(M:F) > 0,5$.

3.2.2. Identifikace pohlavně vázaných transkriptů u modráška *Polyommatus icarus*

Jelikož byla donedávna u druhu *Polyommatus icarus* dostupná pouze transkriptomická data, byly u tohoto druhu pohlavně vázané sekvence analyzovány prostřednictvím komparativní genomové hybridizace (CGH) na mikročipu (Baker a Wilkinson 2010, Yoshido a kol. v revizi). K návrhu mikročipu bylo zapotřebí poskládat *de novo* transkriptom z dat, která byla stažena z databáze NCBI SRA (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>; přístupový kód SRR921636). Data byla sekvenována na platformě Illumina HiSeq 2000 (Illumina, San Diego, USA) metodou sekvenování párových čtení („paired end“).

Očištění transkriptomických dat od technických sekvencí a filtrování na základě kvality bylo provedeno pomocí softwaru Trimmomatic (verze 0.36; Bolger a kol. 2014) jak bylo uvedeno v Kap. 3.2.1. Z filtrovaných sekvencí byl sestaven transkriptom *de novo* prostřednictvím programu Trinity (verze 2.6.5) v základním nastavení dle protokolu Haas a kol. (2013).

Samotný návrh mikročipu a komparativní genomová hybridizace byly provedeny RNDr. Annou Voleníkovou. Pro úplnost je uveden stručný popis této metodiky. Pomocí programu HaMStR (Ebersberger a kol. 2009) byly identifikovány 1:1 ortology k datasetu

konzervovaných motýlích ortologních genů vytvořeným Kawaharou a Breinholtem (2014). Komparativní genomová hybridizace na mikročipu byla provedena podle práce Baker a Wilkinson (2010). Nejprve byl dle identifikovaných ortologních genů navržen mikročip prostřednictvím Agilent Technologies eArray pro komparativní genomovou hybridizaci (array CGH) s maximálním počtem sond pro každý ortolog. Genomová DNA čtyř samic a čtyř samců izolované metodou CTAB byly dle protokolu výrobce naznačeny prostřednictvím značící soupravy SureTag Complete DNA Labeling. Do každé značící reakce byl přidán 1 µg gDNA. Samičí gDNA byla značena Cy3-dUTP, zatímco samčí gDNA byla značena Cy5-dUTP. Samotná hybridizace na mikročipu byla provedena v Nemocnici České Budějovice, a.s. v Laboratoři molekulární biologie a genetiky pod vedením Dr. Lehnerové. Jako kompetitor byla použita sonikovaná DNA z lososích spermií (Sigma-Aldrich).

Intenzita jednotlivých hybridizačních signálů byla extrahována prostřednictvím Agilent's Feature Extraction softwaru. Analýza a filtrování dat bylo provedeno dle Baker a Wilkinson (2010) v programovacím jazyce Python (scripty dostupné na: https://github.com/anicka-v/aCGH_scripts). Ke zpracování a grafické vizualizaci dat bylo dále využito RStudio (Boston, MA, USA). Pro každý ortolog byl vypočten medián $\log_2(M:F)$, tj. \log_2 poměru samčí a samičí intenzity fluorescence, všech jeho sond. Výsledné hodnoty mediánu ze čtyř replik byly zprůměrovány. Transkript byl opět považován za pohlavně vázaný, pokud byla jeho průměrná hodnota $\log_2(M:F) > 0,5$.

4. Výsledky

4.1. Molekulárně-cytogenetická analýza

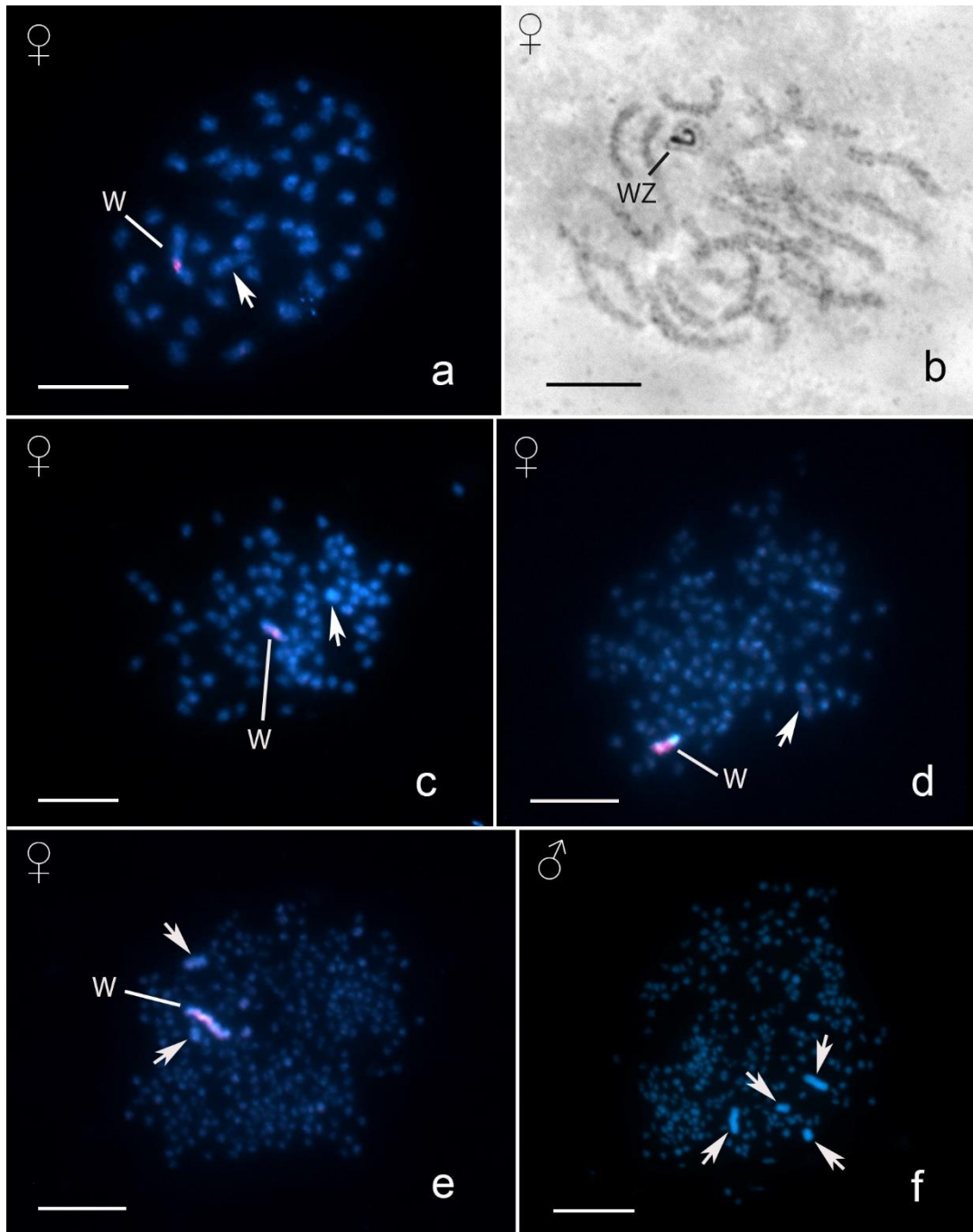
Pro ověření počtu chromozomů testovaných druhů (Tab. III) a porovnání jejich počtu mezi pohlavími byly využity chromozomální preparáty z křídelních disků a ovárií obarvené DAPI (Obr. 1). U samce modráška *Polyommatus icarus* byl potvrzen diploidní počet chromozomů $2n = 46$ (Obr. 8b), nicméně karyotyp samic odpovídal $2n = 45$ (Obr. 1a). Vzhledem k malému množství chromozomálních preparátů druhu *P. escheri* nebyl na jediném samičím chromozomálním preparátu barveném 2,5% orceinem nalezen žádný mitotický komplement. Nicméně počet chromozomů se podařilo stanovit na komplementech ve stádiu pachytene, kde byly jednotlivé bivalenty dostatečně rozestoupené (Obr. 1b). V případě zástupců s vysoce fragmentovaným genomem (*L. bellargus*, *L. coridon*, *P. dorylas*) bylo obtížné určit přesný počet chromozomů v jednotlivých mitotických komplementech. Stanovení počtu chromozomů ztěžovaly nedostatečně rozestoupené chromozomy. Vzhledem k malé velikosti a vysokému počtu chromozomů mohlo také snadno docházet k jejich ztrátám při tvorbě chromozomálního preparátu „spreading“ metodou. Z toho důvodu byly zaznamenané počty chromozomů pro každé pohlaví zprůměrovány. Jednotlivé výsledky společně se směrodatnou odchylkou jsou uvedeny v Tab. III. Zároveň jsou zde uvedené počty chromozomů jednotlivých druhů, které jsou udávány v literatuře společně s jejich místem odchyty. Testované druhy však pocházely z jiných populací.

Velikost genomu byla stanovena průtokovou cytometrií u sedmi druhů. Získané hodnoty jsou spolu s průměrem a směrodatnou odchylkou zobrazeny v Tab. IV společně s počty chromozomů získanými z literatury. Naměřené hodnoty ukázaly, že se česká a španělská populace modráška *P. icarus* mírně liší ve velikosti genomu. Hodnoty z Tab. IV byly dále využity k testování korelace mezi počtem chromozomů a velikostí genomu. Analýza vícenásobné regrese ukázala pozitivní korelaci mezi počtem chromozomů a velikostí genomu $r(8) = 0,847$, $P < 0,05$ (Obr. 2). Z dat je zároveň patrné, že ačkoli druhy s vysokými počty chromozomů mají větší genomy, rozdíl představuje max. 19 %. Ke zvýšenému množství počtu chromozomů u modrášků tedy nedošlo prostřednictvím polyploidizace, nýbrž patrně fragmentací. Při ní dochází ke zmenšování chromozomů, čemuž odpovídají pozorované mitotické komplementy (Obr. 1).

Ačkoliv se karyotyp druhů s vysokým počtem chromozomů (*L. bellargus*, *L. coridon* a *P. dorylas*) skládá z mnoha malých chromozomů, zároveň byly ve všech mitotických

komplementech pozorovány dva velké chromozomy (Obr. 1c, d). V případě druhu *P. dorylas* byly u samice detekovány dokonce tři velké chromozomy, jeden výrazně větší než zbylé dva (Obr. 1e). U samčího pohlaví byly ve většině komplementů tohoto druhu pozorovány dva páry velkých chromozomů (Obr. 1f). Rozdíl mezi pohlavími naznačuje, že největší element v samičím komplementu *P. dorylas* patrně představuje chromozom W. V samičím komplementu modráška *P. icarus* byly pozorovány dva výrazně velké chromozomy, z nichž jeden byl charakteristický přítomností konstriktce (Obr. 1a, 8a). Také u samce byly viditelné dva větší chromozomy oproti zbylým chromozomům v komplementu (Obr. 8b). Dva velké elementy v samčích mitotických metafázích byly detekované také v Nguyen a kol. (2010). U druhu *P. escheri* nebyl v pachytenních komplementech pozorován žádný výrazně velký bivalent.

Na samičích preparátech byla provedena genomová *in situ* hybridizace (GISH), tj. hybridizace celogenomové samičí sondy s nadbytkem neznačené samčí kompetitorové gDNA díky čemuž bylo možné detekovat pohlavní chromozom W. GISH potvrdila, že u všech druhů je jedním z velkých chromozomů pohlavní chromozom W (Obr. 1), z čehož lze soudit, že druhým velkým chromozomem je chromozom Z. V případě *P. dorylas* GISH potvrdila, že je chromozom W největším chromozomem v samičím karyotypu a dva zbylé největší chromozomy tak odpovídají chromozomům Z_1 a Z_2 (Obr. 1e). U tohoto druhu je tedy přítomen systém mnohočetných pohlavních chromozomů WZ_1Z_2 . U druhů *L. bellargus*, *L. coridon* a *P. dorylas* samičí sonda naznačila celý chromozom W (Obr. 1c-e), zatímco u druhu *P. icarus* hybridizovala pouze k jeho intersticiální části (Obr. 1a). Ačkoliv má modrášek *P. escheri* podobně jako *P. icarus* nízký počet chromozomů, velikost jejich pohlavních chromozomů se liší. Na rozdíl od *P. icarus* je chromozom W druhu *P. escheri* pravděpodobně nejmenším chromozomem v karyotypu. Zároveň chromozom Z tohoto druhu, který se stáčí kolem menšího chromozomu W, není výrazně větší než okolní autozomy (Obr. 1b).



Obr. 1: Karyotypy studovaných druhů. **a, c-e** Genomová *in situ* hybridizace se značenou samičí celogenomovou sondou. **a** Samičí mitotický komplement druhu *P. icarus* $2n = 45$. Samičí celogenomová sonda u tohoto druhu naznačila pouze intersticiální část chromozomu W. Šipka ukazuje na pohlavní chromozom Z, který byl identifikován na základě jeho velikosti vůči ostatním chromozomům a viditelné konstriktce (viz níže). **b** Pachytenní chromozomální komplement samice druhu *P. escheri* barvený 2,5% lakto-aceto-orceinem, kde pohlavní chromozom W je silně zbarvený po celé své délce, což naznačuje jeho heterochromatinovou strukturu. Dle počtu bivalentů v komplementu byl odvozen diploidní počet chromozomů $2n = 46$. Z párování pohlavních chromozomů W a Z v bivalentu lze odvodit, že chromozom Z je větší než chromozom W, okolo kterého se chromozom Z obtáčí. **c** Samičí mitotický komplement druhu *L. bellargus* s $2n =$ cca 89.

Samičí celogenomová sonda hybridizovala k největšímu chromozomu v komplementu, který tak představuje pohlavní chromozom W, a to po celé jeho délce. Šipka ukazuje na předpokládaný chromozom Z. **d** Mitotický komplement samice druhu *L. coridon*, jehož diploidní počet chromozomů je $2n = \text{cca } 126$. Také u tohoto druhu byl největší chromozom v karyotypu identifikován jako pohlavní chromozom W. Šipka ukazuje na předpokládaný chromozom Z. **e** Mitotický komplement samice druhu *P. dorylas*, kde $2n = \text{cca } 282$. Samičí sonda hybridizovala po celé délce největšího chromozomu v karyotypu. Šipky ukazují na pohlavní chromozomy Z_1 a Z_2 . **f** Samčí mitotický komplement *P. dorylas* barven DAPI, jehož karyotyp je $2n = \text{cca } 272$. Šipky ukazují dva páry (jeden větší a druhý menší) pohlavních chromozomů Z_1 a Z_2 , které jsou největšími chromozomy v samčím karyotypu. Chromozomy byly podbarveny DAPI (modrá), sonda detekující pohlavní chromozom W fluorochromem Cy3 (červená). Měřítka 10 μm .

