

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Analýza pohlavních chromozomů u vybraných
druhů rodu *Orthosia* (Lepidoptera)**

Diplomová práce

Bc. Renata Kružíková

Školitelka: RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D.

České Budějovice 2023

Kružíková, R., 2023: Analýza pohlavních chromozomů u vybraných druhů rodu *Orthosia* (Lepidoptera). [Analysis of sex chromosomes in the genus *Orthosia* (Lepidoptera). Mgr. Thesis, in Czech.] – 54 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Karyotype analysis of six different species of moths from genus *Orthosia* with focus on sex chromosomes was performed. Each species was examined with the use of cytogenetic and molecular techniques. Chromosomal preparations were obtained from females and males from each species respectively and many hybridization methods were conducted. This approach helped to reveal the presence of the W sex chromosomes in females.

Finanční podpora

Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou České republiky z grantu č. 20-13784S.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

České Budějovice, 12. 4. 2023

.....

Renata Kružíková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Magdě za odborné vedení a přátelský přístup. Za pomoc při sběru dat a výsledků k této práci děkuji Pavlu Potockému, Petru Kouteckému a Václavu Hypšovi. Své poděkování bych také ráda vyjádřila všem svým přátelům a celé své rodině.

Obsah

1 ÚVOD	1
1.1 POHLAVNÍ CHROMOZOMY	1
1.2 EVOLUCE POHLAVNÍCH CHROMOZOMŮ	1
1.3 POHLAVNÍ CHROMOZOMY MOTÝLŮ	3
1.3.1 Chromozom Z.....	4
1.3.2 Chromozom W	4
1.3.3 Sex chromatin	5
1.3.4 Neo-pohlavní chromozomy.....	6
1.4 Určení pohlaví u motýlů.....	7
2 CÍLE PRÁCE	9
3 MATERIÁL A METODY	10
3.1 POUŽITÝ HMYZ.....	10
3.2 PŘÍPRAVA PREPARÁTŮ	10
3.2.1 Chromozomální preparáty z křídelních disků a gonád.....	10
3.2.2 Preparáty z malpighických trubic.....	11
3.3 IZOLACE DNA	11
3.4 PŘÍPRAVA HYBRIDIZAČNÍCH SOND	12
3.4.1 PCR.....	12
3.4.2 Klonování a sekvenace.....	13
3.4.3 Značení sond pomocí nick-translace	14
3.5 HYBRIDIZACE IN SITU	14
3.5.1 Komparativní genomová hybridizace	14
3.5.2 Genomová in situ hybridizace.....	16
3.5.3 Fluorescenční in situ hybridizace	16
3.6 PROHLÍŽENÍ PREPARÁTŮ.....	18
3.7 PRŮTOKOVÁ CYTOMETRIE	18
3.8 FYLOGENETICKÁ ANALÝZA.....	19
3.8.1 Detekce přítomných lokusů pomocí PCR.....	19
3.8.2 Zpracování sekvencí a sestavení kladogramu.....	21
4 VÝSLEDKY	22
4.1 PŘÍTOMNOST SEX CHROMATINU	22
4.2 POČET CHROMOZOMŮ	24
4.3 CGH	25
4.4 GISH.....	27
4.5 FISH	29
4.5.1 Nepřímá FISH s rDNA sondou	29
4.5.2 Nepřímá FISH s amplifikací s telomerickou sondou	32
4.6 VELIKOST GENOMŮ	32
4.7 FYLOGENETICKÁ ANALÝZA.....	35
5 DISKUZE.....	36
5.1 ABSENCE SEX CHROMATINU	36
5.2 POČTY CHROMOZOMŮ	37

5.3 PŘÍTOMNOST CHROMOZOMU W	38
5.4 FISH	40
5.5 VELIKOST GENOMŮ	41
6 ZÁVĚR.....	43
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	45
8 PŘÍLOHY	52

1 ÚVOD

1.1 Pohlavní chromozomy

Pohlavní chromozomy jsou nedílnou součástí karyotypu většiny druhů živočichů. Jsou děděny z generace na generaci a společně s dalšími faktory se mohou podílet na určení pohlaví potomka. Dle toho, jakými pohlavními chromozomy organismus disponuje, rozlišujeme pohlaví heterogametické nebo homogametické. Pohlaví homogametické má pohlavní chromozomy stejné, a tudíž tvoří z hlediska pohlavních chromozomů jeden typ gamet, kdežto pohlaví heterogametické má pohlavní chromozomy různé a tvoří tak gamety dvojího typu. Podle toho, zda je heterogametickým pohlavím samice či samec, lze rozlišit dva systémy (B. Charlesworth, 1996). První systém XX/XY (samice/samec) se nachází typicky u savců, většiny hmyzu a některých dalších organismů. Druhý systém WZ/ZZ (samice/samec) je charakteristický pro motýly, ptáky a jiné živočišné druhy, včetně některých plazů, obojživelníků a ryb (Bachtrog et al., 2014). Dále můžeme dle stupně diferenciacce rozlišit pohlavní chromozomy homomorfní a heteromorfní. Homomorfní chromozomy jsou si podobné stavbou a nesou podobné sekvenční informace, kdežto heteromorfní chromozomy jsou částečně nebo úplně odlišné. Heteromorfní chromozomy můžeme nalézt například u savců či octomilek (Wright et al., 2016). Naopak příkladem systému s homomorfními pohlavními chromozomy je ryba čtverzubec (Kamiya et al., 2012) či nelétaví běžci (Mank & Ellegren, 2007; Vicoso et al., 2013).

1.2 Evoluce pohlavních chromozomů

Pohlavní chromozomy vznikly v různých skupinách eukaryot mnohokrát nezávisle na sobě (Wright et al., 2016). Teorií o vzniku pohlavních chromozomů lze nalézt v literatuře několik, nicméně tradičně přijímaná teorie o vzniku pohlavních chromozomů popisuje jejich vznik z páru autozomů přes pohlavně antagonistickou selekci (B. Charlesworth, 1991). Alternativně přijímaná teorie popisuje vznik pohlavních chromozomů adopcí chromozomu B (Clark & Kocher, 2019; Lewis et al., 2021).

Proces vzniku pohlavních chromozomů dle tradiční teorie začíná u páru homologních autozomů, kdy se na jeden z autozomů přesune lokus zodpovídající za určení pohlaví (B. Charlesworth, 1996; D. Charlesworth et al., 2005). Z tohoto páru autozomů se tak stávají proto-pohlavní chromozomy. Pokud se lokus determinující pohlaví přesunul z jiného páru

pohlavních chromozomů, tak se tento přesun nazývá jako "turnover". V opačném případě, kdy se pohlavní chromozomy v systému nevyskytují, tak pohlavně deterministický lokus může vzniknout u hermafroditů, kde musí dojít ke dvěma mutacím. První mutace vede ke snížení tvorby samčích gamet, čímž vznikne samice, která koexistuje s hermafroditem tvořícím stále oba typy gamet. Druhá mutace, která se u hermafrodita objeví, vede ke snížení tvorby samičích gamet a tudíž vzniká samec (Abbott et al., 2017; Wright et al., 2016). Po vzniku protopohlavních chromozomů se dostávají do vazby s pohlavně deterministickým lokusem geny specifické pro určité pohlaví. Jelikož je výhodné, aby se tyto geny dědily vždy společně, je mezi nimi posílená vazba a snaha o snížení míry rekombinace, která by vazbu mezi nimi rozbila. Působením pohlavně antagonistické selekce se do blízkosti dostávají také geny výhodné právě pro jedno pohlaví, a tím se oblast se sníženou rekombinací může rozšiřovat. Nejsnazším způsobem jak zabránit rekombinaci je utvoření inverze, která zamezí homolognímu párování (Bachtrog, 2006; D. Charlesworth et al., 2005; Rice, 1987). Některé recentní publikace ovšem se zamezením rekombinace skrz inverzi rozporují, a to kvůli nedostatku empirických důkazů takového procesu. V úvahu přichází možné zamezení rekombinace přes neadaptivní proces, například skrz tzv. neutrální model. Tento model vysvětluje snížení míry rekombinace skrz hromadění neutrálních mutací v blízkosti pohlavně determinujícího lokusu s předpokladem, že jakékoliv mutace snižují pravděpodobnost rekombinace (Jeffries et al., 2021). Těmito procesy se v heterozygotním pohlaví z protopohlavních chromozomů stávají diferencované pohlavní chromozomy (Wright et al., 2016).

Dalším krokem v evoluci pohlavních chromozomů je jejich postupná degenerace. Tím, že pohlavní chromozomy v heterozygotním pohlaví přestávají rekombinovat, se mohou na pohlavním chromozomu Y či W hromadit škodlivé mutace a projevit se Hill-Robertsonovy interference. Ty zahrnují efekt Mullerovy rohatky, selekce na pozadí a "hitchhiking" (Bachtrog, 2006; B. Charlesworth & Charlesworth, 1997; Rice, 1987). Zbavení se škodlivých mutací a rozbití interferencí napomáhá právě rekombinace, která u homozygotního pohlaví funguje. Pohlavní chromozomy X či Z tedy mohou těmto efektům unikát, a tak se svojí skladbou podobají spíše autozomům. Naopak pohlavní chromozomy Y a W hromadí čím dál více mutací, ztrácejí geny, akumulují mobilní elementy, a dochází k jejich heterochromatinizaci (Steinemann & Steinemann, 2005). V případě, že pohlavní chromozom Y či W ztratí pohlavně deterministickou funkci, tak může z karyotypu vymizet a vznikají tak systémy X0/XX a Z0/ZZ. Následně může dojít k již zmíněnému "turnoveru" a objevuje se nový systém determinace pohlaví. Pokud je do nějaké míry rekombinace či genová konverze

v heterozygotním pohlaví zachována, tak se může chromozom Y či W zbavovat mutací, a tím se ozdravovat (Abbott et al., 2017; Bachtrog, 2006; Wright et al., 2016).

Evoluce pohlavních chromozomů ale není takto přímočará. Pohlavní chromozomy mohou fúzovat s autozomy za vzniku neo pohlavních chromozomů neo-Y a neo-X či neo-W a neo-Z. Takové neo pohlavní chromozomy (neo-Y a neo-W) mají pak část, která je vysoce diferencovaná a tvořená heterochromatinem pocházejícím ze starého pohlavního chromozomu. Stupeň heterochromatinizace části pocházející z autozomu závisí především na stáří fúze. Původně autozomální část tudíž může být na začátku typicky euchromatinová, ovšem postupně může degenerovat a heterochromatinizovat (Nguyen et al., 2013; Yoshido et al., 2011). Pohlavní chromozomy mohou také podléhat štěpení a vznikají tak systémy s několikanásobnými pohlavními chromozomy (Yoshido et al., 2020).

1.3 Pohlavní chromozomy motýlů

Motýli (Lepidoptera) jsou největší žijící skupinou organismů, u které se nachází heterogametické samice. Typicky se tedy u tohoto taxonu nachází konstituce pohlavních chromozomů WZ či Z0 pro samice a ZZ pro samce. Za původní, tedy ancestrální stav, je považována chromozomální konstituce Z0/ZZ (samice/samec), poněvadž je charakteristická pro bazální druhy motýlů a rovněž pro sesterský taxon chrostíci (Trichoptera). Naopak konstituce pohlavních chromozomů WZ/ZZ (samice/samec) je charakteristická pro pokročilou skupinu Ditrysia, zahrnující valnou většinu žijících druhů řádu Lepidoptera (Sahara et al., 2012).