Tab. III: Průměrný počet chromozomů ($2n$) testovaných samic a samců v porovnání s udávaným počtem chromozomů z literatury.

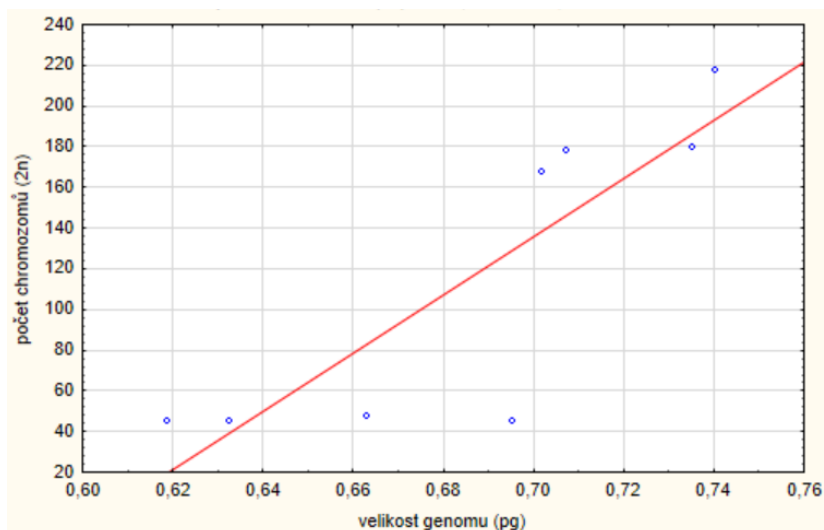
Druh	$2n$	<i>SD</i>	Lokalita	$2n$ dle literatury	Lokalita [#]
<i>P. icarus</i> ♀	45	n/a	CZ		
<i>P. icarus</i> ♂	46	n/a	CZ	46 ^a	CZ
<i>P. escheri</i> ♀	46	n/a	ESP	46 ^b	n/a
<i>L. bellargus</i> ♀	86*	3.58	CZ		
<i>L. bellargus</i> ♂	88*	3.86	CZ	90 ^a	CZ
<i>L. coridon</i> ♀	141*	23.64	CZ		
<i>L. coridon</i> ♂	165*	14.59	CZ	174-184 ^{c#}	ESP, F, IT, Balkán
<i>P. dorylas</i> ♀	284*	10.17	CZ		
<i>P. dorylas</i> ♂	268*	13.84	CZ	298-302 ^d	ESP

SD – směrodatná odchylka; n/a – Chybějící data; *Průměrná hodnota. [#]Lokalita odchytu jedinců uvedených v literatuře; [#]Karyotyp pozorovaný u populací ze Španělska, Francie a Itálie byl $2n = 174-176$, zatímco u balkánské populace byly detekovány karyotypy $2n = 180-184$; ^aNguyen a kol. (2010); ^bde Lesse (1953) citovaný v Robinson (1971); ^cde Lesse (1969) citovaný v Schmitt a kol. (2001); ^dLorković (1990) citovaný ve Wiemers (2003).

Tab. IV: Haploidní velikosti genomu (1C) stanovené průtokovou cytometrií společně s diploidními počty chromozomů udávaných v literatuře.

Druh	Vzorek 1 (pg)	Vzorek 2 (pg)	Vzorek 3 (pg)	Průměr 1C DNA (pg)	SD	2n
<i>P. icarus</i> (CZ)	0,63	0,63	0,63	0,63	0,004	46 ^a
<i>P. icarus</i> (ESP)	0,62	0,62	0,62	0,62	0,001	46 ^a
<i>P. escheri</i> (ESP)	0,70	0,69	0,70	0,70	0,013	46 ^b
<i>P. thersites</i> (ESP)	0,67	0,66	0,67	0,66	0,012	48 ^c
<i>L. hispana</i> (ESP)	0,70	0,70	0,71	0,70	0,009	168 ^d
<i>L. coridon</i> (CZ)	0,71	0,69	0,71	0,70	0,015	179 ^{e*}
<i>P. ripartii</i> (ESP)	0,73	0,73	0,74	0,74	0,011	180 ^f
<i>P. fulgens</i> (ESP)	0,74	n/a	n/a	0,74	n/a	218 ^f

SD – Směrodatná odchylka; n/a – Chybějící data; *Průměrná hodnota 2n = 174-184; ^aNguyen a kol. (2010); ^bde Lesse (1953) citovaný v Robinson (1971); ^cLorković (1941) citovaný v Kandul a kol. (2004); ^dDescimon a Mullet (2009); ^ede Lesse (1969) citovaný v Schmitt a kol. (2001); ^fMunguira a kol. (1994).



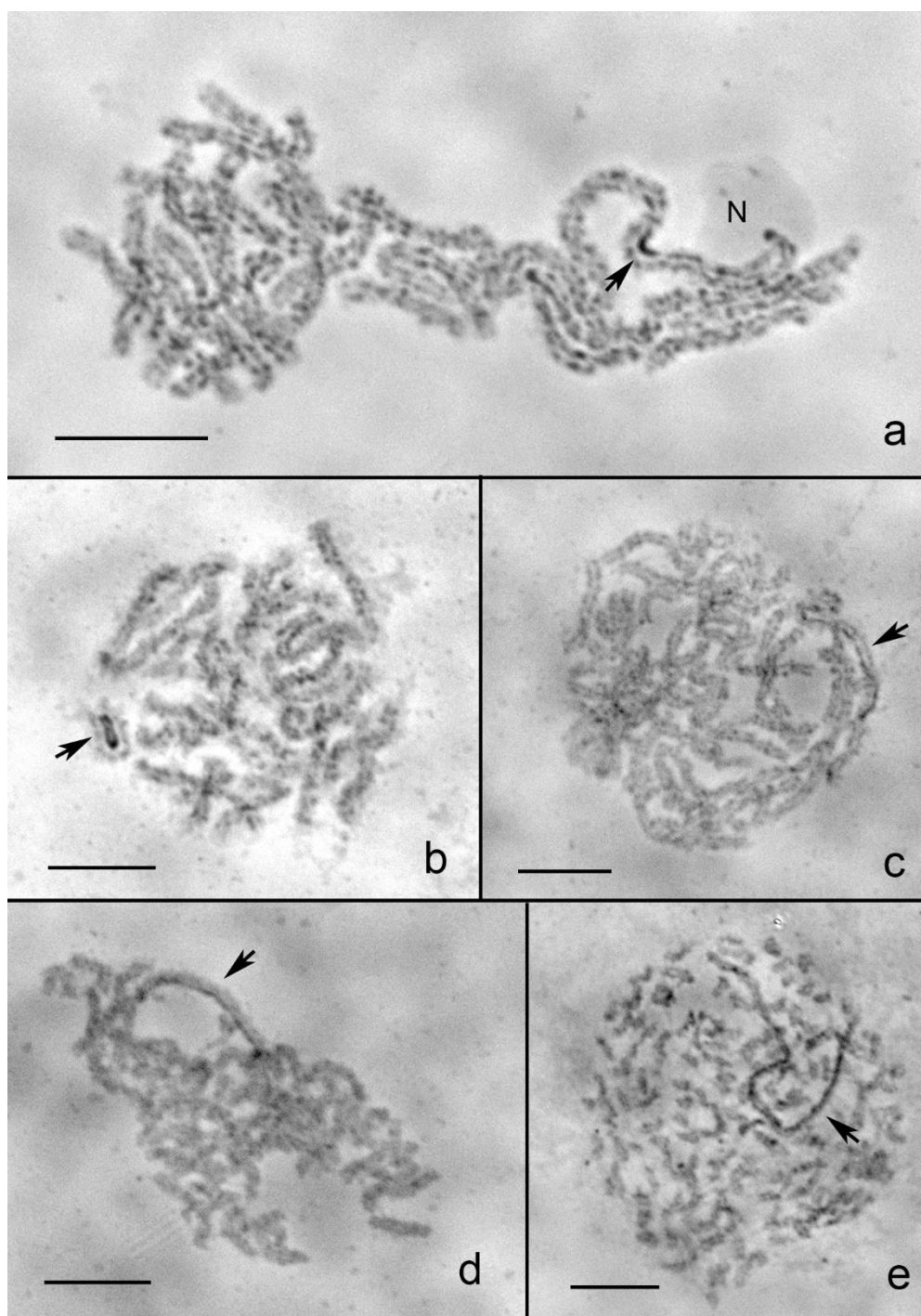
Obr. 2: Graf závislosti počtu chromozomů (2n) na velikosti genomu (1C) ($2n = -870,0039 + 1436,7225 * 1C$).

Barvení samičích preparátů pachytenních chromozomů 2,5% orceinem umožnilo detekci bivalentu pohlavních chromozomů u studovaných modrásků (Obr. 3). Vzhledem k vysoce heterochromatinové struktuře by měl být chromozom W ve srovnání se zbylými chromozomy silněji zbarvený, což bylo patrné u většiny komplementů druhů *P. icarus*

(Obr. 3a) a *P. escheri* (Obr. 3b). V případě druhů *L. bellargus*, *L. coridon* a *P. dorylas* nebylo barvení chromozomu W tak výrazné (Obr. 3c, d, e). Nicméně ve všech případech byl pohlavní chromozom W zvýrazněn téměř po celé své délce. Výjimkou byl druh *P. icarus*, u kterého byl výrazný heterochromatinový blok pouze v intersticiální části chromozomu W. Zároveň byla u některých komplementů tohoto druhu pozorována asociace bivalentu pohlavních chromozomů se slabě zbarvenou strukturou jadérka (Obr. 3a). Z toho vyplývá, že pohlavní chromozomy modráška *P. icarus* pravděpodobně nesou transkripčně aktivní klastry genů pro hlavní ribozomální RNA (rDNA). Naopak chromozom W modráška *P. escheri* byl vzhledem ke své vysoce heterochromatinové struktuře silně zvýrazněn orceinem po celé své délce. Na obrázku je tak dobře vidět párování pohlavních chromozomů, kdy se delší chromozom Z obtáčí kolem menšího chromozomu W (Obr. 1b, 3b). Toto párování bylo pozorováno u naprosté většiny pachytenních komplementů druhu *P. escheri*.

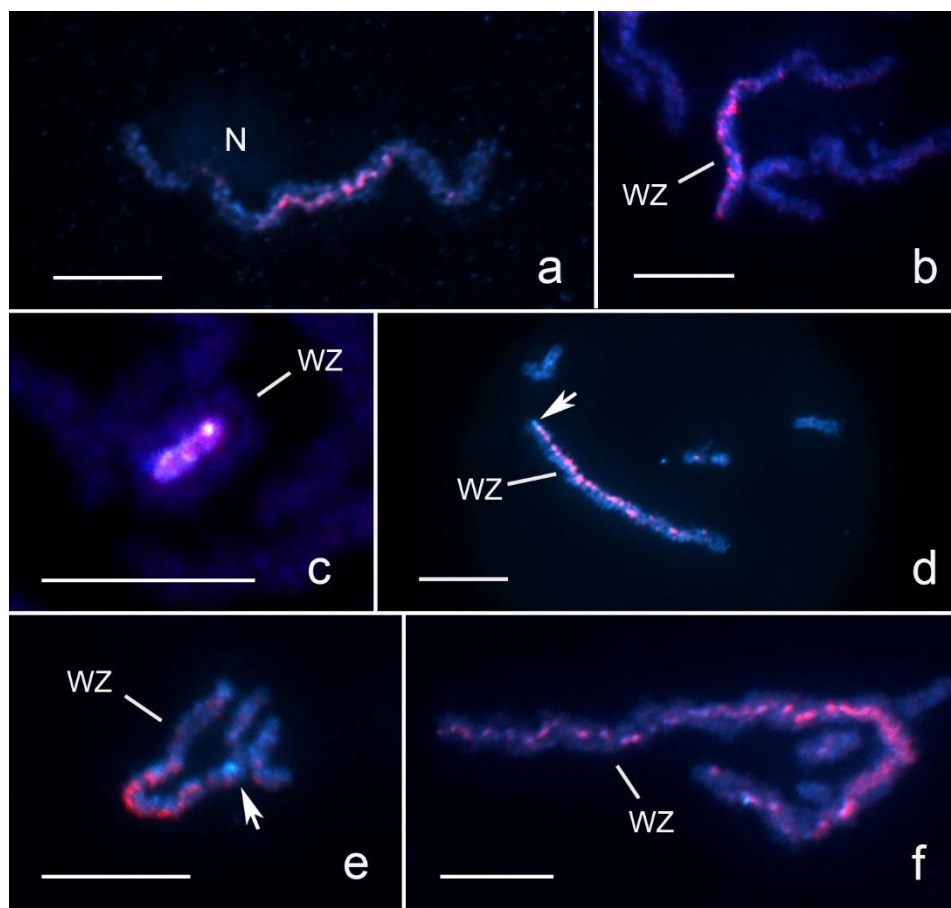
Pro ověření a spolehlivější detekci chromozomu W byla na samičích chromozomálních preparátech použita také genomová *in situ* hybridizace (Obr. 4). Z výsledků je patrné, že sonda značila víceméně stejné úseky jako v případě barvení 2,5% lacto-aceto-orceinem. Úroveň heterochromatinizace chromozomu W modráška *P. icarus* se překvapivě lišila mezi jednotlivými jedinci. U většiny testovaných samic GISH zvýraznila pouze intersticiální oblast odpovídající čtvrtině chromozomu (Obr. 4a), což odpovídá také detekci hybridizačního signálu na mitotickém komplementu (Obr. 1a, 8a) a barvení orceinem (Obr. 3a). U jedné z testovaných samic však GISH označila zhruba polovinu chromozomu W (Obr. 4b), což naznačuje možnou existenci karyotypových ras lišících se pohlavními chromozomy. Ačkoliv mají druhy *P. icarus* a *P. escheri* stejný počet chromozomů, z výsledků GISH je patrné, že jejich chromozomy W se velice liší (Obr. 4a, b). Zatímco chromozom W druhu *P. icarus* je značen pouze z části, u modráška *P. escheri* je značený po celé své délce. Zároveň byl chromozom W ve všech komplementech tohoto druhu typicky přeložený a obklopený chromozomem Z. To naznačuje, že u tohoto druhu je chromozom W menší než chromozom Z (Obr. 4c). U druhu *L. coridon* byl na jednom konci chromozomu W detekován DAPI pozitivní blok. Přestože se na základě barvení orceinem zdálo, že je chromozom W u tohoto druhu diferencovaný po celé své délce, roztroušený hybridizační signál celogenomová samičí sondy zvýraznil silně jen asi 2/3 chromozomu W (Obr. 4d). Také u druhu *L. bellargus* byl na jednom konci bivalentu pohlavních chromozomů patrný heterochromatinový blok a na rozdíl od barvení orceinem, samičí celogenomová sonda při GISH detekovala pouze vnitřní část chromozomu W (Obr. 4e). U druhu *P. dorylas* GISH detekovala heterochromatinové bloky podél celého pohlavního chromozomu W, ačkoli sonda výrazně hybridizovala

především k interscticiální oblasti chromozomu W. U tohoto druhu však byla kvalita hybridizačního signálu v některých komplementech slabší (Obr. 4f).



Obr. 3: Samičí pachytenní jádra studovaných druhů barvená 2,5% lakto-aceto-orceinem, který umožňuje detekci pohlavního chromozomu W na samičích chromozomálních preparátech. Šipka ukazuje na pohlavní bivalent rozpoznatelný na základě rozdílného chromomerového vzoru spárovaných chromozomů. **a** Komplement druhu *P. icarus*, kde orcein silně nabarvil na chromozomu W pouze intersticiální blok heterochromatinu. Zároveň byla s bivalentem pohlavních chromozomů

asociována struktura patrně odpovídající jadérku (N). **b** Jádru druhu *P. escheri*, jehož chromozom W byl silně zbarven po celé své délce a typicky se pároval s chromozomem Z. **c** Komplement druhu *L. bellargus*. Barvení slabě zvýraznilo celý chromozom W. **d** Jádru modráška *L. coridon*. Bivalent pohlavních chromozomů je delší než autozomální bivalenty. Chromozom W je slabě zbarven po celé své délce. **e** Komplement modráška *P. dorylas*, u kterého je bivalent pohlavních chromozomů výrazně delší než bivalenty tvořené autozomy. Chromozom W byl výrazně zbarven po celé své délce. Měřítka 10 μm .

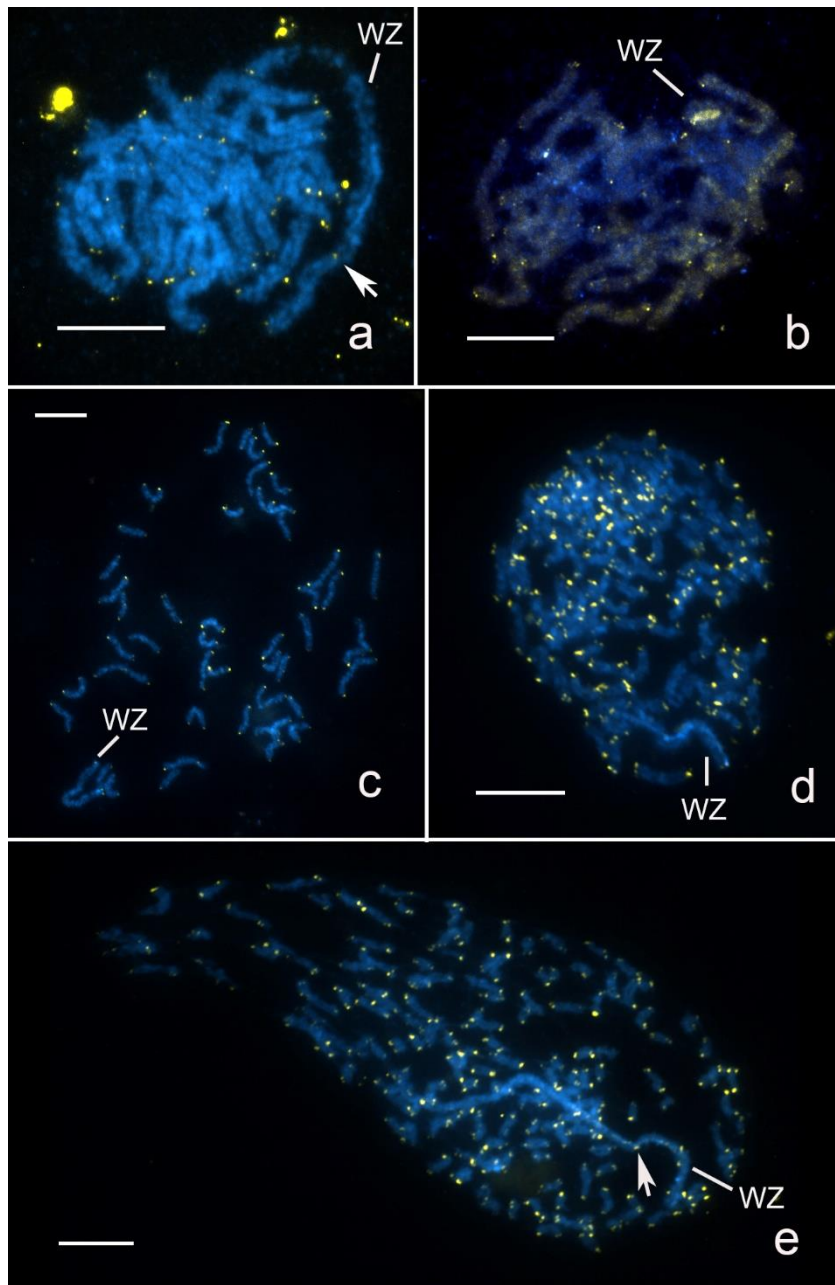


Obr. 4: Genomová *in situ* hybridizace na samičích pachytenních bivalentech studovaných druhů modrášků. **a** Typický bivalent pohlavních chromozomů *P. icarus*, u kterého samičí celogenomová sonda hybridizovala pouze na intersticiální část chromozomu W. V místě euchromatinové části chromozomu W bylo pozorováno jadérko (N). **b** Bivalent pohlavních chromozomů pozorovaný u jediné samice *P. icarus*, u které sonda zvýraznila polovinu chromozomu W. **c** Typické párování pohlavních chromozomů W a Z u *P. escheri*, u kterého sonda hybridizovala po celé délce chromozomu W. **d** U *L. coridon* byl na základě barvení DAPI identifikován na jednom konci pohlavního bivalentu blok heterochromatinu. Třetina na opačném konci chromozomu W téměř nebyla sondou detekována. **e** U *L. bellargus* byl detekován DAPI pozitivní blok na jednom konci chromozomu a hybridizační signál samičí sondy silně označil intersticiální oblast chromozomu W. **f** U *P. dorylas* byly heterochromatinové bloky detekovány po celé délce chromozomu W. Chromozomy byly podbarveny

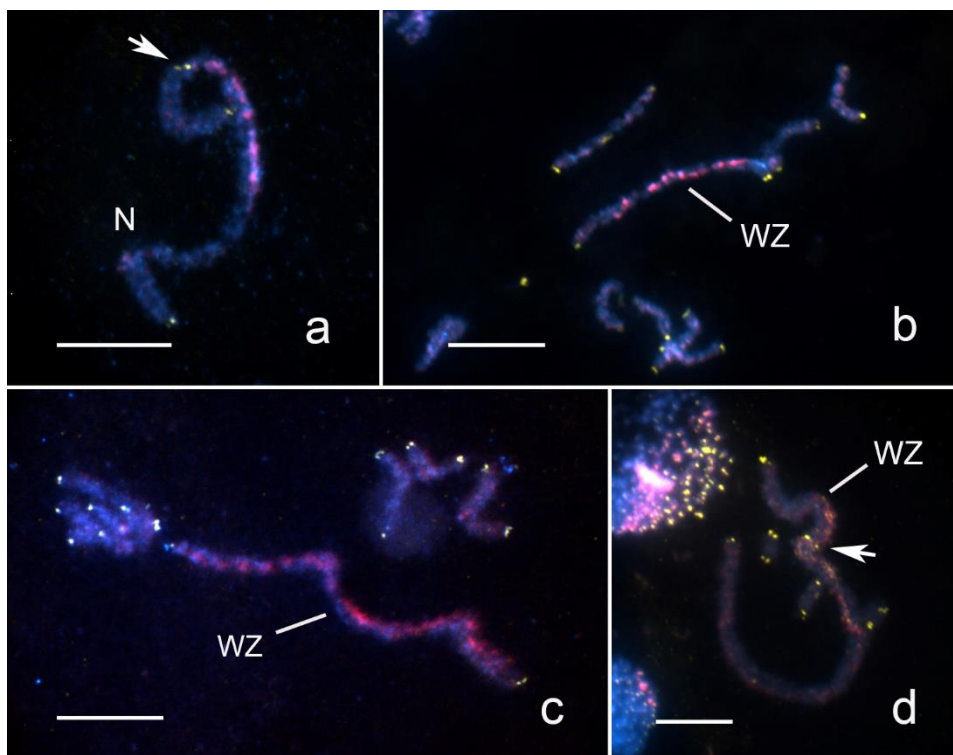
DAPI (modrá), sonda detekující pohlavní chromozom W fluorochromem Cy3 nebo fluoresceinem (červená). Šipky označují silně DAPI pozitivní heterochromatinový blok. Měřítka 10 μm .

Na chromozomálních preparátech byla zároveň provedena fluorescenční *in situ* hybridizace s $(\text{TTAGG})_n$ telomerickou sondou (telo-FISH) pro ověření přítomnosti telomer u zástupců s vysoce fragmentovaným genomem. Zároveň jsou telomerické sondy vhodné pro detekci trivalentů, u kterých sonda hybridizuje také v intersticiální oblasti, popřípadě může detekce signálů v intersticiální oblasti indikovat neo-pohlavní chromozomy jejichž telomery zůstaly zachovány i po fúzi.

U všech testovaných druhů byla potvrzena přítomnost telomerické sekvence na koncích chromozomů. A to i u zástupců s vysokým počtem chromozomů, což potvrzuje, že jsou u těchto druhů po fragmentaci telomery na koncích chromozomů syntetizovány *de novo* (Obr. 5). Vysoký počet chromozomů komplikovalo nalezení dostatečně rozvolněných jader, u kterých by bylo možné spolehlivě a detailně analyzovat přítomnost intersticiálních telomerických sekvencí. Přesto se podařilo v kombinaci s GISH ověřit přítomnost telomerických sekvencí na bivalentech pohlavních chromozomů (Obr. 6). Zatímco u druhů *P. escheri*, *L. bellargus* a *L. coridon* nebyly telomerické signály mimo konce pohlavních chromozomů detekovány (Obr. 5b a 6b, c), v případě *P. icarus* a *P. dorylas* byly intersticiální telomerické signály pozorovány (Obr. 6a, d). Intersticiální telomerický signál byl u *P. icarus* detekován pouze v místě rozhraní euchromatinové části, která nenesí jadérko, a intersticiální heterochromatinové části chromozomu W, která silně hybridizovala se samičí celogenomovou sondou (Obr. 5a, 6a). Telo-FISH byla provedena pouze u jedné ze dvou pozorovaných karyotypových ras *P. icarus* (Obr. 4a, b). Toto pozorování společně s lišícím se karyotypem mezi pohlavími naznačuje mnohočetné pohlavní chromozomy u *P. icarus*. Přítomnost intersticiálního telomerického signálu u *P. dorylas* (Obr. 5e, 6d) tak potvrzuje, že tři velké chromozomy pozorované v samičích mitotických komplementech (Obr. 1e) představují pohlavní chromozomy W, Z₁ a Z₂, které společně tvoří trivalent.



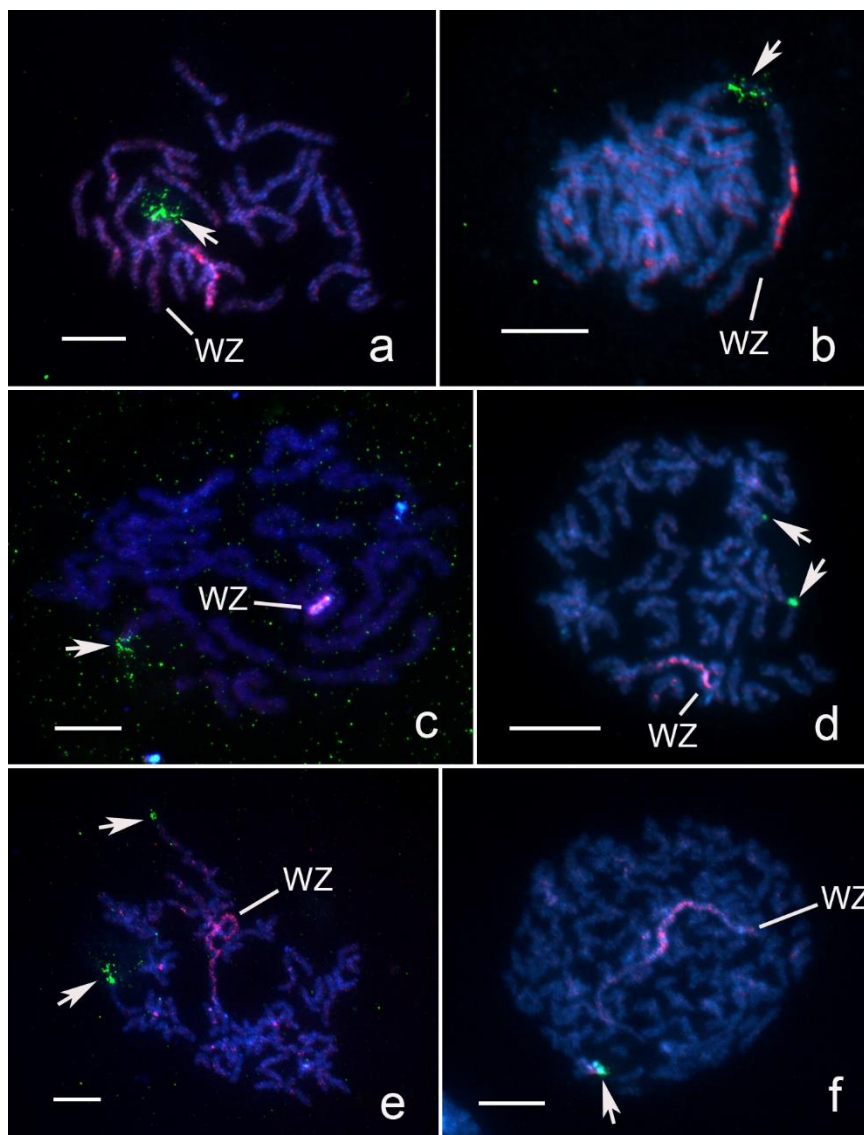
Obr. 5: Fluorescenční *in situ* hybridizace s telomerickou sondou na samičích pachytenních kompletech testovaných druhů. U všech testovaných druhů byly detekovány telomerické signály na koncích chromozomů. Bivalent pohlavních chromozomů byl identifikován na základě rozdílného chromomerového vzoru a rozdílné velikosti. **a** *P. icarus*. **b** *P. escheri*. **c** *L. bellargus*. **d** *L. coridon*. **e** *P. dorylas*. U druhů *P. icarus* (**a**) a *P. dorylas* (**e**) byl na pohlavním bivalentu detekován také intersticiální telomerický signál (označeno šipkou). Chromozomy byly podbarveny DAPI (modrá), sonda detekující telomery Cy3 nebo fluoresceinem (žlutá). Měřítko 10 μm .