Existuje ovšem i několik dosud studovaných případů, kdy byl výskyt chromozomu W, typický pro pokročilé druhy, prokázán i u bazálních druhů motýlů. Například Voleníková v roce 2015 studovala ve své diplomové práci bazální druh hrotnokřídlece (Hepialidae), *Phymatopus californicus*, v jehož karyotypu chromozom W objevila. Naopak u některých druhů pokročilých motýlů může chromozom W chybět. Tak tomu je například u poddruhu martináče pajasanového, *Samia cynthia* (Saturnidae), u kterého byla prokázána druhotná ztráta pohlavního chromozomu W (Yoshido et al., 2016). Dalším příkladem budiž různorožec olšový, *Aethalura punctulata* (Geometridae), u kterého byla rovněž zaznamenána absence chromozomu W (Hejníčková et al., 2021).

Pohlavní chromozomy se mohou u motýlů nacházet v numerických variantách. Například u bělásků rodu *Leptidea* jsou numerické varianty poněkud časté a nachází se zde systémy, které mohou mít i čtyři chromozomy W a čtyři chromozomy Z. Tento konkrétní případ byl odhalen u druhu *Leptidea reali* (Šíchová et al., 2015). Správný rozchod

mnohočetných chromozomů během meiózy je pak zajištěn tvorbou multivalentů (Traut & Marec, 1997; Yoshido et al., 2005).

Chromozomy u motýlů, včetně těch pohlavních, nebyly dosud u většiny druhů zkoumány. Je tomu tak především kvůli jejich vysokému počtu s nejčastějším stavem $2n = 60/62$ a také charakteristicky malé velikosti a nelokalizované centromere. Je tedy možné, že s dalšími studiemi pohlavních chromozomů budou případy, které se vymykají původním konceptům, přibývat (Traut et al., 2007).

1.3.1 Chromozom Z

Pohlavní chromozom Z se svojí stavbou podobá autozomům. Obvykle není degenerovaný a nachází se na něm mnoho funkčních genů. Chromozom Z se u samců motýlů nachází obvykle ve dvou kopiích, kdežto u samic pouze v jedné kopii (Traut et al., 2007). Při zkoumání sekvencí na chromozomu Z bylo odhaleno, že je tento chromozom napříč řádem Lepidoptera konzervovaný a má zachovanou syntenii. To bylo zjištěno porovnáváním chromozomů Z různých druhů motýlů s chromozomem Z modelového druhu bource morušového (*Bombyx mori*) a odhalením homologie mezi nimi (Dalíková et al., 2017; Fraïsse et al., 2017).

1.3.2 Chromozom W

Pohlavní chromozom W je ve většině případů velice odlišný od pohlavního chromozomu Z. Typicky je motýlí chromozom W oproti chromozomu Z velikostně menší, degenerovaný a obsahuje velice málo funkčních genů (Traut et al., 2007, 2013). Chromozom W je často tvořen zcela nebo z části heterochromatinem a je v somatických tkáních transkripčně inaktivní (Traut et al., 2019; Traut & Marec, 1996). Tvorba velkých bloků heterochromatinu je pravděpodobně způsobena vysokým zastoupením repetitivních sekvencí na tomto chromozomu (Abe et al., 2005; Fuková et al., 2007; Hejníčková et al., 2023; Traut et al., 2013). Tím, že se chromozom W kondenzuje do heterochromatinu, jej lze u některých druhů pozorovat v polyploidních interfázních jádrech jako takzvaný sex chromatin (Traut et al., 2007; Traut & Marec, 1996). I přes svou vysokou míru degenerace může být chromozom W velice důležitý při pohlavní determinaci jedince. Například u bource morušového (*B. mori*) byl na chromozomu W objeven lokus *Fem*, který má funkci hlavního spouštěče pohlavně determinující dráhy směrem k samici (Kiuchi et al., 2014). Naopak byly popsány i některé

příklady, kde chromozom W přímou roli v určení pohlaví nehraje. Například u dvou poddruhů martináče pajasanového (*Samia cynthia ssp.*) bylo v roce 2016 reciprokým křížením dosaženo hybridního potomstva, u kterého byly detekovány samice bez chromozomu W a zároveň byli nalezeni samci, kteří chromozom W ve svém karyotypu měli (Yoshido et al., 2016). V roce 2023 byl pak proces determinace pohlaví u tohoto druhu částečně objasněn (Yoshido & Marec, 2023).

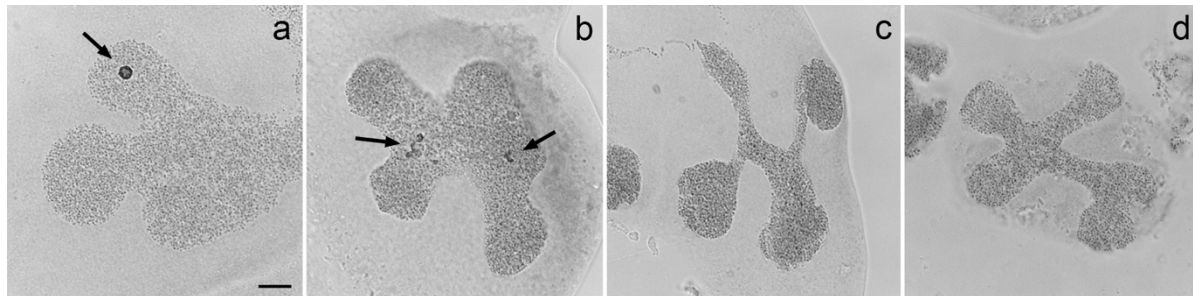
Kdy přesně se během evoluce pohlavní chromozom W u motýlů objevil a jakým způsobem vznikl není dosud objasněné. Předpokládá se, že tento chromozom vznikl buď z autozomu, jehož homolog zfúzoval s chromozomem Z, či z chromozomu B, který začal párovat s chromozomem Z (Dalíková et al., 2017; Lewis et al., 2021; Lukhtanov, 2000; Traut & Marec, 1996). Vzhledem k tomu, že chromozom W během meiózy nerekombinuje a obsahuje mnoho repetitivních sekvencí, je jeho evoluční vývoj poněkud rychlý. V zásadě mohou být sekvence na chromozomu W rozděleny do třech skupin, a to do sekvencí specifických pro chromozom W, do sekvencí obohacených na chromozomu W a sekvencí abundantních i v jiných částech genomu. Sekvence, které jsou obohacené na chromozomu W, se vyskytují především na chromozomu W, ale mohou se vyskytovat i na jiných chromozomech, kdežto sekvence specifické pro chromozom W se nachází pouze na chromozomu W. Sekvence abundantní se pak hojně vyskytují i na jiných chromozomech než na W. Poměr těchto sekvencí se může lišit i mezi jednotlivými blízce příbuznými druhy, což bylo ukázáno v mnohých komparativních studiích (např. Fuková et al., 2005; Šíchová et al., 2013; Vítková et al., 2007).

1.3.3 Sex chromatin

Přítomnost sex chromatinu, tedy pozorovatelného heterochromatinu tvořeného chromozomem W, byla považována za charakteristický znak samic ze skupiny Ditrysia a Tischeriidae. Proto byl sex chromatin používán jako marker pro přítomnost chromozomu W u samic. Díky pozorování stavu sex chromatinu v polyploidních interfázních jádrech byla u velkého množství druhů určena přítomnost a stav chromozomu W. V případě nepřítomnosti sex chromatinu byla u druhu vyvozena absence chromozomu W (Traut & Marec, 1996).

V aktuálním výzkumu bývá přítomnost sex chromatinu jakožto zaručeného indikátoru přítomnosti chromozomu W poněkud zpochybňována. Je tomu tak protože vzhled a přítomnost sex chromatinu mohou být ovlivněny mnoha jevy. Například u jasoně dymnivkového (*Parnassius mnemosyne*), u kterého proběhla fúze chromozomu W

a autozomu, byla pozorována absence sex chromatinu i přes přítomnost chromozomu W (Vlašánek et al., 2017). Dalším příkladem je mutantní linie zavíječe moučného (*Ephesia kuehniella*), u kterého byla část autozomu translokovaná na chromozom W a taktéž u něj nebyl sex chromatin pozorován. Zároveň některé mutantní linie s přestavbami zahrnující chromozom W měnily podobu sex chromatinu (Marec & Traut, 1994). Ukázky polyploidních interfázních jader malpighických tubic mutantních linií *E. kuehniella* jsou vyobrazeny na **Obrázku 1**. Hejníčková et al. ve své publikaci z roku 2021 uvádí, že pozorování velkého a nápadného sex chromatinu koreluje s přítomností silně diferencovaného a heterochromatinizovaného chromozomu W nezávisle na jeho velikosti. Ze získaných výsledků v práci navrhuje, že tvorba sex chromatinu je podmíněna přítomností heterochromatinu v karyotypu a ne přímo přítomností chromozomu W. Zároveň ale bylo ukázáno, že i přes přítomnost heterochromatinu na W se sex chromatin nemusí vyskytovat (Hejníčková et al., 2021). U některých druhů bylo ale skutečně ověřeno, že chybějící sex chromatin znamenal nepřítomnost chromozomu W. Těmito případy jsou například mol šatní (*Tineola bisselliella*) (Dalíková et al., 2017), tři druhy vakonošů (Psychidae) (Hejníčková et al., 2019) a různorožec olšový (*Aethalura punctulata*) (Hejníčková et al., 2021).



Obrázek 1: Přítomnost a absence sex chromatinu v polyploidních interfázních jádrech malpighických žláz zavíječe moučného *Ephesia kuehniella*. **(a)** klasický sex chromatin samice divoké linie, **(b)** deformovaný a fragmentovaný sex chromatin samice z linie s translokací části chromozomu Z na chromozom W, **(c)** zcela fragmentovaný sex chromatin samice s fúzí chromozomu W s autozomem, **(d)** jádro bez sex chromatinu u samce divoké linie. Měřítko = 10 µm. Obrázek byl vytvořen a poskytnut RNDr. Magdou Zrzavou, Ph.D.

1.3.4 Neo-pohlavní chromozomy

Evoluce chromozomů zahrnuje chromozomální přestavby, mezi které spadá i tvorba neo pohlavních chromozomů, které vznikají tak, že některý z autozomů fúzuje s některým z pohlavních chromozomů. U motýlů tak vznikají chromozomy neo-W a neo-Z. Bylo

ukázáno, že tvorba takových neo pohlavních chromozomů může zapříčinit vznik reprodukční bariéry, a tím napomocť vzniku druhů (Nguyen & Carabajal, 2016). Například u obaleče jablečného (*Cydia pomonella*) byl objeven pohlavní chromozom neo-Z, jehož autozomální část je homologická s chromozomem 15 bource morušového (*B. mori*). Díky této fúzi autozomu s chromozomem Z byly do své blízkosti přeneseny geny zapojené v rezistenci k insekticidům a geny hrající roli v detoxifikaci obranných metabolitů hostitelské rostliny. Tím, že byly geny přeneseny do vzájemné blízkosti na chromozomu Z se mezi nimi vytvořila vazba na pohlavní chromozom. Tím byl zvýšen adaptivní potenciál této skupiny Tortricidae, což mohlo přispět k jejich radiaci a speciaci (Nguyen et al., 2013). Tvorbu takových fúzí pohání u motýlů pravděpodobně vysoký obsah repetice na pohlavních chromozomech (Nguyen & Carabajal, 2016).