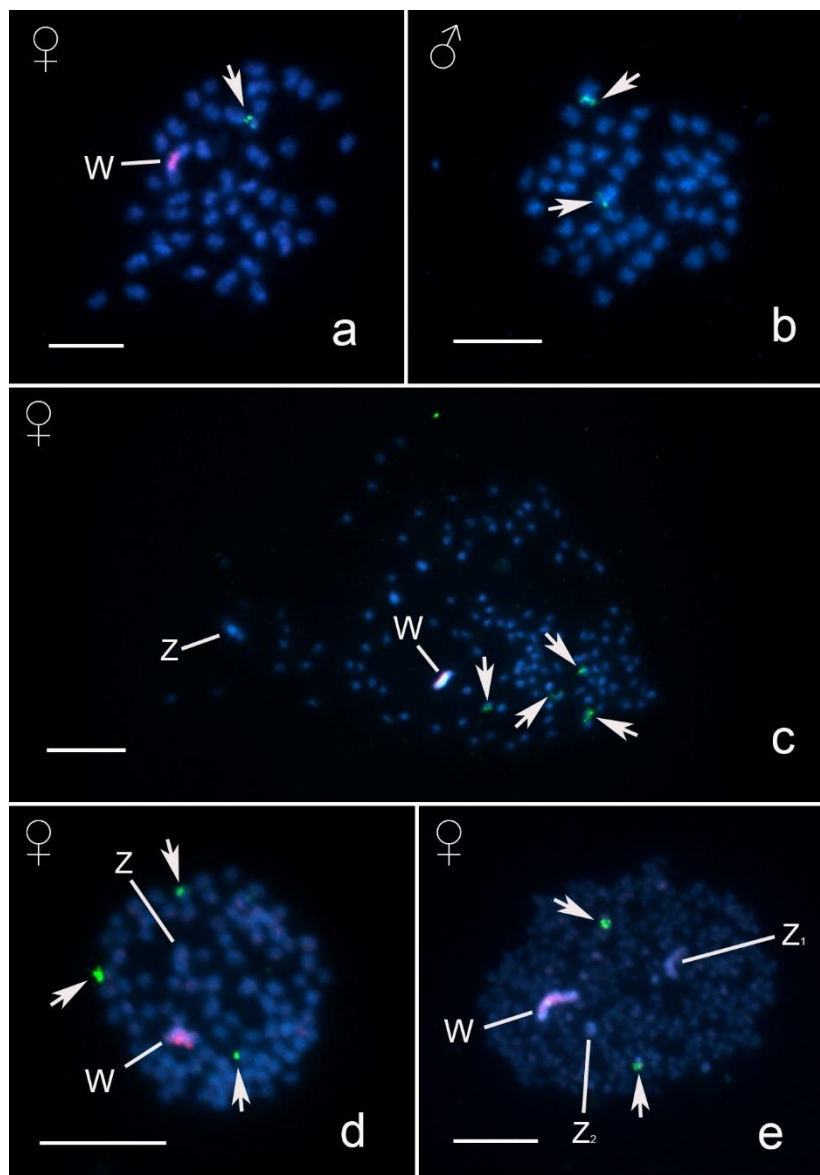
Obr. 6: Kombinace genomové *in situ* hybridizace a fluorescenční *in situ* hybridizace s telomerickou sondou na samičích pachytenních bivalentech pohlavních chromozomů druhů *P. icarus* (a), *L. bellargus* (b), *L. coridon* (c) a *P. dorylas* (d). Terminální telomerický signál byl detekován u všech druhů. Na bivalentech pohlavních chromozomů druhů *P. icarus* (a) a *P. dorylas* (d) byly navíc detekovány intersticiální telomerické sekvence (šipka). Chromozomy byly podbarveny DAPI (modrá), sonda detekující pohlavní chromozom W fluorochromem Cy3 nebo fluoresceinem (červená) a telomerická sonda (TTAGG)_n Cy3 (žlutá). N – Jadérko. Měřítko 10 μm.

Poslední analýzou provedenou na těchto chromozomálních preparátech byla FISH se sondou pro 18S rDNA (Obr. 7). U modráška *P. icarus* byly rDNA klastry genů detekovány na bivalentu pohlavních chromozomů u obou karyotypových ras (Obr. 7a, b) a to v oblasti odpovídající euchromatinové části chromozomu W, což je v souladu s pozorovanou asociací jadérka s pohlavními chromozomy pozorovanou v předchozích experimentech (Obr. 3a, 4a, 6a). Na samičích mitotických komplementech byl hybridizační signál detekován na jednom velkém chromozomu, který nebyl označen samičí celogenomovou sondou (Obr. 8a). Zároveň byla na tomto chromozomu v místě vazby 18S rDNA sondy pozorována konstriktce, která je pravděpodobně výsledkem aktivní transkripce rDNA. V případě samčích mitotických komplementů 18S rDNA sonda hybridizovala ke dvěma největším chromozomům karyotypu (Obr. 8b). Na základě pozorování lze odvodit, že se klastry genů 18S rDNA tohoto druhu nacházejí na pohlavním chromozomu Z. U *P. escheri* mitotické komplementy nebyly

k dispozici. V pachytenních samičích jádrech však sonda hybridizovala k jednomu autozomálnímu bivalentu (Obr. 7c). U druhu *L. coridon* nesou geny pro 18S rRNA dva páry autozomů, což dokládá detekce dvou (Obr. 7e) a čtyř (Obr. 8c) hybridizačních signálů v mitotickém a pachytenním komplementu. U druhu *L. bellargus* FISH s 18S rDNA sondou detekovala v samičím pachytenním komplementu dva autozomální bivalenty nesoucí rDNA lokusy, které se lišily intenzitou hybridizačního signálu (Obr. 7d). Na samičích mitotických komplementech pak sonda hybridizovala na tři autozomy. Jeden z těchto autozomů je tedy pro rDNA lokus heterozygotní (Obr. 8d). U *P. dorylas* v pachytenním komplementu sonda hybridizovala k jednomu autozomálnímu bivalentu (Obr. 7f), což odpovídá dvěma autozomům nesoucím rDNA detekovaným v mitotických komplementech (Obr. 8e).



Obr. 7: Genomová *in situ* hybridizace a fluorescenční *in situ* hybridizace se sondou pro 18S rDNA na samičích pachytenních komplementech testovaných druhů. **a, b** 18S rDNA sonda hybridizovala na pohlavní bivalent u obou populací druhu *P. icarus*. V obou případech sonda hybridizovala v místě euchromatinové části pohlavního chromozomu W. **c** *P. escheri*; hybridizační signál detekoval rDNA na jednom autozomálním bivalentu. **d** *L. bellargus*; 18S rDNA sonda označila hybridizační signály na dvou autozomálních bivalentech. Jeden ze signálů byl výrazně slabší než druhý. **e** *L. coridon*; rDNA byla detekována na dvou autozomálních bivalentech. **f** *P. dorylas*; rDNA byla lokalizována na jediném autozomálním bivalentu. Chromozomy byly podbarveny DAPI (modrá), sonda detekující pohlavní chromozom W fluorochromem Cy3 nebo fluoresceinem (červená), biotinem značená sonda detekující rDNA byla detekována streptavidinem konjugovaným se Cy3 (zelená). Šipky označují rDNA lokusy. Měřítko 10 μm .

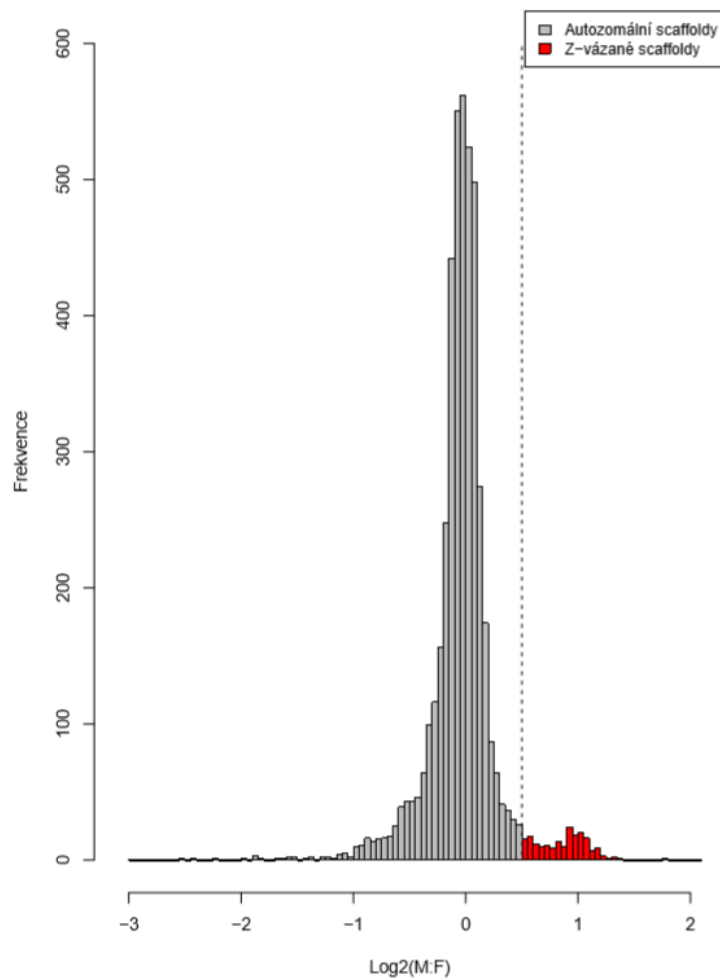


Obr. 8: Genomová *in situ* hybridizace a fluorescenční *in situ* hybridizace se sondou pro 18S rDNA na mitotických komplementech testovaných druhů. **a** Samičí komplement *P. icarus*, jehož karyotyp odpovídá $2n = 45$, u kterého 18S rDNA sonda hybridizovala na druhý největší element v komplementu, pohlavní chromozom Z, v místě konstriktce chromozomu. **b** Samčí járo *P. icarus*, jehož diploidní počet chromozomů je $2n = 46$, byly detekovány dva hybridizační signály 18S rDNA sondy, na největším chromozomálním páru, který odpovídá pohlavním chromozomům Z. **c** Samičí komplement druhu *L. coridon*, $2n = \text{cca } 129$; sonda detekovala celkem čtyři rDNA lokusy na autozomech. **d** Samičí jádro *L. bellargus*, s $2n = \text{cca } 87$; sonda odhalila tři autozomální rDNA lokusy. **e** Samičí jádro *P. dorylas*, sestávající z $2n = \text{cca } 275$, ve kterém sonda detekovala pouze dva autozomální rDNA klastry. Chromozomy byly podbarveny DAPI (modrá), samičí celogenomová sonda detekující pohlavní chromozom W fluorochromem Cy3 nebo fluoresceinem (červená), biotinem značená sonda detekující rDNA byla detekována streptavidinem konjugovaným se Cy3 (zelená). Šipky ukazují na lokusy rDNA. Měřítka 10 μm .

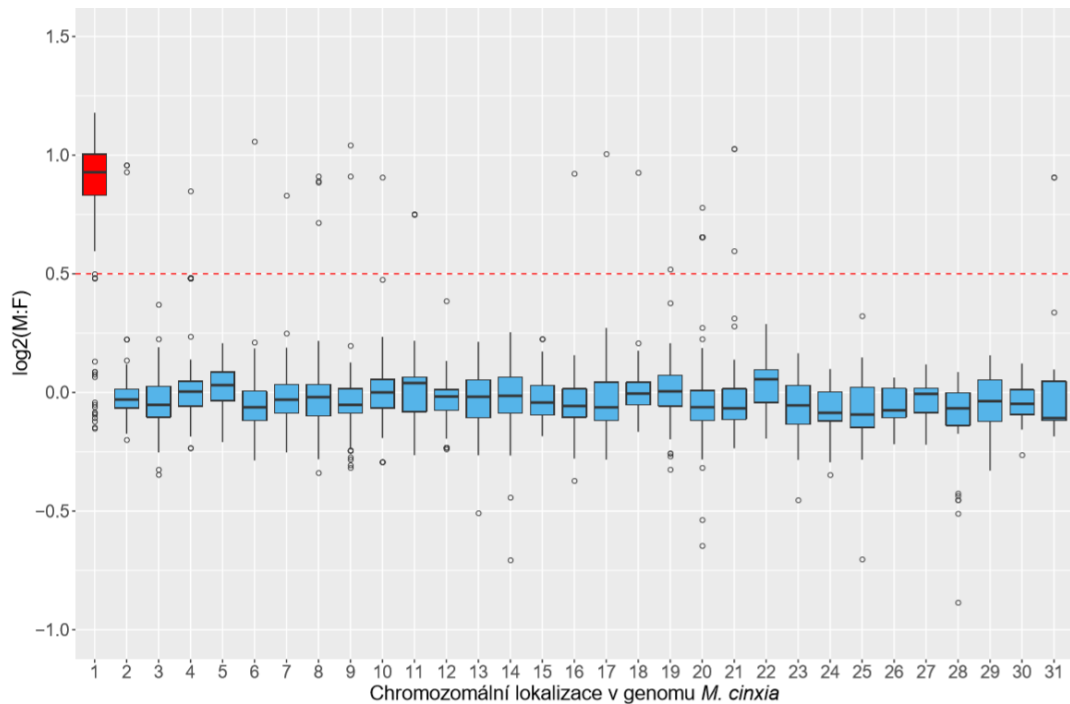
4.2. Bioinformatická analýza

Jelikož výsledky cytogenetické analýzy naznačovaly přítomnost neo-pohlavních chromozomů přinejmenším u modrásků *P. icarus* a *P. dorylas*, byla s využitím genomických a resekvenačních dat dostupných pro blízkce příbuzného ostruháčka rudopruhého (*Calycopis cecrops*, Theclinae; Cong a kol. 2016) provedena srovnávací analýza hloubky čtení („coverage“) mezi pohlavími. Tato analýza schopná identifikovat sekvence vázané na diferencované oblasti pohlavních chromozomů byla použita k testování hypotézy, že pozorované mnohočetné pohlavní chromozomy vznikly již u společného předka skupin Polyommatinae a Theclinae.