1.4 Určení pohlaví u motýlů

U motýlů se systémem pohlavních chromozomů WZ/ZZ rozhoduje o pohlaví distribuce chromozomů do vajíčka. Samec do potomstva předá vždy pohlavní chromozom Z, záleží tedy na tom, který chromozom předá matka. Pokud matka předá do vajíčka chromozom Z, tak vznikne zygota s pohlavními chromozomy ZZ a vzniká samčí jedinec. V případě, že matka předá chromozom W, bude mít jedinec pohlavní chromozomy WZ a vzniká z něj samice. Mechanismy pohlavní determinace nejsou u motýlů až na výjimky objasněny. Existuje ovšem několik teorií o tom, jak by systém pohlavní determinace mohl fungovat. Primární signál určující pohlaví může být teoreticky umístěn na chromozomu W, mít feminizační účinky a způsobovat tak vývoj v samici (Traut et al., 2007). Takový systém pohlavní determinace byl objeven u modelového druhu bource morušového (*B. mori*), kde faktor *Fem* určující samčí pohlaví leží na chromozomu W (Kiuchi et al., 2014).

Dalším způsobem určení pohlaví může být určení skrz pohlavní chromozom Z. V takovém případě by pohlaví jedince bylo pravděpodobně závislé na počtu chromozomů Z v embryu a poměru ku autozomům ("Z-counting" mechanismus). Takový systém determinace pohlaví se pravděpodobně nachází u druhů, které nemají pohlavní chromozom W, a mají tak chromozomální konstituci Z0/ZZ (samice/samec). Konstituce ZZ, tedy přítomnost dvou chromozomů Z by vedla k tvorbě samce. Naopak v přítomnosti pouze jednoho chromozomu Z, tedy při konstituci Z0, by vznikalo embryo samčího pohlaví. Takový systém určení pohlaví nebyl u motýlů u žádného z druhů dlouho prokázán (Traut et al., 2007). Avšak Yoshida a Marec ve své recentní publikaci z roku 2023 poprvé představují důkaz pro existenci

takového systému určení pohlaví. Ve své práci ukázali, že změna ploidie u poddruhu martináče pajasanového *Samia cynthia ricini* s pohlavními chromozomy Z0/ZZ, která mění poměr chromozomů Z ku autozomům, přímo ovlivňuje pohlaví jedince. Je tedy zřejmé, že u tohoto poddruhu martináče pajasanového je pohlaví určeno pomocí "Z-counting" mechanismu, tedy že záleží na poměru mezi autozomy a pohlavními chromozomy Z (Yoshido & Marec, 2023).

2 CÍLE PRÁCE

V roce 1968 byla pozorována absence sex chromatinu u můry jarnice hladké (*Orthosia gracilis*, čeleď Noctuidae) a tudíž byla tato můra považována za druh postrádající chromozom W. Teorii o absenci chromozomu W podpořilo také to, že u samice byl diploidní počet chromozomů spočítán na 27 a u samců na 28. To znamená, že u samic se v diploidním jádře nacházelo o jeden chromozom méně nežli u samců (Traut & Mosbacher, 1968). Vzhledem k tomu, že absence chromozomu W je u skupiny Ditrysia velice vzácná, dále že nepřítomnost sex chromatinu byla ukázána jako nepřiliš přesný důkaz absence chromozomu W, a že jeden chybějící chromozom u samic lze vysvětlit například i fúzí chromozomu W s autozomem, je nutné domnělou ztrátu chromozomu W u tohoto druhu ověřit (Hejníčková et al., 2021). Motivací pro toto ověření je především to, že v případě, že by byla zjištěna ztráta chromozomu W, stal by se tento druh velice zajímavým pro potenciální zkoumání pohlavně determinálních mechanismů, jelikož je jasné, že v takovém případě by se chromozom W takové dráhy účastnit nemohl. Dílčí cíle této práce tedy byly následující:

- 1) Provedení komparativních cytogenetických metod pro odhalení přítomnosti či absenci chromozomu W u jarnice hladké (*O. gracilis*).
- 2) Provedení těchto analýz rovněž u blízce příbuzných druhů z rodu jarnice (*Orthosia*).
- 3) Sestavení fylogenetického kladogramu zkoumaných druhů.
- 4) Určení velikosti genomů a porovnání mezi samicemi a samci.

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Použitý hmyz

V této práci byli studovanými organismy noční motýli rodu jarnice (*Orthosia*) z čeledi můrovití (Noctuidae). Konkrétně byly zkoumány druhy jarnice lipová (*Orthosia cerasi*), jarnice menší (*O. cruda*), jarnice ovocná (*O. gothica*), jarnice hladká (*O. gracilis*) a jarnice březnová (*O. incerta*). Dospělé samice byly odchytávány v letech 2020, 2021 a 2022 během března až května ve smíšených lesích v okolí Českých Budějovic pomocí světelných pastí. S odchycem a determinací nám velmi pomohl Pavel Potocký, za což mu děkuji. Pro možnost porovnání tohoto rodu *Orthosia* s jiným příbuzným rodem z čeledi Noctuidae byla v roce 2022 odchycena také jedna samice mûry ozdobné (*Perigrapha i-cinctum*). Odchycené samice byly rozděleny do plastových krabiček s tekutou potravou, tedy vodou s medem, a byly zde ponechány pro naklazení vajíček. Z vajíček se přibližně po týdnu vylíhly larvy, které byly živěny listy z třešně ptačí (*Prunus avium*), jabloně domácí (*Malus domestica*) a meruňky obecné (*Prunus armeniaca*). Takto chovány byly do stádia posledního larválního instaru, kdy z části larev byly připraveny preparáty z malpighických trubic, mitotické preparáty a samčí meiotické preparáty. Větší část larev se ponechala k zakuklení. Zhruba tři týdny po zakuklení byly z ovariální tkáně kukel připraveny samičí meiotické preparáty. Po připravení chromozomálních preparátů byl zbytek těla zamražen v tekutém dusíku a dále byl uchováván v mrazničce (-20 °C) pro následnou izolaci DNA a měření velikosti genomu.

3.2 Příprava preparátů

3.2.1 Chromozomální preparáty z křídelních disků a gonád

Křídelní disky samičích a samčích larev posledního instaru posloužily jako materiál pro přípravu mitotických preparátů. Pro přípravu meiotických preparátů byly použity gonády, a to z larev posledního instaru v případě samců a z kukel v případě samic.

Křídelní disky i gonády byly vypitvány ve vychlazeném (4 °C) fyziologickém roztoku (0,9% NaCl, 0,042% KCl, 0,025% CaCl₂, 0,02% NaHCO₃) na Petriho misce s voskem. Křídelní disky a samčí gonády (testes) byly po vypitvání ihned přesunuty na 8 minut do hypotonického roztoku (0,075 M KCl) a poté do fixačního roztoku (etanol:chloroform:kyselina octová 6:3:1) na 15 minut. Samičí gonády (ovária) byly po vypitvání ihned přesunuty do fixačního roztoku. Po fixáži trávající přibližně 15 minut byla

vypitvaná tkáň přesunuta do kapky 60% kyseliny octové na podložní sklo (Superfrost, Menzel-Gläser, Německo). Následně byla vypitvaná tkáň macerovaná wolframovými jehlami a poté jehlou rozptýlena po podložním skle během čehož bylo sklo zespod ohříváno na 45 °C na histologické plotýnce. Po rozptýlení kapky s macerovanou tkání byl preparát odvodněn ve vzestupné etanolové řadě (70%, 80%, 100%) a uchován v mrazničce (-20 °C) do dalšího použití.

3.2.2 Preparáty z malpighických trubic

Ve fyziologickém roztoku byly z housenek samic i samců vypitvány malpighické trubice, které byly následně přesunuty na čisté podložní sklo. Na podložním skle byla tkáň zakápnutá fixačním roztokem a krátce ponechána k fixaci. Poté byla zbylá tekutina sklepnuta na filtrační papír a fixovaná tkáň byla zakápnutá kapkou 1,25% lakto-aceto-orceinu k obarvení. Na takto obarvenou tkáň bylo umístěno krycí sklíčko, poté bylo zbylé barvivo odsáté filtračním papírem, a nakonec bylo krycí sklíčko zafixováno na místě pomocí laku na nehty. Preparáty z malpighických trubic byly skladovány při 4 °C a pozorovány pro přítomnost či absenci sex chromatinu pod světelným mikroskopem.

3.3 Izolace DNA

Genomová DNA (gDNA) byla izolována ze zmražených těl housenek a kukel pomocí cetrimoniumbromidu (CTAB). Nejprve byl připraven pufr, který ve výsledné koncentraci obsahoval 2% CTAB, 100 mM Tris HCl (pH=8), 40 mM kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA, pH=8), 1,4 M NaCl, 0,2% beta-merkaptoethanol a 0,1 mg/ml proteinázy K. Takto připravený pufr byl předeřtý na 37 °C a rozdělen do zkumavek po 800 µl. Do zkumavky s předeřtým pufrem byla následně vložena část těla housenky či kukly (přibližně třetina těla), která byla plastovým tloučkem v pufru rozmělněna. Po rozmělnění tkáně byly zkumavky umístěny přes noc do termobloku na 60 °C během zapnutého třepání na 300 rpm. Další den byl ke tkáni přidán stejný objem chloroformu a dvě minuty bylo se zkumavkami obraceno tak, aby došlo k promíchání objemů. Následně byly zkumavky 10 minut odstředovány na 14000 g při 4 °C.

Po centrifugaci byla odebraná horní vrstva do nové zkumavky a byl zopakován krok přidání chloroformu a následného odstředění. Utvořená horní vrstva byla znovu přemístěna do nové zkumavky a bylo k ní přidáno 5 µl RNázy A (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich, USA). Poté

byly vzorky umístěny na půl hodiny do 37 °C. Po inkubaci s RNázou byly ke vzorkům přidány dvě třetiny objemu isopropanolu. Zkumavky byly lehce promíchány a ponechány přibližně dvě hodiny v pokojové teplotě. Po uplynutí této doby byly zkumavky odstředovány 15 minut na 14000 g při 4 °C. Utvořený pelet byl následně dvakrát omyt 600 µl vychlazeného (-20 °C) 70% etanolu. Po odsátí veškerého etanolu byl pelet DNA rozpuštěn v miliQ vodě (30-60 µl dle velikosti peletu).

Kvalita a koncentrace rozpuštěné DNA byla měřena na spektrofotometru Nanodrop 2000 a fluorimetru Qubit 3.0 (oba přístroje ThermoFischer Scientific, USA). Úroveň fragmentace získané DNA byla určována z elektroforetické separace v 1% agarózovém gelu v TAE pufru.

3.4 Příprava hybridizačních sond

3.4.1 PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) byla použita pro amplifikaci části genu pro ribozomální RNA 18S. Vzniklý produkt bylo později možné zaklonovat do vektoru a osekvenovat a následně použít jako templát pro výrobu sondy. Primery byly v naší laboratoři již k dispozici a byly navrženy podle sekvence podjednotky 18S z *Galleria mellonella* (Whiting, 2002), jejich sekvence se nachází v **Tabulce I**. Primery byly dodány firmou Generi Biotech s.r.o. (Hradec Králové, Česká republika). Jakožto templátová DNA byla pro tuto reakci použita gDNA izolovaná z dospělé samice obaleče jablečného (*Cydia pomonella*).

Tabulka I: Primery použité při PCR.

Lokus	Sekvence primerů 5'-3' (Forward/Reverse)	Nasedací teplota (°C)	Velikost očekávaného produktu (bp)
18S	CGATACCGCGAATGGCTCAATA ACAAAGGGCAGGGACGTAATCAAC	57	1650

PCR reakce o celkovém objemu 25 µl obsahovala 0,5 µM od obou z primerů, 0,2 mM každého z nukleotidů (TaKaRa, Japonsko), 1x Ex Taq pufr (TaKaRa), 2 U Ex Taq polymerázy (TaKaRa) a zhruba 50 ng gDNA. Zkumavky s reakcemi byly umístěny do termocykleru (TProfessional TRIO PCR Thermocycler, Biometra, Německo) s následujícími parametry: 3 minuty počáteční denaturace při 94 °C, 30 cyklů skládajících se

z minutové denaturace při 94 °C, minutového nasedání primerů při 57 °C a minutového prodloužení (elongace) při 72 °C, následně byla reakce zakončena finální elongací při 72 °C na 5 minut.

Výsledný PCR produkt byl společně s velikostním markerem elektroforeticky separován v 1% agarózovém gelu v TAE pufru. Po ověření správné délky PCR produktu byl výsledný produkt přečištěn pomocí reagentu ExoSAP-IT (Applied Biosystems, USA) dle protokolu od výrobce. Poté co byl produkt přečištěn, byla změřena jeho koncentrace na fluorimetru Qubit 3.0 (ThermoFischer Scientific) a dále byl produkt použit pro ligaci do vektoru (viz kapitulu **3.4.2**).

3.4.2 Klonování a sekvenace

Produkt, který byl získaný pomocí PCR a přečištěný pomocí ExoSAP-IT byl zaligován do vektoru Promega pGem T-Easy Vector (Promega, USA) podle protokolu přiloženého výrobcem. Ligační směs o celkovém objemu 10 µl obsahovala 50 ng přečištěného PCR produktu, 1x ligační pufr, 50 ng vektoru a 3 U T4 ligázy. Tato směs byla ponechána k inkubaci po dobu přibližně 16 hodin při teplotě 4 °C.

Po uplynutí doby inkubace byla provedena transformace vektoru do kompetentních bakteriálních buněk *Escherichia coli*. Buňky byly nejprve po vyjmutí z mrazničky (-80 °C) ponechány na ledě 15 minut a poté byly přidány k ligační směsi (2,5 µl ligační směsi na 50 µl kompetentních buněk) a ponechány na ledě 30 minut. Po uplynutí této doby byl proveden teplotní šok bakterií na přesně 90 sekund při 42 °C. Poté byly bakterie ihned prudce ochlazeny na ledu po dobu dvou minut. Následně bylo do směsi přidáno LB médium a celá směs byla ponechána 45 minut při 37 °C. Poté byly buňky rovnoměrně rozprostřeny na Petriho misku s LB médiem s agarem, 143 mM sodnou solí ampicilinu, 0,5 mM Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) a 122 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (X-gal) a inkubovány přibližně 18 hodin při 37 °C.

Po inkubaci na Petriho misce byla provedena modro-bílá selekce a bílé kolonie s inzertem byly přeočkovány na čistou Petriho misku a ponechány k dalšímu růstu. Pro ověření, zda kolonie nesou chtěný inzert, byl proveden test spočívající v PCR s univerzálními primery M13. Kolonie, u kterých PCR potvrdila přítomnost inzertu, byly inokulovány do 3 ml tekutého LB média se 143 mM ampicilinem při 37 °C na 16 hodin. Z inokulovaných kolonií byl následně vyizolován plazmid pomocí kitu NucleoSpinPlasmid (Macherey-Nagel, Německo) podle protokolu přiloženého výrobcem. Vyizolované plazmidy

byly odeslány na sekvenaci do firmy SeqMe (Dobříš, Česká republika) a byly sekvenovány za pomoci univerzálních primerů M13.

3.4.3 Značení sond pomocí nick-translace

Značení hybridizačních sond bylo provedenou metodou nick-translace, která spočívá v použití endonukleázy pro vytvoření zlomů DNA a následné inkorporaci fluorescenčně značených nukleotidů pomocí DNA polymerázy I. Jakožto endonukleáza byla použita DNáza I, která poškodila řetězec DNA. DNA polymeráza I takto poškozený řetězec dokáže odbourat a místo něj nasyntetizovat nový, do kterého inkorporuje běžné nukleotidy společně se značenými, čímž je docíleno rovnoměrně naznačené DNA. Takovýmto způsobem byly vytvořeny sondy pro genomovou komparativní hybridizaci (CGH), genomovou *in situ* hybridizaci (GISH) a pro nepřímou fluorescenční *in situ* hybridizaci (FISH). SONDY BYLY ZNAČENY FLUOROCHROMY ATTO-488 A CY3 NEBO BIOTINEM. ZNAČENÍ BYLO PRAVIDENO POMOCÍ KITU NT Labeling kit (Jena Bioscience, Německo). Jednotlivé reakce byly smíchány dle pokynů od výrobce do celkového objemu 20 µl. Jako templát byla u celogenomových sond použita gDNA izolovaná podle postupu popsáném výše (viz kapitolu 3.3). U výroby telomerické sondy byl jako templát použit PCR produkt telomerické hmyzí sekvence připravený pomocí beztemplátové PCR jinými členy laboratoře. Při výrobě 18S sondy byl do značící směsi jako templát přidán PCR produkt z osekvenovaného přečištěného plazmidu obsahujícího úsek 18S, který byl naamplifikován podle postupu popsáného v kapitole 3.4.1. Následovala inkubace v 15 °C, která probíhala 1,5 hodiny. Po uplynutí inkubační doby byla reakce zastavena pomocí Stop buffer z kitu. Následně byla ověřena délka sondy na 1,5% agarozovém gelu v TAE a v případě vyhovující délky 200-500 bp byla sonda ihned použita pro hybridizaci na preparát, či byla uchována v -20 °C do dalšího použití.

3.5 Hybridizace *in situ*

3.5.1 Komparativní genomová hybridizace

Komparativní genomová hybridizace neboli CGH, je metoda, při které jsou na chromozomální preparát hybridizovány dvě celogenomové sondy – samičí sonda značená zeleně pomocí fluorochromu ATTO-488 a samčí sonda značená červeně pomocí fluorochromu Cy3. Popis výroby sond je popsán výše v kapitole 3.4.3. Tyto sondy si vzájemně konkurují o vazebné komplementární místo na chromozomech a mohou pomoci odhalit

případné odlišnosti mezi pohlavními chromozomy u samic a samců. CGH může rovněž poskytnout informace o složení chromozomu W.

Hybridizační směs byla připravena pro každý chromozomální preparát zvlášť. Nejprve byla smíchána samičí a samčí sonda, tak aby od každé bylo ve směsi 300 ng DNA. Ke směsi sond bylo přidáno 25 µg sonikované DNA z lososích spermií, která slouží jako kompetitor při hybridizaci. Dále byla ke směsi přidána desetina celkového objemu 3M octanu sodného (pH 8) a následně dvou a půl násobek celkového objemu vychlazeného 100% etanolu. Tato směs byla následně odstředována 15 minut při 4 °C na 14000 g. Po dokončení centrifugace byl ze zkumavky odebrán supernatant a bylo přidáno 500 µl vychlazeného 70% etanolu. Následně byla směs opět odstředována stejným způsobem, tentokrát pět minut. Poté byl odstraněn supernatant a vzniklý pelet byl rozpouštěn po dobu 30 minut v 5 µl 100% deionizovaného formamidu, který byl předeřát na 37 °C. Následně bylo přidáno 5 µl 20% dextran sulfátu v 4x SSC a směs byla vložena na 5 minut do 90 °C k denaturaci. Ihned po uplynutí pěti minut byla směs prudce zchlazena na ledu. Tato směs byla následně inkubována 1,5 hodiny v 37 °C. Během tohoto prehybridizačního kroku došlo v hybridizační směsi k renaturaci části repetitivních sekvencí.

Během toho, co se hybridizační směs inkubovala, byly chromozomální preparáty ošetřeny RNázou a následně denaturovány formamidem. Směs RNázy obsahovala 200 ng/µl RNázy A (Sigma-Aldrich) v 2x SSC (0,3M NaCl, 0,03M citronan sodný, pH 7). Na každý preparát bylo aplikováno 100 µl této směsi, která byla překryta krycím sklíčkem a ponechána k inkubaci v 37 °C po dobu 1 hodiny. Po inkubaci byl preparát dvakrát promýván po dobu pěti minut v 2x SSC. Následně na něj byla aplikována formamidová směs, která obsahovala 70% formamid (Sigma-Aldrich) v 2x SSC. Preparát s aplikovaným formamidem byl přenesen na plotýnku vyhřátou na 68 °C a byl denaturován po dobu 3,5 minuty. Poté bylo odstraněno krycí sklo a preparát byl ihned zchlazen ve vychlazeném (-20 °C) 70% etanolu po dobu 1 minuty a následně odvodněn ve vzestupné etanolové řadě 80% a 100% etanolu po 30 sekundách.

Na připravený a osušený preparát bylo nanášeno 10 µl hybridizační směsi sond. Následně byl preparát překryt krycím sklíčkem, jehož okraje byly přelepeny pomocí lepidla Rubber Cement (Marabu GmbH & Co., Německo), a inkubován 3 dny v 37 °C. Po inkubaci bylo odstraněno krycí sklíčko a preparát byl promyt v 1% Triton X (Sigma-Aldrich) v 0,1x SSC 2 minuty při pokojové teplotě a 5 minut při 45 °C. Poté bylo na sklíčko nanášeno 25 µl DAPI (0,5 µg/ml) v DABCO (obojí Sigma-Aldrich, USA) a překryto krycím sklíčkem,

které bylo po okrajích zapečetěno lakem na nehty. Po uschnutí laku byl preparát pozorován pod mikroskopem a dále uchováván v lednici při 4 °C.

3.5.2 Genomová *in situ* hybridizace

Genomová *in situ* hybridizace (GISH) je metoda, při které se používá fluorescenčně značená DNA ze samice (celogenomová samičí sonda) a samčí neznačená DNA, která plní funkci kompetitora. Metoda GISH umožňuje identifikaci chromozomu W, ale je méně informativní než metoda CGH, poněvadž neposkytuje informace o složení chromozomu. Vzhledem k tomu, že metoda CGH dlouhodobě neposkytovala žádné výsledky a nebylo dostatek času pro její maximální optimalizaci, byla pro studium zkoumaných druhů zvolena rovněž metoda GISH.