Na obr. 9 je vyneseno histogram hodnot logaritmu normalizovaného mediánu poměru hloubky čtení samce a samice *C. cecrops* při základu 2 [$\log_2(M:F)$], ze kterého je patrné bimodální rozdělení, kdy autozomální sekvence, jejichž hloubka čtení se mezi pohlavími neliší ($M:F = 1$) tvoří hlavní vrchol distribuce s $\log_2(M:F) \sim 0$. Z-vázané sekvence, jejichž hloubka čtení je u samců 2x větší než u samic ($M:F = 2$), pak tvoří výrazně menší vrchol s $\log_2(M:F) \sim 1$. Distribuce vykazuje plynulý přechod mezi vrcholy, což je patrně způsobeno přítomností chimérických „scaffoldů“ v genomové sekvenci *C. cecrops* (Mongue a kol. 2017). Jako Z-vázané „scaffoldy“ byly označeny ty s $\log_2(M:F) > 0,5$ čímž bylo identifikováno 200 Z-vázaných „scaffoldů“ na kterých bylo anotováno 1 049 genů. Jelikož je u motýlů poměrně vysoká úroveň syntenie (Ahola a kol. 2014), je možné konzervovaným ortologům přiřadit chromozomální pozici získanou z referenčního genomu hnědáka kostkovaného *Melitaea cinxia*, jehož karyotyp $2n = 62$ odpovídá ancestrálnímu karyotypu (Ahola a kol. 2014; Obr. 10). Výsledky ukazují, že je genový obsah chromozomu Z mezi *C. cecrops* a *M. cinxia* značně konzervovaný. Výsledky tak nepodporují přítomnost diferencovaných neo-pohlavních chromozomů vzniklých fúzí ancestrálních pohlavních chromozomů a autozomu u *C. cecrops*.



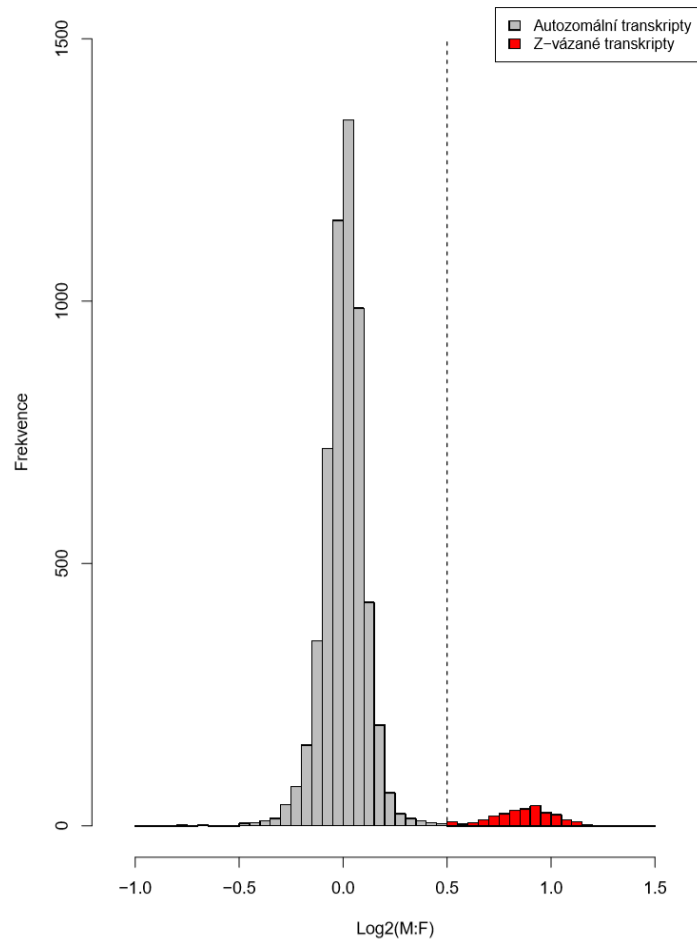
Obr. 9: Distribuce normalizovaného mediánu poměru hloubky čtení („coverage“) samce (M) a samice (F) ostruháčka *Calycopis cecrops*. Přerušovaná čára značí mezní hodnotu 0,5 mezi předpokládanými autozomálními „scaffoldy“ (šedá) a Z-vázanými „scaffoldy“ (červená) s délkou ≥ 10 tis. bazí. Jako Z-vázaných tak bylo identifikováno 200 „scaffoldů“ nesoucích 1 049 genů.



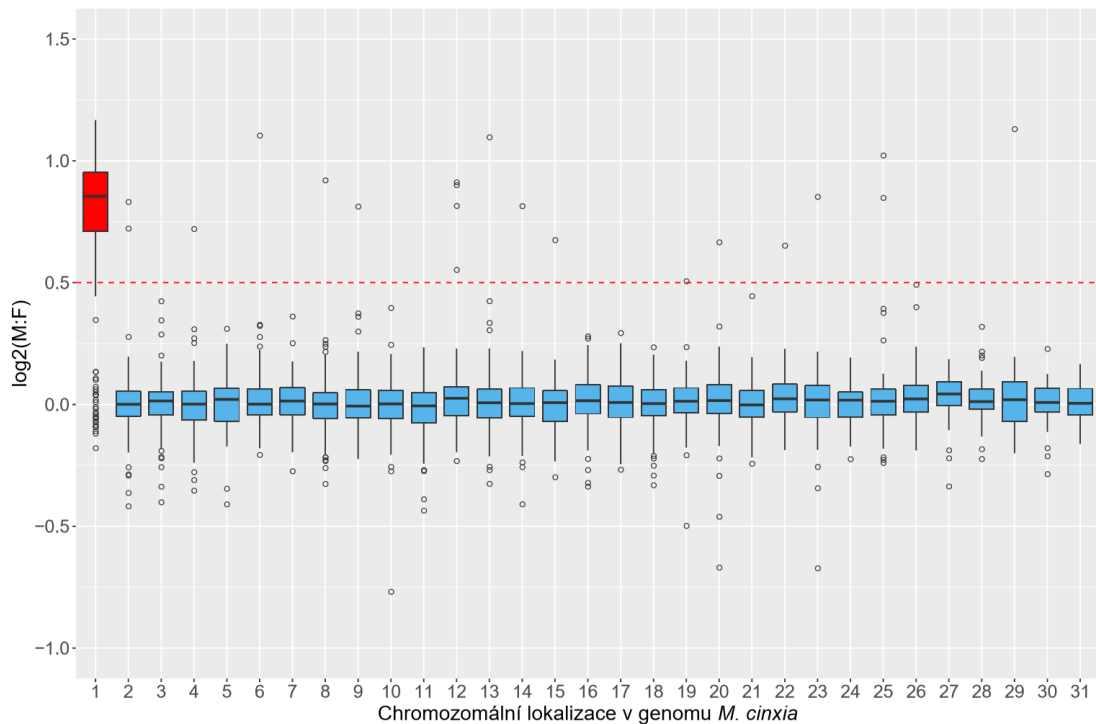
Obr. 10: Log₂ hodnoty normalizovaného mediánu poměru hloubky čtení samce (M) a samice (F) genů ostruháčka *Calycopis cecrops* sružené dle chromozomální lokalizace jejich ortologů v genomu *Melitaea cinxia*. Přerušovaná čára značí mezní hodnotu 0,5 mezi pravděpodobnými autozomálními (modrá) a Z-vázanými (červená) ortology. Naprostá většina z celkem 197 ortologů konzervovaných mezi *C. cecrops* a *M. cinxia* ležících na chromozomu Z *M. cinxia* (odpovídá chromozomu 1) je pohlavně vázaná také u ostruháčka. Z-vázaných genů *C. cecrops*, které mají ortology na jednotlivých autozomech *M. cinxia*, je velmi málo a netvoří jednotný syntenní blok.

Dostupná transkriptomická data *P. icarus* byla složena *de novo* a použita RNDr. Annou Voleníkovou k identifikaci 5 851 konzervovaných ortologů. Tyto ortologní sekvence byly použity pro návrh mikročipu pro komparativní genomovou hybridizaci (array CGH) obsahujícího celkem 43 493 sond. Z-vázané transkripty byly identifikovány porovnáním intenzity fluorescence mezi samčí a samičí sondou, kdy je u samců očekávána dvakrát vyšší intenzita než u samic, zatímco autozomální sekvence by měly mít intenzitu fluorescence srovnatelnou. Na Obr. 11 je zobrazen histogram log₂ hodnot poměru samičí intenzity fluorescence z array CGH [$\log_2(M:F)$]. Za Z-vázané ortology jsou považovány ty s $\log_2(M:F) > 0,5$. Celkem byly získány hodnoty pro 5 837 genů, z nichž bylo identifikováno 235 jako Z-vázaných. Ortologům byla přidělena chromozomální lokalizace na základě jejich pozice v referenčním genomu *M. cinxia*. Log₂(M:F) hodnoty sružené dle příslušnosti k chromozomům *M. cinxia* (Obr. 12) ukázaly, že většina Z-vázaných ortologů *P. icarus* leží na chromozomu Z (tj. chromozom 1) *M. cinxia*. Ačkoli cytogenetické analýzy jasně ukazují

na přítomnost neo-pohlavních chromozomů u *P. icarus*, array CGH neidentifikovala žádný syntenní blok, který by byl autozomální v ancestrálním karyotypu reprezentovaném chromozomy *M. cinxia* a Z-vázaný u *P. icarus*. Výsledky tak naznačují, že pokud u *P. icarus* skutečně jsou přítomny neo-pohlavní chromozomy, jsou velmi mladé a dosud nediferencované.



Obr. 11: Distribuce \log_2 hodnot poměru samčí a samičí intenzity fluorescence [$\log_2(\text{M:F})$] získaných array CGH u *Polyommatus icarus*. Přerušovaná čára značí mezní hodnotu $\log_2(\text{M:F}) = 0,5$ oddělující pravděpodobné autozomální (šedá) a Z-vázané sekvenční (červená). Z celkem 5 837 ortologů jich bylo jako Z-vázaných identifikováno 235.



Obr. 12: Log₂ hodnoty poměru samčí a samičí intenzity fluorescence [$\log_2(\text{M:F})$] získaných pomocí array CGH u modráka *Polyommatus icarus* sružené dle chromozomální lokalizace jejich ortologů v genomu *Melitaea cinxia*. Přerušovaná čára značí mezní hodnotu $\log_2(\text{M:F}) = 0,5$ mezi pravděpodobnými autozomálními (modrá) a Z-vázanými (červená) ortology *P. icarus*. Výsledky ukazují značnou konzervovanost genomého obsahu chromozomu Z mezi *P. icarus* a *M. cinxia* (chromozom 1). Také autozomální ortology *M. cinxia* zůstávají dle svých $\log_2(\text{M:F})$ až na výjimky autozomální u *P. icarus*. Výsledky neidentifikovaly žádný syntenní blok *M. cinxia*, který by byl pohlavně vázaný u *P. icarus*.

5. Diskuze

Cílem této práce bylo stanovení velikosti genomu a analýza pohlavních chromozomů vybraných zástupců čeledi Lycaenidae. Čeď Lycaenidae je vhodným modelovým systémem pro studium role chromozomálních změn při procesu speciace vzhledem k obrovské karyotypové variabilitě mezi blízkými příbuznými druhy. Součástí této práce proto bylo otestovat hypotézu o zvyšování počtu chromozomů u modrásků vlivem polyploidizace. Z toho důvodu byla provedena inspekce mitotických komplementů studovaných druhů, kteří se lišili v počtu chromozomů $2n = 45-284$ a měření velikosti genomu sedmi vybraných druhů modrásků prostřednictvím průtokové cytometrie. K detekci pohlavního chromozomu W v pachytenních jádrech bylo použito barvení 2,5% lacto-aceto-orceinem společně s genomovou *in situ* hybridizací (GISH). K ověření přítomnosti telomerických sekvencí u druhů s vysokým počtem chromozomů byla použita fluorescenční *in situ* hybridizace s telomerickou (TTAGG)_n sondou. Protože předběžné výsledky naznačovaly asociaci jadérka s pohlavními chromozomy u modráska *Polyommatus icarus* byl u studovaných druhů pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace s nepřímo značenou sondou pro 18S ribozomální DNA zjišťován počet a distribuce rDNA lokusů. K identifikaci pohlavně vázaných sekvencí ostruháčka *Calycopis cecrops* a *P. icarus* byla použita srovnávací analýza hloubky čtení a komparativní genomová hybridizace na mikročipu.

Jak bylo již mnohokrát zmíněno, modrásci jsou jednou z nejvariabilnějších skupin motýlů, co se týče počtu chromozomů, což bylo potvrzeno také v této práci. Nicméně masivní fragmentace chromozomů komplikuje určení jejich přesného počtu, protože jsou chromozomy malé, a tak hůře detekovatelné a zároveň při „spreading“ technice může snadno docházet ke ztrátě chromozomů. Z toho důvodu nebylo možné u zástupců s fragmentovaným genomem inspekci mitotických komplementů určit přesný počet chromozomů, a proto se pravděpodobně výsledky liší od publikovaných dat (Tab. III). Nicméně jedinci zahrnutí v analýze pocházeli z České republiky, a tedy z jiné populace než dříve analyzovaný materiál. Příčinou proto může být také variabilita v počtu chromozomů mezi jednotlivými populacemi, která byla potvrzena právě u modráska *L. coridon*, jehož karyotyp $2n = 174-176$ je běžný u populace z jižní Evropy (Španělsko, Francie a Itálie), zatímco balkánská populace má komplement složený z $2n = 180-184$ (de Lesse 1969 citovaný v Schmitt a kol. 2001). Naměřené velikosti genomů (Tab. IV) u vybraných zástupců zároveň potvrdily, že mechanismem zodpovědným za vysoký počet chromozomů u modrásků není polyploidizace, ale mnohonásobné chromozomální rozpady, což potvrzuje hypotézu Lorkoviće (1990 citovaný v Kandul a kol. 2007). Vzhledem

k nízkému počtu chromozomů v karyotypu druhu *P. icarus* bylo jednodušší určit jejich přesný počet. Překvapivě byly zjištěny rozdíly mezi pohlavími, kdy samice měly $2n = 45$ a samci $2n = 46$ (Obr. 1a, 8b). Vzhledem k malému množství chromozomálních preparátů se u *P. escheri* nepodařilo detekovat mitotické komplementy, a proto byl počet chromozomů odečten z počtu bivalentů v pachytením jádře (Obr. 1b).