Postup při této metodě byl následující. Samčí gDNA byla ponechána k naštípání na kratší fragmenty při 90 °C po dobu 30 minut. Samičí gDNA byla naznačena fluorochromem Cy3. Pro současnou identifikaci rovněž telomerických sekvencí chromozomů, byla samičí sonda doplněna i o telomerickou sondu, značenou fluorochromem ATTO-488. Obě sondy byly značeny metodou nick-translace (kapitola 3.4.3).

Hybridizační směs obsahovala 3000 ng samčího kompetitora, 300 ng samičí sondy, 300 ng telomerické sondy (pouze v případě, že cílem bylo detekování i telomerických sekvencí), 25 µg DNA ze sonikovaných lososích spermií, 1/10 celkového objemu 3M octanu sodného (pH 8) a 2,5 násobek celkového objemu 100% vychlazeného etanolu. Následný postup u GISH byl stejný jako u CGH, s tím rozdílem, že u GISH byl vynechán prehybridizační krok.

Po dokončení bylo na preparát nanášeno 25 µl DAPI (0,5 µg/ml) v DABCO (obojí Sigma-Aldrich). Sklíčko bylo překryto krycím sklem a přebytek DAPI byl vytlačen do filtračního papíru. Krycí sklo bylo zajištěno na místě pomocí laku na nehty. Preparáty byly pozorovány pod mikroskopem a dále uchovávány v neprůhledné krabici v lednici (4 °C).

3.5.3 Fluorescenční *in situ* hybridizace

Tato metoda, známá pod zkratkou FISH, umožňuje lokalizaci jednotlivých lokusů na chromozomech díky specifickým sondám. Sondy mohou být značeny buď přímo fluorochromem, kdy se pak hovoří o přímé FISH, či biotinem, v takovém případě se metoda nazývá nepřímá FISH. Při použití sondy značené biotinem se poté sonda detekuje protilátkou,

kteřá zesílí signál, v této práci konkrétně pomocí streptavidinu konjugovaného s fluorochromem Cy3. V případě této práce byly sondy značeny biotinem a byla tedy provedena nepřímá FISH.

3.5.3.1 Nepřímá FISH s 18S rDNA sondou

Hybridizační směs obsahovala 50 ng 18S rDNA sondy značené biotinem, 25 µg sonikované DNA z lososích spermií, 1/10 celkového objemu 3M octanu sodného (pH 8) a 2,5 násobek celkového objemu vychlazeného 100% etanolu. Sonda byla vysrážena a rozpuštěna ve formamidu stejným způsobem jako v metodě CGH a GISH. Na odvodnění preparáty bylo poté nanášeno 10 µl připravené sondy, preparáty byly zakryty krycím sklíčkem, přelepeny pomocí lepidla Rubber Cement a ponechány 24 hodin v 37 °C pro hybridizaci.

Po hybridizaci byly preparáty během míchání promývány dvakrát 5 minut v 2x SSC v 42 °C, dvakrát 5 minut v 0,1x SSC v 42 °C, jednou 5 minut v 2x SSC v 42 °C, jednou 10 minut v 2x SSC v pokojové teplotě a následně jednou 15 minut v roztoku WBB (4x SSC, 0,1% Tween, 1% sušené odtučněné mléko (Difco™ Skim Milk, Becton Dickson and Company, USA)) v pokojové teplotě již bez míchání. Po promývacích krocích bylo na preparáty nanášeno 100 µl streptavidinu konjugovaného s Cy3 v WBB (0,1 µl streptavidinu s Cy3 (9 ng/ml) na 100 µl WBB). Preparáty byly překryty krycím sklíčkem a přemístěny do vlhké komůrky do 37 °C po dobu 1 hodiny. Po inkubaci byly preparáty promývány třikrát 5 minut v roztoku WBB v 45 °C s mícháním.

Po promytí bylo na preparáty nanášeno 25 µl DAPI (0,5 µg/ml) v DABCO (obojí Sigma-Aldrich). Preparáty byly překryty krycím sklem a zpod něj byly odstraněny případné bublinky a pomocí filtračního papíru byl vytlačen přebytek DAPI v DABCO. Okraje krycího skla byly následně zalakovány lakem na nehty, tak aby sklo drželo na místě a preparát nevysychal. Hotové preparáty byly skladovány v neprůhledné krabičce ve 4 °C a následně prohlíženy pod mikroskopem.

3.5.3.2 Nepřímá FISH s telomerickou sondou s amplifikací signálu

Při nepřímé FISH s telomerickou sondou a amplifikací signálu bylo postupováno podobně jako u nepřímé FISH bez amplifikace signálu. Složení hybridizační směsi bylo zachováno až na to, že v tomto případě byla sonda tvořena z telomerického templátu. Další změnou bylo přidání kroku amplifikující signál, a to mezi inkubaci se streptavidinem konjugovaným s Cy3 a jeho promytím a nanášením DAPI v DABCO.

Amplifikace signálu se skládala z těchto kroků: nanesení 50 µl antistreptavidinu v WBB (2 µl antistreptavidinu na 50 µl WBB), zakrytí krycím sklem a inkubace při 37 °C po dobu 30 minut, poté třikrát 5 minutové promytí s mícháním v roztoku WBB v 45 °C, následně bylo naneseo 100 µl streptavidinu konjugovaného s Cy3 v WBB (0,1 µl streptavidinu s Cy3 (9 ng/ml) na 100 µl WBB), překrytí krycím sklem a 30 minutová inkubace v 37 °C. Posledním krokem bylo třikrát 5 minutové promytí preparátů v roztoku WBB s mícháním v 45 °C.

Po promytí bylo stejně jako u nepřímé FISH bez amplifikace signálu naneseo na preparáty DAPI (0,5 µg/ml) v DABCO, preparáty byly překryty krycím sklem a jejich okraje zalakovány lakem na nehty. Preparáty byly skladovány v neprůhledné krabici v 4 °C a pozorovány pod mikroskopem.

3.6 Prohlížení preparátů

Dokončené preparáty byly prohlíženy pod světelným a fluorescenčním mikroskopem (Carl Zeiss Jena, Německo). Pro zobrazení fluorescenčního signálu z hybridizovaných sond byly použity tři barevné filtry, pro každý použitý fluorochrom a DAPI jiný. Kamerou Olympus CCD XM10 s programem cellSens 1.9 (Olympus, Německo) byly zachyceny černobílé snímky, které byly pseudoobarveny a upraveny v programu Adobe Photoshop CS6 verze 13.0.

3.7 Průtoková cytometrie

Pro zjišťování velikosti genomu byla použita metoda průtokové cytometrie. S obsluhou cytometru a vyhodnocením výsledků mi poskytl pomoc Mgr. Petr Kouřec, Ph.D. (Katedra botaniky, PřF JU), za což mu velmi děkuji. Druhy, u kterých byla měřená velikost genomu byly *O. cerasi*, *O. cruda*, *O. gothica*, *O. gracilis*, *O. incerta* a *P. i-cinctum*. Pro měření byli použiti zmrazení jedinci těchto druhů v larválním stádiu a bylo z nich použito mozkové ganglium. Jako vnitřní standard o známé velikosti genomu při měření byli použiti dospělci samců zavíječe moučného (*Ephestia kuehniella*), z kterých byla použita polovina hlavy pro každý měřený vzorek. Dále byl pro některé druhy (*O. gracilis*, *P. i-cinctum*) použit jiný standard kvůli překryvu vzorku s původním standardem, a to dospělí samci ruměnice pospolné (*Pyrrhocoris apterus*) z nichž byla použita mozková tkáň.

Ve fyziologickém roztoku bylo z měřeného jedince vypitváno mozkové ganglium, ke kterému byla přidána polovina hlavy standardu *E. kuehniella* či mozkové ganglium *P. apterus*. Tyto tkáně byly přeneseny na plastovou misku do kapky pufru složeného

z 0,1% Triton X-100, 0,1 M Tris-HCl pH 7,5 a 2 mM MgCl₂ (Buntrock et al., 2012). V kapce pufru byly tkáně nasekány pomocí ostré jednorázové žiletky. Následně bylo ke kapce přidáno 500 µl pufru a celý objem byl přes nylonový filtr přepipetován do čisté zkumavky. Do zkumavky bylo přidáno necelých 500 µl pufru, tak aby celkový objem tvořil 1000 µl a následně byl přidán propidium jodid ve finální koncentraci 50 µg/ml. Nachystané vzorky byly inkubovány 25-30 minut při pokojové teplotě a poté měřeny průtokovým cytometrem Partec CyFlow SL (Partec, Münster, Německo) se 100 mW 532 nm laserem a softwarem FlowJo™ v10.8 Software (BD Life Sciences). Odečtení výsledků z měření na cytometru bylo provedeno Petrem Kouteckým. Výsledky byly následně statisticky vyhodnoceny programem R (verze 4.2.3) v RStudio (verze 2023.03.0+386) (<https://www.rstudio.com>).

3.8 Fylogenetická analýza

3.8.1 Detekce přítomných lokusů pomocí PCR

Pro získání informací o vzájemné příbuznosti zkoumaných druhů byla použita fylogenetická analýza na vybraných genech pro dvě mitochondriální podjednotky cytochrom-C oxidázy (*mt:CoI*, *mt:CoII*) a genech pro ribozomální protein S5a (*RpS5a*), dále pro glycerinaldehyd 3 fosfát dehydrogenázu (*Gapdh1*) a malát dehydrogenázu (*Mdh1*). Tyto geny byly vybrány z množství dalších amplifikovaných genů (celkem 13) podle následujících kritérií. Nejdříve byly selektovány geny tvořící PCR produkt u všech druhů a následně z nich byly vybrány geny, které již byly pro fylogenetickou analýzu v čeledi Noctuidae použity, a to v práci Keegan & Wagner, 2022. Veškeré sekvence primerů byly převzaty z publikací (Wahlberg et al., 2016; Wahlberg & Wheat, 2008). Syntetizované primery jsem získala od kolegyně Anny Voleníkové, za což ji tímto děkuji. Pro sekvence použitých primerů pro amplifikaci vybraných genů viz **Tabulku II**. Sekvence testovaných primerů amplifikujících geny, které nebyly použity pro fylogenetickou analýzu se nachází v kapitole **8 Přílohy (Tabulka I)**.

Tabulka II: Přehled primerů použitých pro amplifikaci genů vybraných pro fylogenetickou analýzu.

Lokus	Sekvence primerů 5'-3' (Forward/Reverse)	Délka produktu (bp)	Původ primerů
<i>CoI</i>	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA	658	(Folmer et al., 1994)
<i>CoII</i>	CAA CAY TTA TTT TGA TTT TTT GG ATC CAT TAC ATA TAA TCT GCC ATA	829	(Simon et al., 1994)
<i>Gapdh</i>	AAR GCT GGR GCT GAA TAT GT GWT TGA ATG TAC TTG ATR AGR TC	691	(Wahlberg & Wheat, 2008)
<i>Mdh</i>	GAY ATN GCN CCN ATG ATG GGN GT AGN CCY TCN ACD ATY TTC CAY TT	407	(Wahlberg & Wheat, 2008)
<i>RpS5</i>	ATG GCN GAR GAR AAY TGG AAY GA CGG TTR GAY TTR GCA ACA CG	617	(Wahlberg & Wheat, 2008)

Pro každý pár primerů byla testována samičí DNA (izolovaná pomocí CTAB, viz 3.3) od druhů *O. cerasi*, *O. cruda*, *O. gothica*, *O. gracilis*, *O. incerta* a *P. i-cinctum*. Pro každý pár primeru byla rovněž zahrnuta negativní kontrola, která neobsahovala žádnou DNA. Celkem tedy bylo namixováno 91 reakcí, včetně kontrol. Koncentrace komponent v reakční směsi a následné cyklování vycházelo z publikace Wahlberg & Wheat, 2008. PCR směs o objemu 20 µl obsahovala 0,5 µM obou primerů, 0,2 mM každého z nukleotidů (TaKaRa), 1,5 mM MgCl₂, 1x Ex Taq pufr (TaKaRa), 2 U Ex Taq polymerázy (TaKaRa) a cca 50 ng samičí gDNA. Cyklování reakcí proběhlo následovně: počáteční denaturace po dobu 7 minut na 95 °C, poté 40 cyklů denaturace po dobu 30 sekund na 94 °C, 30 sekund nasedání primerů na 55 °C, 2 minuty elongace na 72 °C a následná finální elongace po dobu 10 minut na 72 °C. Přítomnost produktů byla ověřena elektroforeticky na 1% agarózovém gelu.

Následně byly vybrány ty úseky, které se naamplifikovaly u všech zkoumaných druhů a z těch bylo vybráno pět, které byly enzymaticky přečištěny pomocí ExoSAP-IT (Applied Biosystems) a poslány na sekvenaci do firmy SeqMe. Úseky byly sekvenovány s forward i reverse primery. Vybrány byly úseky *CoI*, *CoII*, *Gapdh*, *Mdh* a *RpS5*, a to z důvodu, že již byly pro fylogenetickou analýzu v čeledi Noctuidae použity (Keegan & Wagner, 2022).

3.8.2 Zpracování sekvencí a sestavení kladogramu

Výsledné sekvence byly zpracovány v programu Geneious Prime (verze 2023.0.1). Sekvence byly manuálně očištěny, z reverzních sekvencí byl proveden reverzní komplement a společně s forward sekvencemi byly vytvořené konsenzus sekvence. Pro každý gen byly konsenzus sekvence zarovnány do "multiple sequence alignment" pomocí algoritmu MAFFT s výchozími parametry. Alignment byl poté manuálně oříznut tak, aby jednotlivé sekvence byly stejně dlouhé. Tyto alignmenty byly následně konkatenovány a výsledný konkatenát sloužil jako vstup při tvorbě kladogramu. Takto kombinovaný dataset obsahoval 3025 bp.

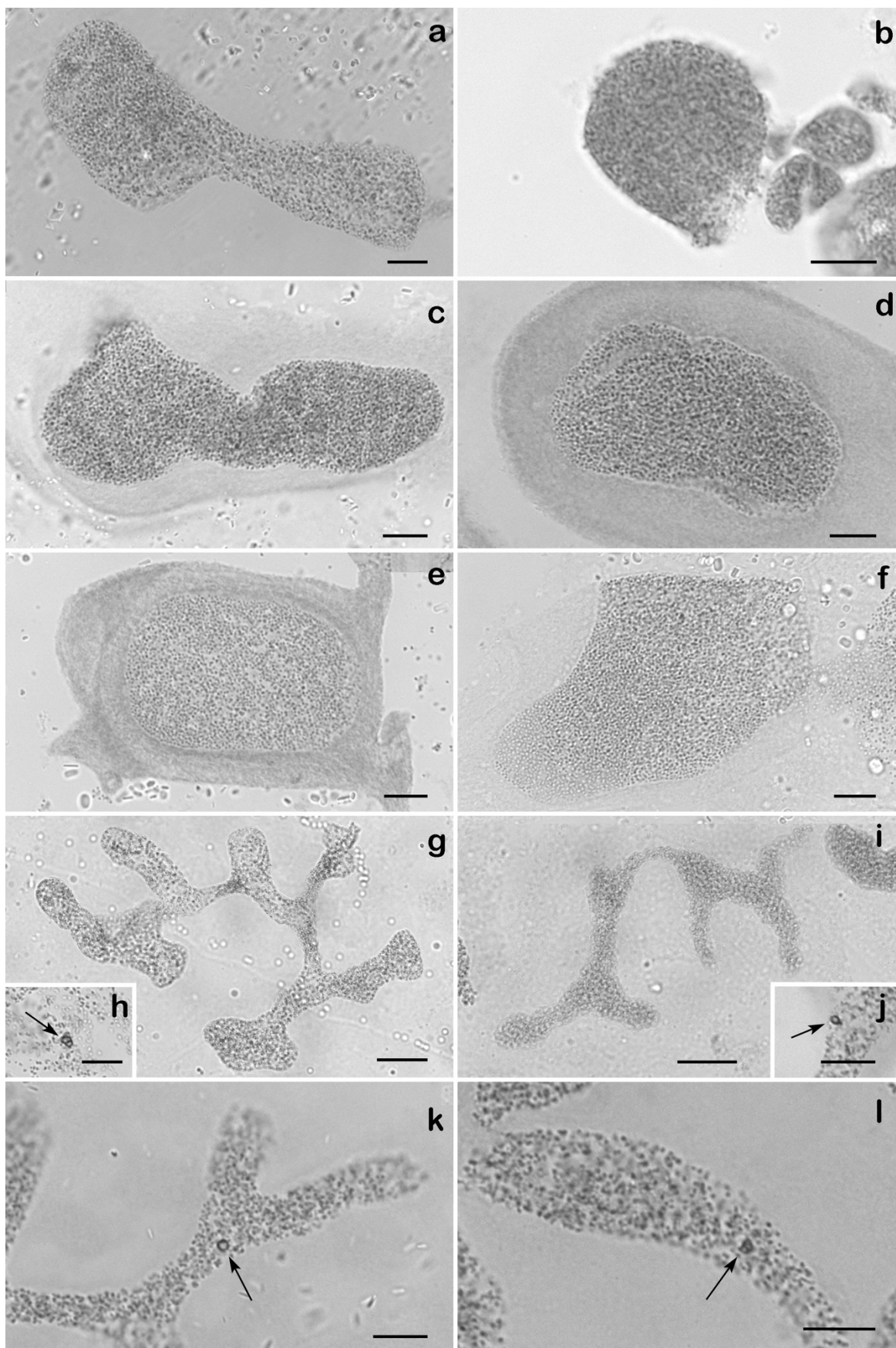
Postup sestavení fylogenetického stromu byl konzultován s prof. RNDr. Václavem Hypšou, CSc. (PřF JU), za což mu tímto děkuji. Fylogenetický strom na základě nukleotidových sekvencí pěti genů dohromady byl vytvořen v programu Geneious Prime podle Bayesovy analýzy. Pomocí algoritmu MrBayes byly vypočteny posteriorní pravděpodobnosti při 1000000 generací. Jako outgroup pro zakořenění stromu byl použit příbuzný druh *Perigrapha i-cinctum*.

4 VÝSLEDKY

4.1 Přítomnost sex chromatinu

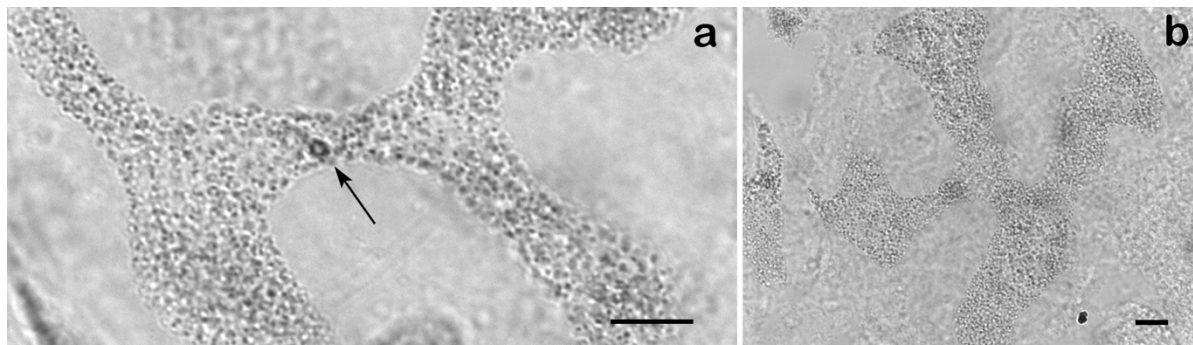
Pro přítomnost či absenci sex chromatinu bylo z různých rodin vyšetřeno pět samic a dva samci druhu *O. cerasi*, osm samic a dva samci druhu *O. cruda*, čtyři samice a tři samci druhu *O. gothica*, sedm samic a čtyři samci druhu *O. gracilis*, pět samic a jeden samec druhu *O. incerta* a dvě samice a dva samci od *P. i-cinctum*.

Přítomnost pohlavně specifického sex chromatinu byla pozorována pouze u samic druhu *P. i-cinctum* (**Obrázek 3a**). Dále byl pozorován sex chromatin rovněž u samic *O. incerta* (**Obrázek 2k**) a v některých polyploidních jádrech u samic *O. gracilis* (**Obrázek 2h**). Ovšem u těchto dvou druhů byl pozorován útvar podobný sex chromatinu rovněž v některých polyploidních jádrech u samců (**Obrázek 2j, 2l**). Snímky ze světelného mikroskopu s polyploidními jádry samic a samců jsou poskládané do **Obrázku 2** a **Obrázku 3**.



Obrázek 2: Samičí (a, c, e, g, h, k) a samčí (b, d, f, i, j, l) polyploidní jádra z malpighických trubic. Absence sex chromatinu u *O. cerasi* (a, b), *O. cruda* (c, d), *O. gothica* (e, f), *O. gracilis*

(g, i). Přítomnost útvaru podobného sex chromatinu v některých jádrech *O. gracilis* u samic (h) i samců (j). Přítomnost sex chromatinu u samic *O. incerta* (k) a útvaru podobnému sex chromatinu u samců (l). Měřítko = 10 μm (a, b, c, d, e, f, h, j, k, l). Měřítko = 20 μm (g, i).



Obrázek 3: Polyploidní jádra z malpighických trubic *P. i-cinctum*. Přítomnost sex chromatinu u samic (a) a jeho absence u samců (b). Měřítko = 10 μm .

4.2 Počet chromozomů

Počty chromozomů byly určovány z jednotlivých jader u samic i samců všech zkoumaných druhů. V některých případech byla provedena na mitotických preparátech telomerická nepřímá FISH, která značí konce chromozomů a usnadňuje tak odlišení jednotlivých chromozomů a jejich počítání. Zjištěné počty chromozomů jsou zanesené v **Tabulce III**. Snímky s diploidními jádry se nachází v kapitole **8 Přílohy (Obrázek 1)**.