GISH ukázala, že největšími chromozomy v karyotypu testovaných modrásků (výjimkou byl druh *P. escheri*) jsou pohlavní chromozomy (Obr. 5 a 7), a to i u druhů s vysoce fragmentovaným genomem. Pohlavní chromozomy modrásků si tedy dosud neznámým způsobem zachovávají svou velikost a nepodléhají fragmentaci, která by mohla způsobit neúnosnou selektivní zátěž (Ennis 1976). U druhů *P. icarus*, *L. bellargus* a *L. coridon* byly pozorovány na chromozomu W euchromatinové bloky, které nebyly značené samičí celogenomovou sondou, což nepřímě naznačuje, že by mohlo jít o neo-pohlavní chromozomy (Carabajal Paladino a kol. 2019, Mongue a kol. 2017). Zároveň rDNA FISH ukázala, že se u druhu *P. icarus* právě euchromatinová část páruje s úsekem chromozomu Z, který nese klastry genů pro hlavní rRNA, zatímco u druhů *L. bellargus* a *L. coridon* jsou tyto geny na autozomech (Obr. 7). Jejich neo-pohlavní chromozomy proto pravděpodobně vznikly nezávisle na sobě. U některých jedinců druhu *P. icarus* byly dokonce detekovány dva euchromatinové bloky z obou stran segmentu chromozomu W značeného samičí celogenomovou sondou. Zdá se, že v rámci druhu *P. icarus* dochází opakovaně k fúzím pohlavního chromozomu W s autozomy podobně jako tomu bylo u makadlovek tribu Gnoreschemini (podčeleď Gelechiinae) (Carabajal Paladino a kol. 2019). Ačkoliv má druh *P. escheri* stejný počet chromozomů v haploidním jádře jako druh *P. icarus*, tj. $2n = 46$, jejich pohlavní chromozomy jsou velmi odlišné. U *P. icarus* byl chromozom W největším chromozomem karyotypu a zároveň obsahoval vždy alespoň jeden euchromatinový blok, zatímco chromozom W *P. escheri* byl menší než homolog Z a zároveň byl silně heterochromatinizovaný po celé své délce (Obr. 4). Na rozdíl od ostatních testovaných druhů se pohlavní chromozomy *P. escheri* významně neliší svou velikostí od autozomů. Zdá se tedy, že by jeho karyotyp mohl představovat ancestrální stav modrásků, ve kterém $n = 24$ a pohlavní chromozomy nejsou největšími v karyotypu. U *P. icarus* je velikost pohlavních chromozomů zjevně daná opakovanými fúzemi s autozomy, zatímco u ostatních druhů je to dáno zejména masivní fragmentací, které pohlavní chromozomy nepodléhají. Nicméně na základě pozorovaného hybridizačního signálu u druhů s fragmentovaným genomem mohly hrát svou roli také fúze s autozomy. Jakým způsobem se pohlavní chromozomy modrásků brání fragmentaci dosud není známo. Dle Ohna (1969) by za ochranu pohlavních chromozomů před

fragmentací mohla být zodpovědná kompenzace genomové dávky, jelikož při fragmentaci pohlavního chromozomu by mohlo dojít k narušení kompenzace exprese pohlavně vázaných genů. Nicméně se zdá, že by mohlo jít o obecný rys karyotypové evoluce motýlů. Narang a Gupta (1982) identifikovali pár velkých chromozomů přítomný v karyotypu *Archaeoattacus edwardsii* sestávajícího z $2n = 128$ jako pohlavní chromozomy. Podobně byla u bělásků rodu *Leptidea* pozorována značná variabilita v počtu chromozomů. Nicméně pozorované komplexní mnohočetné systémy pohlavních chromozomů zůstávají stabilní a druhově specifické (Šíchová a kol. 2015, 2016).

Stejně jako v práci Vershinina a kol. (2015) fluorescenční *in situ* hybridizace s telomerickou $(TTAGG)_n$ sondou potvrdila, že i přes masivní fragmentace chromozomů dokážou modrásci obnovovat telomerické sekvence *de novo*. Kromě terminálních telomerických sekvencí byly na pohlavních bivalentech detekovány také intersticiální telomerické sekvence, a to u dvou testovaných druhů *P. dorylas* a *P. icarus* (Obr. 5a, e a 6a, d). U druhu *P. dorylas* byly v samčím mitotickém komplementu detekovány čtyři velké chromozomy, zatímco v samičím komplementu byly detekovány pouze tři, z nichž jeden byl genomickou *in situ* hybridizací identifikován jako pohlavní chromozom W (Obr. 1e, f). Tyto výsledky spolu s detekcí telomerického signálu v intersticiální oblasti pohlavního bivalentu značí, že jde ve skutečnosti o trivalent stávající z chromozomů neo-WZ₁Z₂, případně WZ₁Z₂. Genomová *in situ* hybridizace u tohoto druhu označila výrazné heterochromatinové bloky podél celého chromozomu W. Pokud tedy pohlavní chromozom W zfúzoval s autozomem, muselo dojít v průběhu evoluce k degeneraci euchromatinové části neo-W. Nicméně v takovém případě musel chromozom neo-W vzniknout mnohem dříve než pouze u tohoto druhu. U modráška *Polyommatus (Plebicula) atlanticus*, jehož karyotyp $2n = 448-452$ představuje nejvyšší počet chromozomů u diploidních eukaryot, byl skutečně u samce také pozorován jeden pár velkých chromozomů a jeden pár středně velkých chromozomů, které by mohly odpovídat chromozomům Z₁ a Z₂ (Lukhtanov 2015). Zároveň však nelze vyloučit možnost, že chromozomy Z₁ a Z₂ vznikly rozpadem původního chromozomu Z u společného předka těchto dvou druhů. V případě druhu *P. icarus* byly intersticiální telomerické sekvence detekovány pouze u jedinců, kteří nesli dva euchromatinové bloky na chromozomu W a to na rozhraní heterochromatinové a euchromatinové části, na které nebyl lokalizován signál rDNA sondy (Obr. 5a a 6a). Ancestrální pohlavní chromozomy W a Z tedy u tohoto druhu pravděpodobně nejprve zfúzovaly s autozomem nesoucím klastry rDNA genů, které však vlivem rekombinace na chromozomu W zanikly (viz níže). Později chromozom neo-W fúzoval s dalším autozomem, jehož homolog se stal chromozomem Z₂.

Jak již bylo řečeno, u druhu *P. icarus* je rDNA lokalizována na pohlavním chromozomu Z (Obr. 8a, b). Nicméně u ostatních zástupců ležely klastry rRNA genů na autozomech. U *L. bellargus* byly v pachytením komplementu pozorovány dva hybridizační signály, jeden silnější a druhý slabší. Stejná rDNA distribuce u *P. icarus* a *L. bellargus* byla pozorována také v práci Nguyen a kol. (2010). Nicméně detekce hybridizačního signálu na mitotickém komplementu druhu *L. bellargus* v této práci (Obr. 8d) odhalila, že je rDNA lokalizovaná pouze na třech autozomech a ne čtyřech jak se autoři domnívali, tj jeden chromozom je heterozygotní pro rDNA lokus. Nguyen a kol. (2010) navrhli hypotézu multiplikace rDNA klastrů genů u modrásků prostřednictvím chromozomálních rozpadů. Nicméně výsledky této diplomové práce a také práce Vershinina a kol. (2015) jsou v rozporu s touto hypotézou. Vershinina a kol. (2015) provedli detekci rDNA klastrů genů u odlišných zástupců modrásků rodu *Agrodiaetus* s počty chromozomů $n = 10-108$ a detekovali u téměř všech druhů v haploidních komplementech pouze jeden signál. Výjimkou byl pouze druh *P. (A.) senmanensis* ($n = 27$), kde byly identifikovány dva signály na nehomologních chromozomech. Tyto výsledky nepodporují teorii multiplikace klastru rDNA genů u motýlů vlivem fragmentace chromozomů. Naopak dle Vershinina a kol. (2015) si udržují stav, který se zdá být ancestrálním, a to jediný rDNA lokus na páru homologních chromozomů.

Na základě získaných výsledků lze hypotetizovat, že u *P. icarus*, *P. dorylas* a *Lysandra* spp. došlo k fúzím mezi pohlavními chromozomy a autozomy. Pohlavní chromozomy představují jednu z nejzajímavějších částí genomu a jejich změny mohou hrát roli v klíčových evolučních procesech jako je adaptace a speciace (Nguyen a Carabajal Paladino 2016). Ačkoliv je řád motýlů znám stabilní organizací genomu (Ahola a kol. 2014), objevují se neo-pohlavní chromozomy u celé řady taxonů (Mongue a kol. 2017, Nguyen a kol. 2013, viz Kap. 1.2.). Například v čeledi Gelechioidea došlo hned ke dvěma fúzím mezi pohlavními chromozomy a autozomy (viz Kap. 1.2.). Evoluce neo-pohlavních chromozomů prostřednictvím mnohonásobných fúzí pohlavního chromozomu s autozomem se zdá být častým zdrojem mnohočetných pohlavních chromozomů a byla popsána například u štetconoše *Orgyia antiqua* a *Orgyia thyellina* s vysoce odvozenými karyotypy a u geografických poddruhů martináče *Samia cynthia* (Yoshido a kol. 2005b, 2011). U štetconoše *O. antiqua* ($2n = 28$) byl detekován bivalent sestávající se z neo-pohlavních chromozomů neo-W/neo-Z, které nenesly klastry rDNA genů a u kterých genomová *in situ* hybridizace zvýraznila pouze jednu třetinu délky neo-W chromozomu. Naopak u štetconoše *O. thyellina*, se sníženým počtem chromozomů na $2n = 23$, byl pozorován trivalent pohlavních chromozomů neo-ZW₁W₂. Chromozom W₂ obsahoval na rozdíl od W₁ jen krátký kus

heterochromatinu, ale stejně jako odpovídající část neo-Z chromozomu také navíc rDNA. Z toho Yoshido (2005) odvozuje tři kroky evoluce pohlavních chromozomů štetconošů. Nejdříve došlo k fúzi ancestrálních pohlavních chromozomů WZ s párem autozomů, čímž vznikly neo-W a neo-Z chromozomy, které byly pozorovány u *O. antiqua*. V dalším kroku došlo k fúzi těchto neo-pohlavních chromozomů s párem autozomů nesoucím rDNA lokus. Posledním krokem evoluce pak byla fragmentace neo-W na dvě části, čímž vznikl trivalent neo-ZW₁W₂, který byl detekován u *O. thyellina*. U alopaticky rozšířených geografických poddruhů martináče *Samia cynthia* ssp. byly pozorovány hned čtyři různé chromozomální systémy s odlišnými karyotypy. U martináče *Samia cynthia ricini* s $2n = 27♀/28♂$ chybí chromozom W, a proto mají samice konstituci Z0, zatímco samci ZZ, u *S. c. walkeri* ($2n = 26♀/26$) byla pozorována konstituce neo-Wneo-Z/neo-Zneo-Z, u *S. c.* subsp. indet. ($2n = 25♀/26♂$) dokonce neo-WZ₁Z₂/Z₁Z₁Z₂Z₂ a v neposlední řadě konstituce WZ/ZZ, která je přítomná u *S. c. pryeri* ($2n = 28♀/28♂$) a která se zdá být na základě molekulárního složení chromozomu W dle práce Yoshido a kol. (2013) ancestrální.

Na fixaci neo-pohlavních chromozomů v populaci se mohou podílet evoluční mechanismy jako je selekce, genetický drift či meiotický drive (Charlesworth a Charlesworth 1980, Kirkpatrick 2016, Yoshida a Kitano 2012). Analogicky meiotickému drivu Bureš a Zedek (2014) navrhli hypotézu holokinetického drivu pro druhy s holokinetickými chromozomy, který může ovlivnit počty chromozomů fixací fúzí či rozpadů. Chromozomální rozpady mohou být doprovázeny delecí repetitivních úseků DNA. Pokud drive preferuje přenos malých chromozomů, bude upřednostňovat ty u kterých došlo ke ztrátám repetice, čímž dojde ke snížení velikosti genomu. Naopak fúze chromozomů může být spojena s namnožením repetice vedoucí ke zvýšení velikosti genomu. Počet chromozomů tak dle hypotézy holokinetického drivu negativně koreluje s velikostí genomu (Bureš a Zedek 2014). Holokinetický drive nebyl na motýlech dosud řádně testován, avšak porovnáme-li např. u bělásků rodu *Leptidea* velikosti interfázních komplementů (analogie velikosti genomu) a počty jejich chromozomů, zjistíme, že není v souladu s predikcí holokinetického drivu (Šíchová a kol. 2015). Výsledky analýzy dostupných karyotypových dat a velikostí genomů motýlů dokonce naznačují pozitivní korelaci mezi počtem chromozomů a velikostí genomu (Kreklová 2017). Také výsledky získané v této práci ukazují u modrásků pozitivní korelaci mezi počtem chromozomů a velikostí genomu (Obr. 2).

Jedním z dalších mechanismů zprostředkávajícím chromozomální fúze může být pohlavně antagonistická selekce (Charlesworth a Charlesworth 1980). V takovém případě se alela, která je prospěšná pouze pro jedno pohlaví, může prostřednictvím fúze dostat na

pohlavní chromozom. Nguyen a kol. (2013) detekovali u obaleče *Cydia pomonella* (Tortricidae) neo-Z chromozom, který vznikl fúzí ancestrálního pohlavního chromozomu Z s autozomem odpovídajícím chromozomu 15 u referenčního druhu bource *B. mori*. Podobně byla prokázána fúze chromozomu Z s autozomem, odpovídajícímu chromozomu 2 *B. mori* u běláška *Pieris napi* (Pieridae; Hill a kol. 2019) a předivky *Yponomeuta evonymella* (Yponomeutidae; Pro vazníková a Nguyen nepublikované výsledky), či chromozomu 16 *B. mori* u monarchy *Danaus plexippus* (Nymphalidae; Mongue a kol. 2017). Suetsugu a kol. (2013) ve své práci identifikovali geny exprimované ve specifických tkáních u *B. mori* a zjistili, že 75 % genů s expresí specifickou pro vaječníky je lokalizováno v klastrech na chromozomech 2, 10, 15 a 16. Zdá se tak, že by fúze pohlavních chromozomů s autozomy u motýlů mohly být fixovány působením pohlavně antagonistické selekce zvýhodňující vazbu genů důležitých pro samičí reprodukční úspěšnost na pohlavní chromozomy. Fúzemi také dochází ke změně vazebných vztahů čímž je ovlivněna míra rekombinace genů (Butlin 2005). Vzhledem k tomu, že chromozom Z se u řádu Lepidoptera významně podílí na postzygotické a prezygotické izolaci, hraje důležitou roli v procesu speciace. Fúze pohlavního chromozomu s autozomem tak může přivést do vazby reprodukční izolaci a adaptivní znaky, což může usnadnit vznik nových druhů. K tomu mohlo dojít například u zmíněného obaleče *Cydia pomonella* (Nguyen a kol. 2013).