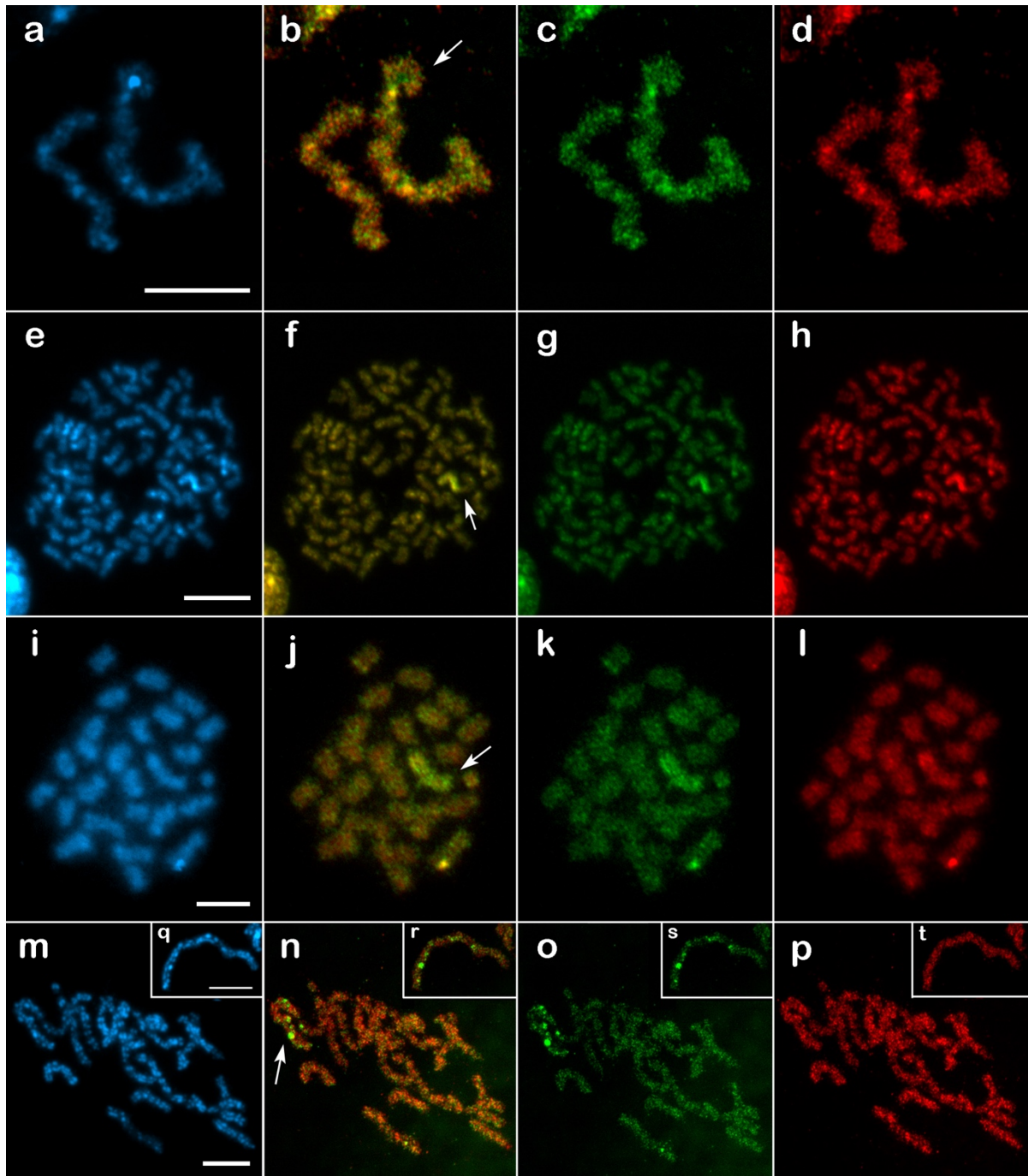
Tabulka III: Diploidní počty chromozomů ($2n$) u samic (♀) a samců (♂) jednotlivých druhů. $1n^*$ = haploidní počty chromozomů z publikace Werner, 1975.

Druh	$2n$ ♀	$2n$ ♂	$1n^*$
<i>Orthosia cerasi</i>	56	56	-
<i>Orthosia cruda</i>	63	64	32
<i>Orthosia gothica</i>	71	72	36
<i>Orthosia gracilis</i>	27	28	14
<i>Othosia incerta</i>	58	58	30
<i>Perigrapha i-cinctum</i>	62	62	-

4.3 CGH

Pomocí metody CGH bylo možné detekovat přítomnost či absenci chromozomu W. Pro CGH byly použity mitotické i meiotické preparáty. Úspěšná hybridizace sond a detekce chromozomu W proběhla u samic *O. cruda*, *O. gothica*, *O. gracilis* a *O. incerta*. U druhů *O. cerasi* a *P. i-cinctum* nebyla CGH úspěšně provedena z důvodu nedostatku materiálu a nefunkční hybridizace sond.

U *O. cruda* byl detekován chromozom W se silně heterochromatinizovaným kulovitým útvarem v terminální části a proběhla u něj silná hybridizace samičí sondy (**Obrázek 4c**). U *O. gothica* byl nalezen chromozom W, který měl silnou heterochromatinizaci na přibližně polovině své délky (**Obrázek 4e**) a rovněž na tuto heterochromatinizovanou část silně hybridizovala samičí sonda (**Obrázek 4g**). U *O. gracilis* proběhla silná hybridizace samičí sondy na celý jeden chromozom u samic (**Obrázek 4k**), u samců žádný z chromozomů takto silně označen samičí sondou nebyl (viz kapitolu 8 Přílohy, **Obrázek 2**). U samic se tedy jedná s vysokou pravděpodobností o chromozom W. Tudíž bylo vyvráceno, že by byl pohlavní chromozom W u samic *O. gracilis* druhotně ztracen. Přítomnost chromozomu W byla rovněž potvrzena u samic *O. incerta*, jelikož v jejich jádrech byl pozorován chromozom, po jehož celé délce silně hybridizovala samičí sonda (**Obrázek 4o, 4s**). Snímky ze CGH se nachází na **Obrázku 4**.

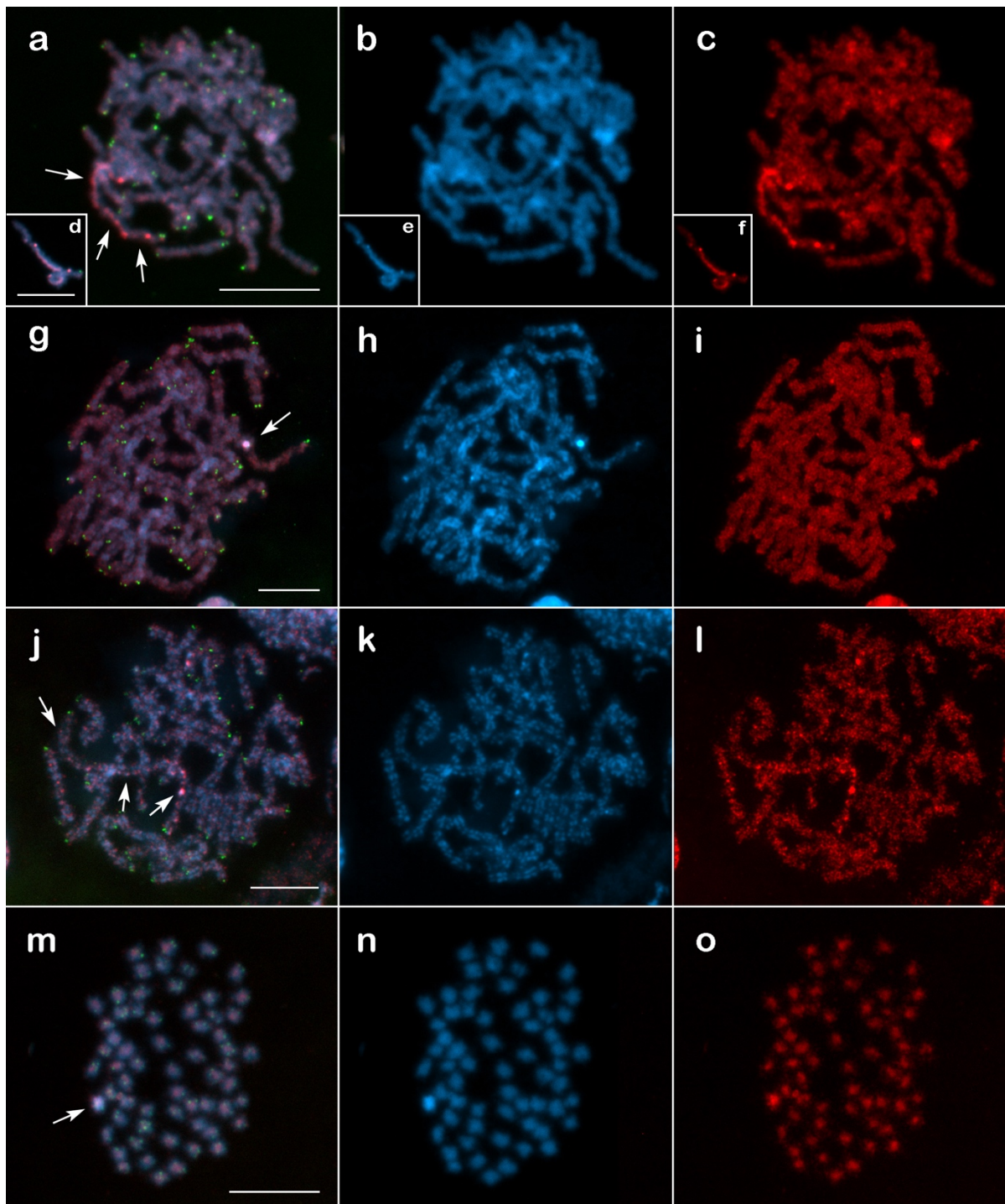


Obrázek 4: Obarvené snímky ze CGH. Podbarvení DAPI (**a, e, i, m, q**), překryv samičí a samčí sondy (**b, f, j, n, r**), samičí zelená sonda (**c, g, k, o, s**), samčí červená sonda (**d, h, l, p, t**). Samičí pachytenní chromozomy *O. cruda* (**a-d**). Samičí mitotické jádro *O. gothica* (**e-h**). Samičí mitotické jádro *O. gracilis* (**i-l**). Samičí pachytenní jádro *O. incerta* (**m-p**) a detail bivalentu WZ (**q-t**). Šipky označují chromozom W. Měřítko = 10 μm .