Pohlavně vázané sekvence lze detekovat také prostřednictvím bioinformatických nástrojů (Palmer a kol. 2019). Toho využili například Mongue a kol. (2017), kteří identifikovali pohlavně vázané syntenní bloky u motýlů rodu *Danaus* prostřednictvím porovnání hloubky čtení („coverage“) mezi samci a samicemi. Z-vázané „scaffoldy“ lze totiž rozeznat díky jejich dvojnásobnému zastoupení u samců ve srovnání se samicemi. Porovnáním Z-vázaných genů s referenčním genomem *B. mori* autoři zjistili, že se neo-pohlavní chromozom *Z Danaus* spp. skládá z ancestrálního chromozomu Z a autozomu který je homologní k chromozomu 16 referenčního druhu *B. mori*. Jelikož výsledky cytogenetické analýzy na modráscích naznačují přítomnost neo-pohlavních chromozomů, byla srovnávací analýza hloubky čtení mezi pohlavími provedena u jediného druhu čeledi Lycaenidae s osekvenovaným genomem a dostupnými resekvenačními daty pro obě pohlaví, ostruháčka *Calycopis cecrops* (Theclinae). Výsledky analýzy nicméně neo-pohlavní chromozomy u *C. cecrops* nepotvrdily (Obr. 9, 10) a proto neo-pohlavní chromozomy modrásků nemohly vzniknout u společného předka skupin Polyommata a Theclinae, ale až později po oddělení těchto dvou linií. Dále byla využita dostupná transkriptomická data modráška *P. icarus* z nichž byl *de novo* sestaven transkriptom použítý pro návrh sond pro array CGH. Porovnáním

mezi samci a samicemi byly identifikovány Z-vázané ortology na základě jejich dvounásobné intenzity fluorescence u samců (Obr. 11). Nicméně porovnání jejich chromozomální lokalizace v referenčním genomu *M. cinxia* ukázalo, že je genový obsah chromozomu Z mezi *P. icarus* a *M. cinxia* značně konzervovaný a neodhalilo žádné syntenní bloky autozomálního původu (Voleníková A a Nguyen P, nepublikované výsledky; Obr. 12). Nicméně, pozorovaná variabilita pohlavního chromozomu W v rámci jedné populace naznačuje, že jsou tyto neo-pohlavní chromozomy poměrně velmi mladé, a tudíž v rané fázi diferenciaci.

V navazujícím výzkumu by proto bylo vhodné u *P. icarus* identifikovat pohlavně vázané sekvenční napříkald prostřednictvím porovnání hustoty SNP („single-nucleotide polymorphism“) mezi pohlavími (Darolti a kol. 2019). Další možností je nástroj SEX-DETEktor, který z dat rodičů a potomků identifikuje autozomální a Z- či W-vázané geny na základě segregace SNP (Muyle a kol. 2016).

6. Souhrn

Molekulárně cytogenetická analýza provedená u zástupců čeledi Polyommatinae, jmenovitě *Polyommatus icarus*, *Polyommatus escheri*, *Lysandra bellargus*, *Lysandra coridon* a *Polyommatus dorylas*, orientačně potvrdila počty chromozomů u zkoumaných druhů z literatury. Stanovené velikosti genomu pomocí průtokové cytometrie potvrdily přímou korelaci mezi počtem chromozomů a velikostí genomu. Nicméně získaná data ukazují, že u modrásků nedošlo ke zmnožení ancestrální chromozomální sady, ale k rozsáhlé fragmentaci chromozomů. Velké chromozomy pozorované u všech druhů s výjimkou *P. escheri* byly identifikovány jako pohlavní chromozomy, což naznačuje, že pohlavní chromozomy modrásků nepodléhají fragmentaci. U *P. icarus* a *P. dorylas* byla potvrzena přítomnost mnohočetných pohlavních chromozomů. V případě *P. icarus* výsledky dokonce naznačují existenci karyotypových ras lišících se konstitucí pohlavních chromozomů. Bioinformatické analýzy provedené u ostruháčka *Calycopis cecrops* a modráska *P. icarus* nepotvrdily přítomnost neo-pohlavních chromozomů vzniklých fúzí pohlavního chromozomu a autozomu. S přihlédnutím k cytogenetickým datům lze formulovat hypotézu, že neo-pohlavní chromozomy *P. icarus* jsou mladé a tedy nediferencované.

7. Literatura

- Abe H, Fujii T, Tanaka N, Yokoyama T, Kakehashi H a kol. (2008). Identification of the female determining region of the W chromosome in *Bombyx mori*. *Genetica* **133**: 269-82.
- Abe H, Mita K, Yasukochi Y, Oshiki T, Shimada T (2005) Retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Cytogenetic Genome Research* **110**: 144-151.
- Ahola V, Lehtonen R, Somervuo P, Salmela L, Koskinen P a kol. (2014) The Glanville fritillary genome retains an ancient karyotype and reveals selective chromosomal fusions in Lepidoptera. *Nature Communications* **5**(1).
- Bachtrog D (2013) Y-chromosome evolution: emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration. *Nature Reviews Genetics* **14**: 113-124.
- Baker RH, Wilkinson GS (2010) Comparative Genomic Hybridization (CGH) reveals a neo-X chromosome and biased gene movement in stalk-eyed flies (genus *Teleopsis*). *PLoS Genetics* **6**: e1001121.
- Banno Y, Kawaguchi Y, Koga K, Doira H (1995) Postreductional meiosis revealed in males of mutant with chromosomal aberration „T(23;25)Nd“ of the silkworm *Bombyx mori*. *Journal of Sericulture Science of Japan* **64**: 410-414.
- Beccaloni G, Scoble M, Kitching I, Simonsen T, Robinson G a kol. (2003) The Global Lepidoptera Names Index (LepIndex). World Wide Web electronic publication. <https://www.nhm.ac.uk/our-science/data/lepindex/lepindex/> [accessed 27 October 2019].
- Bellott DW, Skaletsky H, Pyntikova T, Mardis ER, Graves T a kol. (2010) Convergent evolution of chicken Z and human X chromosomes by expansion and gene acquisition. *Nature* **466** (7306): 612-616.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* **30**: 2114-2120.
- Buntrock L, Marec F, Krueger S, Traut W (2012) Organ growth without cell division: somatic polyploidy in a moth, *Ephestia kuehniella*. *Genome* **55**: 755-763.
- Bureš P, Zedek F (2014) Holokinetic drive: centromere drive in chromosomes without centromeres. *Evolution* **68**: 2412-2420.
- Butlin RK (2005) Recombination and speciation. *Molecular Ecology* **14**: 2621-2635.

- Carabajal Paladino LZ, Ferrari ME, Lauría JP, Cagnotti CL, Šíchová J a kol. (2016) The effect of X-rays on cytological traits of *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Florida Entomologist* **99**(sp1): 43-53.
- Carabajal Paladino LZ, Provazníková I, Berger M, Bass C, Aratchige NS a kol. (2019) Sex chromosome turnover in moths of the diverse superfamily Gelechioidea. *Genome Biology and Evolution* **11**(4): 1307-1319.
- Cong Q, Shen J, Borek D, Robbins RK, Opler PA a kol. (2017) When COI barcodes deceive: complete genomes reveal introgression in hairstreaks. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **284**(1848): 20161735.
- Cong Q, Shen J, Borek D, Robbins RK, Otwinowski Z a kol. (2016) Complete genomes of Hairstreak butterflies, their speciation, and nucleo-mitochondrial incongruence. *Scientific Reports* **6**: 24863.
- Dalíková M, Zrzavá M, Hladová I, Nguyen P, Šonský I a kol. (2017) New Insights into the Evolution of the W Chromosome in Lepidoptera. *Journal of Heredity* **108**(7): 709-719.
- Darolti I, Wright AE, Sandkam BA, Morris J, Bloch NI a kol. (2019). Extreme heterogeneity in sex chromosome differentiation and dosage compensation in livebearers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**(38): 19031-19036.
- de Lesse H (1953) Formules chromosomiques nouvelles chez les Lycaenidae. *Comptes rendus de l'Académie des Science* **237**: 1781-1783.
- de Lesse H (1960) Les nombres de chromosomes dans la classification du groupe d'*Agrodiaetus ripartii* Freyer (Lepidoptera, Lycaenidae). *Revue française d'Entomologie* **27**: 240-264.
- de Lesse H (1969) Les nombre de chromosomes dans le groupe de *Lysandra coridon* [Lepidoptera Lycaenidae]. *Annales de la Société Entomologique de France (N. S.)* **5**: 469-522.
- de Villena FPM, Sapienza C (2001) Female meiosis drives karyotypic evolution in mammals. *Genetics* **159**: 1179-1189.
- Descimon H, Mallet J (2009) Bad species. In: Settele J, Shreeve TG, Konvicka M, Van Dyck H (Eds) *Ecology of Butterflies in Europe*. Cambridge University Press, Cambridge, 219-249.
- Dierickx EG, Sin SYW, van Veelen HPJ, Brooke M de L, Liu Y a kol. (2020) Genetic diversity, demographic history and neo-sex chromosomes in the Critically Endangered Rasolark. *Proceeding of the Royal Society B* **287**: 20192613.

- Dopman EB (2004) Genetic Mapping of Sexual Isolation Between E and Z Pheromone Strains of the European Corn Borer (*Ostrinia nubilalis*). *Genetics* **167**(1): 301-309.
- Ebersberger I, Strauss S, von Haeseler A (2009) HaMStR: profile hidden markov model based search for orthologs in ESTs. *BMC Evolutionary Biology* **9**: 157.
- Ennis TJ (1976) Sex chromatin and chromosome numbers in Lepidoptera. *Canadian Journal of Genetics and Cytology* **18**(1): 119-130.
- Fraïsse Ch, Picard MAL, Vicoso B (2017) The deep conservation of the Lepidoptera Z chromosome suggests a non-canonical origin of the W. *Nature communications* **8**: 1486.
- Fuková I, Nguyen P, Marec F (2005) Codling moth cytogenetics: karyotype, chromosomal location of rDNA, and molecular differentiation of sex chromosomes. *Genome* **48**: 10831092.
- Fuková I, Traut W, Vítková M, Nguyen P, Kubíčková S a kol. (2007) Probing the W chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin. *Chromosoma* **116**:135-145.
- Gamble T, Castoe TA, Nielsen SV, Banks JL, Card DC a kol. (2017) The Discovery of XY Sex Chromosomes in a Boa and Python. *Current Biology* **27**: 2148-2153.
- Goldsmith MR, Marec F (2010) Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 368 pp.
- Gunski RJ, Cañedo AD, del Valle Garnero A, Ledesma MA, Coria N a kol. (2017) Multiple sex chromosome system in penguins (*Pygoscelis*, Spheniscidae). *Comparative Cytogenetics* **11**: 541-552.
- Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PJ a kol. (2013) De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature Protocols* **8**: 1494-1512.
- Hill J, Rastas P, Hornett EA, Neethiraj R, Clark a kol. (2019) Unprecedented reorganization of holocentric chromosomes provides insights into the enigma of lepidopteran chromosome evolution. *Science Advances* **5**(6): eaau3648.
- Houben A, Banaei-Moghaddam AM, Klemme S, Timmis JN (2014) Evolution and biology of supernumerary B chromosomes. *Cellular and Molecular Life Sciences* **71**: 467-478.
- Challi RJ, Kumar S, Dasmahapatra KK, Jiggins CD, Blaxter M (2016) Lepbase: the Lepidopteran genome database. *BioRxiv* 056994.

- Charlesworth B (1978) Model for evolution of Y chromosomes and dosage compensation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**: 5618-5622.
- Charlesworth B (1994) The effect of background selection against deleterious alleles on weakly selected, linked variants. *Genetic Research* **63**: 213-228
- Charlesworth D, Charlesworth B (1980) Sex differences in fitness and selection for centric fusions between sex-chromosomes and autosomes. *Genetical Research* **35**(02): 205.
- Ito S (1977) Cytogenetical studies on the chromosomes of silk gland cells of the silkworm with special reference to the structure and behaviour of the sex chromosomes. *The Japanese Journal of Genetics* **52**: 327-340.
- Jiggins CD, Mavarez J, Beltran M, McMillan WO, Johnston JS a kol. (2005) A genetic linkage map of the mimetic butterfly *Heliconius melpomene*. *Genetics* **171**: 557-570.
- Kandul NP, Lukhtanov VA, Dantchenko AV, Coleman JWS, Sekercioglu CH a kol. (2004) Phylogeny of *Agrodiaetus* Hübner 1822 (Lepidoptera: Lycaenidae) inferred from mtDNA sequences of *COI* and *COII*, and nuclear sequences of *EF1-a*: karyotype diversification and species radiation. *Systematic Biology* **53**: 278-298.
- Kandul NP, Lukhtanov VA, Pierce NE (2007) Karyotypic Diversity and Speciation in *Agrodiaetus* Butterflies. *Evolution* **61**(3): 546-559.
- Kawahara AY, Breinholt JW (2014). Phylogenomics provides strong evidence for relationships of butterflies and moths. *Proceedings of the Royal Society B* **281**(1788): 20140970.
- Kawahara AY, Plotkin D, Espeland M, Meusemann K, Toussaint EFA a kol. (2019) Phylogenomics reveals the evolutionary timing and pattern of butterflies and moths. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 201907847.
- Kawamura N (1988) The egg size determining gene, *Esd*, is a unique morphological marker on the W chromosome of *Bombyx mori*. *Genetica* **76**: 195-201.
- Kirkpatrick M (2016) The Evolution of Genome Structure by Natural and Sexual Selection. *Journal of Heredity* **108**(1): 3-11.
- Kitano J, Ross JA, Mori S, Kume M, Jones FC a kol. (2009) A role for a neo-sex chromosome in stickleback speciation. *Nature* **461**(7267): 1079-1083.
- Kiuchi T, Koga H, Kawamoto M, Shoji K, Sakai H a kol. (2014). A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm. *Nature* **509**: 633-636.

- Kreklová M (2017) Holokinetic drive and his role in karyotypic evolution of Lepidoptera. Bc. Thesis, in Czech. 42 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Kroemer JA, Coates BS, Nusawardani T, Rider SD Jr, Fraser LM a kol. (2011) A rearrangement of the Z chromosome topology influences the sex-linked gene display in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Molecular Genetics and Genomics* **286**: 37-56.
- Lambeth LS, Raymond CS, Roeszler KN, Kuroiwa A, Nakata T a kol. (2014) Overexpression of DMRT1 induces the male pathway in embryonic chicken gonads. *Developmental Biology* **389**: 160-172.
- Langmead B, Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods* **9**: 357-359.
- Lockwood APM (1961) “Ringer” solutions and some notes on the physiological basis of their ionic composition. *Comparative Biochemistry and Physiology* **2**: 241-289.
- Lorković Z (1941) Die Chromosomenzahl in der Spermatogenese der Tagfalter. *Chromosoma* **2**: 155-191.
- Lorković Z (1990) The butterfly chromosomes and their application in systematics and phylogeny. In: Kudrna O. (Ed.) Butterflies of Europe. Volume 2. Aula-Verlag, Wiesbaden, 332-396.
- Lukhtanov VA (2000) Sex chromatin and sex chromosome systems in nonditrysian Lepidoptera (Insecta). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* **38**: 73-79.
- Lukhtanov VA (2015) The blue butterfly *Polyommatus (Plebicula) atlanticus* (Lepidoptera, Lycaenidae) holds the record of the highest number of chromosomes in the non-polyploid eukaryotic organisms. *Comparative Cytogenetics* **9**: 683-690.
- Lukhtanov VA, Dantchenko AV, Kandul NR (1997): Die Karyotypen von *Polyommatus (Agrodiaetus) damone damone* und *P. (A.) damocles rossicus* nebst einigen Problemen bei *Agrodiaetus* (Lepidoptera: Lycaenidae). — Nachr.ent. Vet: Apollo, Suppl. **16**: 43-48.
- Lukhtanov VA, Dincă V, Friberg M, Šichová J, Olofsson M a kol. (2018) Versatility of multivalent orientation, inverted meiosis, and rescued fitness in holocentric chromosomal hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**: E9610-E9619.

- Maeda T (1939) Chiasma studies in the silkworm *Bombyx mori*. *The Japanese Journal of Genetics* **15**: 118-127.
- Malik HS, Henikoff S (2009) Major evolutionary transitions in centromere complexity. *Cell* **138**: 1067-1082.
- Mank JE, Vicoso B, Berlin S, Charlesworth B (2010) Effective population size and the Faster-X effect: empirical results and their interpretation. *Evolution* **64**: 663-674.
- Marec F (1990) Genetic control of pest Lepidoptera: Induction of sex-linked recessive lethal mutations in *Ephestia kuehniella* (Pyralidae). *Acta Entomologica Bohemoslovaca* **87**: 445-458.
- Marec F, Tothová A, Sahara K, Traut W (2001) Meiotic pairing of sex chromosome fragments and its relation to atypical transmission of a sexlinked marker in *Ephestia kuehniella* (Insecta: Lepidoptera). *Heredity* **87**: 659-671.
- Mediouni J, Fukova I, Frydrychova R, Dhouibi MH, Marec F (2004) Karyotype, sex chromatin and sex chromosome differentiation in the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae). *Caryologia* **57**: 184-194.
- Mita K, Kasahara M, Sasaki S, Nagayasu Y, Yamada T a kol. (2004) The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Research* **11**: 27-35.
- Mongue AJ, Nguyen P, Voleníková A, Walters JR (2017) Neo-sex chromosomes in the Monarch butterfly, *Danaus plexippus*. *G3* **710**: 3281-3294.
- Muller HJ (1964) The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research* **1**: 2-9.
- Munguira ML, Martín J, Pérez-Valiente M (1994) Karyology and distribution as tools in the taxonomy of Iberian *Agrodiaetus* butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Nota Lepidopeterologica* **17**: 125-140.
- Murakami A, Imai HT (1974) Cytological evidence for holocentric chromosomes of the silkworms, *Bombyx mori* and *B. mandarina* (Bombycidae, Lepidoptera). *Chromosoma* **47** (2): 167-178.
- Muyle A, Käfer J, Zemp N, Mousset S, Picard F a kol. (2016) SEX-DETECTOR: A probabilistic approach to study sex chromosomes in non-model organisms. *Genome Biology and Evolution* **8**(8): 2530-2543.
- Narang RC, Gupta ML (1982) The chromosomes of a wild silkmoth, *Archaeoattacus edwardsii*, with a record high chromosome number for Saturniidae. *Journal of the Lepidopterists' Society* **36**(2): 112-118.

- Nguyen P, Carabajal Paladino LZ (2016) On the neo-sex chromosomes of Lepidoptera. *In: Pontarotti P (ed.): Evolutionary Biology: Convergent Evolution, Evolution of Complex Traits, Concepts and Methods. Springer, Heidelberg, ISBN: 978-3-319-41324-2*, pp. 171-185.
- Nguyen P, Sahara K, Yoshido A, Marec F (2010) Evolutionary dynamics of rDNA clusters on chromosomes of moths and butterflies (Lepidoptera). *Genetica* **138**(3): 343-354.
- Nguyen P, Sýkorová M, Šichová J, Kůta V, Dalíková M a kol. (2013) Neo-sex chromosomes and adaptive potential in tortricid pests. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 6931-6936.
- Ohno S (1969) Evolution of sex chromosomes in mammals. *Annual Review of Genetics* **3**: 495-524.
- Pala I, Naurin S, Stervander M, Hasselquist D, Bensch S a kol. (2012) Evidence of a neo-sex chromosome in birds. *Heredity* **108**: 264-272.
- Palmer DH, Rogers TF, Dean R, Wright AE (2019) How to identify sex chromosomes and their turnover. *Molecular Ecology* **28**: 4709-4724.
- Pask A, Graves JAM (1999) Sex chromosomes and sex-determining genes: insights from marsupials and monotremes. *Cellular and Molecular Life Sciences* **55**: 864-875.
- Pennell MW, Kirkpatrick M, Otto SP, Vamosi JC, Peichel CL a kol. (2015) Y fuse? Sex chromosome fusions in fishes and reptiles. *PLoS Genetics* **11**(5): e1005237.
- Pokorná M, Altmanová M, Kratochvíl L (2014) Multiple sex chromosomes in the light of female meiotic drive in amniote vertebrates. *Chromosome Research* **22**: 35-44.
- Pospíšilová K (2020) Reconstruction of the evolution of multiple sex chromosomes in *Leptidea* wood white butterflies. Mgr. Thesis, in English. 50 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Quinlan AR, Hall IM (2010) BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **26**: 841-842.
- Rice WR (1987) Genetic hitchhiking and the evolution of reduced genetic activity of the Y sex chromosome. *Genetics* **116**: 161-167.
- Robinson R (1971) *Lepidoptera Genetics*. Pergamon Press, Oxford, 698 pp.
- Sackton TB, Corbett-Detig RB, Nagaraju J, Vaishna L, Arunkumar KP a kol. (2014) Positive selection drives faster-Z evolution in silkmths. *Evolution* **68**: 2331-2342.
- Sahara K, Marec F, Eickhoff U, Traut W (2003) Moth sex chromatin probed by comparative genomic hybridization (CGH). *Genome* **46**(2): 339-342.

- Sahara K, Marec F a Traut W (1999) TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Research* **7**: 449-460.
- Sahara K, Yoshido A, Traut W (2011) Sex chromosome evolution in moths and butterflies. *Chromosome Research* **20**(1): 83-94.
- Sandler L, Novitski E (1957) Meiotic drive as an evolutionary force. *American Naturalist* **91**: 105-110.
- Scriber JM, Hagen RH, Lederhouse RC (1996) Genetics of mimicry in the tiger swallowtail butterflies, *Papilio glaucus* and *P. canadensis* (Lepidoptera: Papilionidae). *Evolution* **50**(1): 22-236.
- Schmitt T, Seitz A (2001) Allozyme variation in *Polyommatus coridon* (Lepidoptera: Lycaenidae): identification of ice-age refugia and reconstruction of post-glacial expansion. *Journal of Biogeography* **28**(9): 1129-1136.
- Sigeman H, Ponnikas S, Chauhan P, Dierickx E, Brooke M de L a kol. (2019) Repeated sex chromosome evolution invertebrates supported by expanded avian sex chromosomes. *Proceedings of the Royal Society B* **286**: 20192051.
- Sohn J-C, Regier JC, Mitter CH, Adamski D, Landry J-F a kol. (2016) Phylogeny and feeding trait evolution of the megadiverse Gelechioidea (Lepidoptera: Obectomera): new insight from 19 nuclear genes. *Systematic Entomology* **41**(1): 112-132.
- Smith CA, Roeszler KN, Ohnesorg T, Cummins DM, Farlie PG a kol. (2009) The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature* **461**: 267-271.
- Suetsugu Y, Futahashi R, Kanamori H, Kadono-Okuda K, Sasanuma S a kol. (2013) Large Scale Full-Length cDNA Sequencing Reveals a Unique Genomic Landscape in a Lepidopteran Model Insect, *Bombyx mori*. *G3* **3**(9): 1481-1492.
- Suomalainen E (1969a) On the sex chromosome trivalent in some Lepidoptera females. *Chromosoma* **28**: 298-308
- Suomalainen E (1969b) Chromosome evolution in the Lepidoptera. *Chromosomes Today* **2**:132-138.
- Šíchová J, Nguyen P, Dalíková M, Marec F (2013) Chromosomal evolution in tortricid moths: conserved karyotypes with diverged features. *PLoS One* **8**: e64520.
- Šíchová J, Ohno M, Dincă V, Watanabe M, Sahara K a kol. (2016) Fissions, fusions, and translocations shaped the karyotype and multiple sex chromosome constitution in the northeast-Asian wood white butterfly, *Leptidea amurensis*. *Biological Journal of the Linnean Society* **118**: 457-471.

- Šíchová J, Voleníková A, Dincă V, Nguyen P, Vila R a kol. (2015) Dynamic karyotype evolution and unique sex determination systems in *Leptidea* wood white butterflies. *BMC Evolutionary Biology*.
- Tazima Y (1964) The genetics of the silkworm. London: Logos Press.
- Talavera G, Lukhtanov VA, Pierce NE, Vila R (2013a) Establishing criteria for higher-level classification using molecular data: the systematics of *Polyommatus* blue butterflies (Lepidoptera, Lycaenidae). *Cladistics* **29**(2): 166-192.
- Talavera G, Lukhtanov VA, Rieppel L, Pierce NE, Vila R (2013b) In the shadow of phylogenetic uncertainty: the recent diversification of *Lysandra* butterflies through chromosomal change. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **69**: 469-478.
- Traut W (1976) Pachytene mapping in the female silkworm *Bombyx mori* L. (Lepidoptera). *Chromosoma* **58**: 275-284.
- Traut W, Marec F (1996) Sex chromatin in Lepidoptera. *The Quarterly Review of Biology* **71**: 239-256.
- Traut W, Marec F (1997) Sex chromosome differentiation in some species of Lepidoptera (Insecta). *Chromosome Research* **5**: 283-291.
- Traut W, Sahara K, Marec F (2007) Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sexual Development* **1**(6): 332-346.
- Traut W, Sahara K, Otto TD, Marec F (1999) Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma* **108**: 173-180.
- Van't Hof AE, Nguyen P, Dalíková M, Edmonds N, Marec F a kol. (2013) Linkage map of the peppered moth, *Biston betularia* (Lepidoptera, Geometridae): a model of industrial melanism. *Heredity* **110**(3): 283-295.
- Vershinina AO, Anokhin BA, Lukhtanov VA (2015) Ribosomal DNA clusters and telomeric (TTAGG)_n repeats in blue butterflies (Lepidoptera, Lycaenidae) with low and high chromosome numbers. *Copmarative Cytogenetics* **9**(2): 161-171.
- Vershinina AO, Lukhtanov VA (2017) Evolutionary mechanisms of runaway chromosome number change in *Agrodiaetus* butterflies. *Scientific Reports* **7**(1): 8199.
- Vicoso B, Bachtrog D (2015) Numerous transitions of sex chromosomes in Diptera. *PLoS Biology* **13**: e1002078.
- Vítková M, Fuková I, Kubíčková S, Marec F (2007) Molecular divergence of the W chromosomes in pyralid moths (Lepidoptera). *Chromosome Research* **15**(7): 917-930.
- Voleníková A (2015) Karyotype and sex chromosomes analysis of two species from basal lepidopteran family Hepialidae (Lepidoptera: Hepialidae). Mgr. Thesis, in Czech.

58 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

- White MJD (1946) The evidence against polyploidy in sexually reproducing animals. *The American Naturalist* **80**: 610-619.
- Wiemers M (2003) Chromosome differentiation and the radiation of the butterfly subgenus *Agrodiaetus* (Lepidoptera: Lycaenidae: *Polyommatus*) – a molecular phylogenetic approach. Ph.D. Thesis, in English. 198 p., University of Bonn.
- Winnepenninckx B, Baceljau T, Dewachter R (1993) Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends in Genetics* **9**: 407.
- Xia Q, Zhou Z, Lu C, Cheng D, Dai F a kol. (2004) A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science* **306**: 1937-1940.
- Yasukochi Y, Ashakumary LA, Baba K, Yoshido A, Sahara K (2006) A second-generation integrated map of the silkworm reveals synteny and conserved gene order between lepidopteran insects. *Genetics* **173**: 1 319-1328.
- Yoshida K a Kitano J (2012) The contribution of female meiotic drive to the evolution of neo-sex chromosomes. *Evolution* **66**(10): 3198-3208.
- Yoshido A, Bando H, Yasukochi Y, Sahara, K (2005a) The *Bombyx mori* Karyotype and the Assignment of Linkage Groups. *Genetics* **170**(2): 675-685.
- Yoshido A, Marec F, Sahara K (2005b) Resolution of sex chromosome constitution by genomic in situ hybridization and fluorescence in situ hybridization with (TTAGG)_n telomeric probe in some species of Lepidoptera. *Chromosoma* **114**(3): 193-202.
- Yoshido A, Marec F, Sahara K (2016) The fate of W chromosomes in hybrids between wild silkmths, *Samia cynthia* ssp.: No role in sex determination and reproduction. *Heredity* **116**: 424-433.
- Yoshido A, Sahara K, Marec F, Matsuda Y (2011) Step-by-step evolution of neo-sex chromosomes in geographical populations of wild silkmths, *Samia cynthia* ssp. *Heredity* **106**: 614 -624.
- Yoshido A, Šíchová J, Kubíčková S, Marec F, Sahara K (2013) Rapid turnover of the W chromosome in geographical populations of wild silkmths, *Samia cynthia* ssp. *Chromosome Research* **21**: 149 -164.
- Yoshido A, Šíchová J, Pospíšilová K, Nguyen P, Voleníková A a kol. (přijato) Evolution of multiple sex chromosomes associated with dynamic genome reshuffling in *Leptidea* wood white butterflies. *Heredity*.