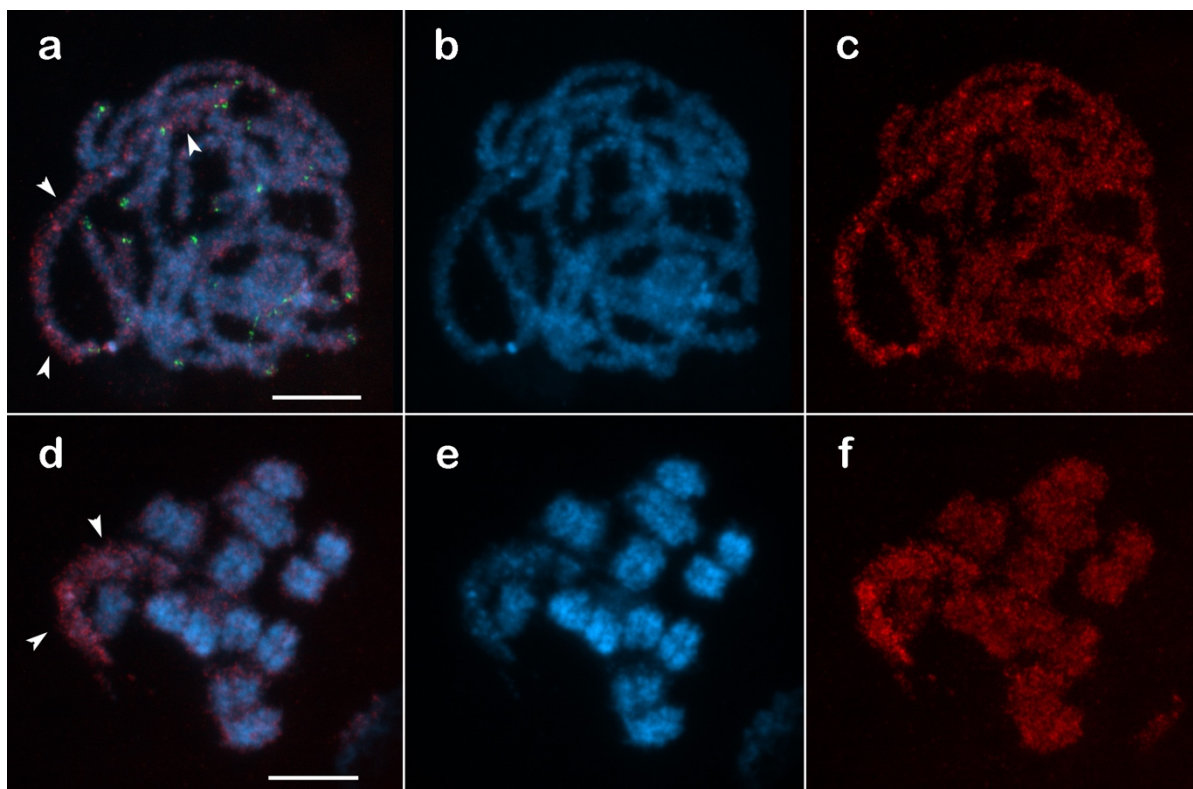
4.4 GISH

Pro další důkaz přítomnosti chromozomu W u samic zkoumaných druhů byla použita metoda GISH, která rovněž umožňuje detekci chromozomu W díky samičí značené sondě a samčímu neznačenému kompetitorovi. GISH byla provedena převážně na samičích meiotických preparátech. Díky kombinaci GISH s telomerickou sondou bylo možné zároveň vizualizovat jednotlivé konce chromozomů.

Pomocí této metody GISH byl detekován pohlavní chromozom W na meiotických preparátech u samic *O. cerasi* (**Obrázek 5a, 5d**), *O. cruda* (**Obrázek 5g**), *O. incerta* (**Obrázek 5j**) a mitotickém preparátu samice *P. i-cinctum* (**Obrázek 5m**), kde byl chromozom W rovněž silně heteterochromatinizován (**Obrázek 5n**). Díky této metodě se podařilo rovněž identifikovat pohlavní chromozom W na meiotických preparátech samice *O. gracilis* (**Obrázek 6**).



Obrázek 5: GISH s telomerickou sondou na samičích jádrech. Překryv samičí sondy (červená), telomerické sondy (zelená) a podbarvení DAPI (modrá) (**a, d, g, j, m**). Podbarvení DAPI (**b, e, h, k, n**). Samičí sonda (**c, f, i, l, o**). Samičí pachytenní chromozomy *O. cerasi* (**a-c**) s detailem bivalentu WZ (**d-f**), *O. cruda* (**g-i**), *O. incerta* (**j-l**) a samičí mitotické chromozomy *P. i-cinctum* (**m-o**). Šipky označují chromozom W. Měřítko = 10 μ m.



Obrázek 6: Výsledky GISH na pachytenních jádrech u samice *O. gracilis*. Překryv samičí sondy (červená), telomerické sondy (zelená) a podbarvení DAPI (modrá) na pachytenních chromozomech (a). Překryv samičí sondy (červená) a podbarvení DAPI (modrá) na kondenzovaných pachytenních chromozomech nutritivního jádra (d). Podbarvení DAPI (b, e), samičí červená sonda (c, f). Šipky označují chromozom W. Měřítko = 10 μ m.

4.5 FISH

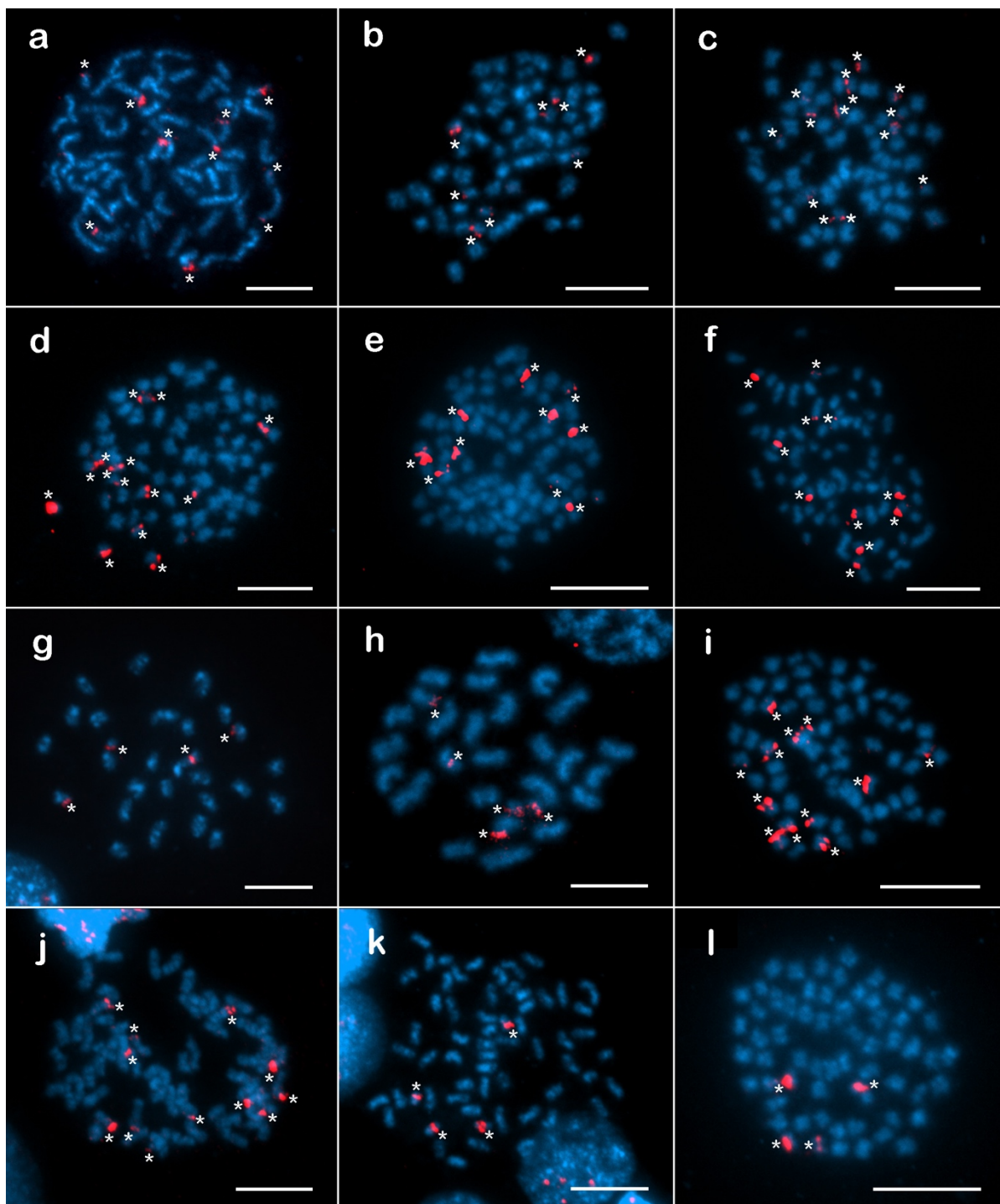
4.5.1 Nepřímá FISH s rDNA sondou

Jelikož z hybridizací na pachytenních chromozomech bylo podbarvením DAPI možno pozorovat jadérka (NOR) a bylo jasné vidět, že se jednotlivé druhy mezi sebou počtem jadérek liší, byla provedena i hybridizace odhalující počet klastrů 18S rDNA. Pro zjištění počtu těchto klastrů 18S rDNA byla použita metoda nepřímé FISH se sondou připravenou z obaleče jablečného (*C. pomonella*) značenou biotinem. Tato metoda byla provedena na mitotických preparátech všech v této práci studovaných druhů u samic i samců. Značená sonda úspěšně hybridizovala u všech druhů, ovšem ne u všech druhů bylo možné s jistotou určit přesný počet klastrů 18S, jelikož sonda tvořila rovněž slabé nespecifické signály. Přesně určit počet klastrů se podařilo u druhů *O. gracilis*, *P. i-cinctum*. U samice *O. gracilis* byl určen počet

na mitotických chromozomech na čtyři klastry 18S, zatímco u samce to byl lichý počet, a to pět klastrů. U druhu *P. i-cinctum* byly jak u samice, tak u samce objeveny čtyři klastry. Snímky mitotických preparátů s FISH hybridizací 18S sondy vyfocené pod fluorescenčním mikroskopem jsou složeny do **Obrázku 7**. Přibližné počty klastrů podjednotky 18S rDNA u jednotlivých druhů jsou zapsány do **Tabulky IV**.

Tabulka IV: Určený počet klastrů podjednotky 18S rDNA na dvou homologních párech mitotických chromozomů.

Druh	Počet klastrů u samic	Počet klastrů u samců
<i>Orthosia cerasi</i>	8-10	8?
<i>Orthosia cruda</i>	14	12-14
<i>Orthosia gothica</i>	11?	10-14
<i>Orthosia gracilis</i>	4	5
<i>Orthosia incerta</i>	10-14	10-12
<i>Perigrapha i-cinctum</i>	4	4



Obrázek 7: Hybridizace 18S sondy (červená) a DAPI podbarvení (modrá) na mitotických jádrech u samic (**a, c, e, g, i, k**) a samců (**b, d, f, h, j, l**). Hybridizace u *O. cerasi* (**a, b**), *O. cruda* (**c, d**), *O. gothica* (**e, f**), *O. gracilis* (**g, h**), *O. incerta* (**i, j**) a *P. i-cinctum* (**k, l**). * = signál sondy. Měřítko = 10 μm .

4.5.2 Nepřímá FISH s amplifikací s telomerickou sondou

Tato metoda umožnila získat informace o poloze telomerických sekvencí jednotlivých chromozomů. Díky tomu je možné odhalit případné chromozomální fúze, které měly zachovanou telomerickou sekvenci v místě fúze a rovněž případné multivalenty pohlavních chromozomů. Zároveň označení konců chromozomů napomohlo k určení správného počtu chromozomů v diploidních jádrech.

Telomerická sonda úspěšně hybridizovala na všech preparátech, tedy u samic i samců všech šesti studovaných druhů. Výsledky z telomerické FISH ovšem neodhalily přítomnost multivalentu pohlavních chromozomů u žádného z druhů.

4.6 Velikost genomů

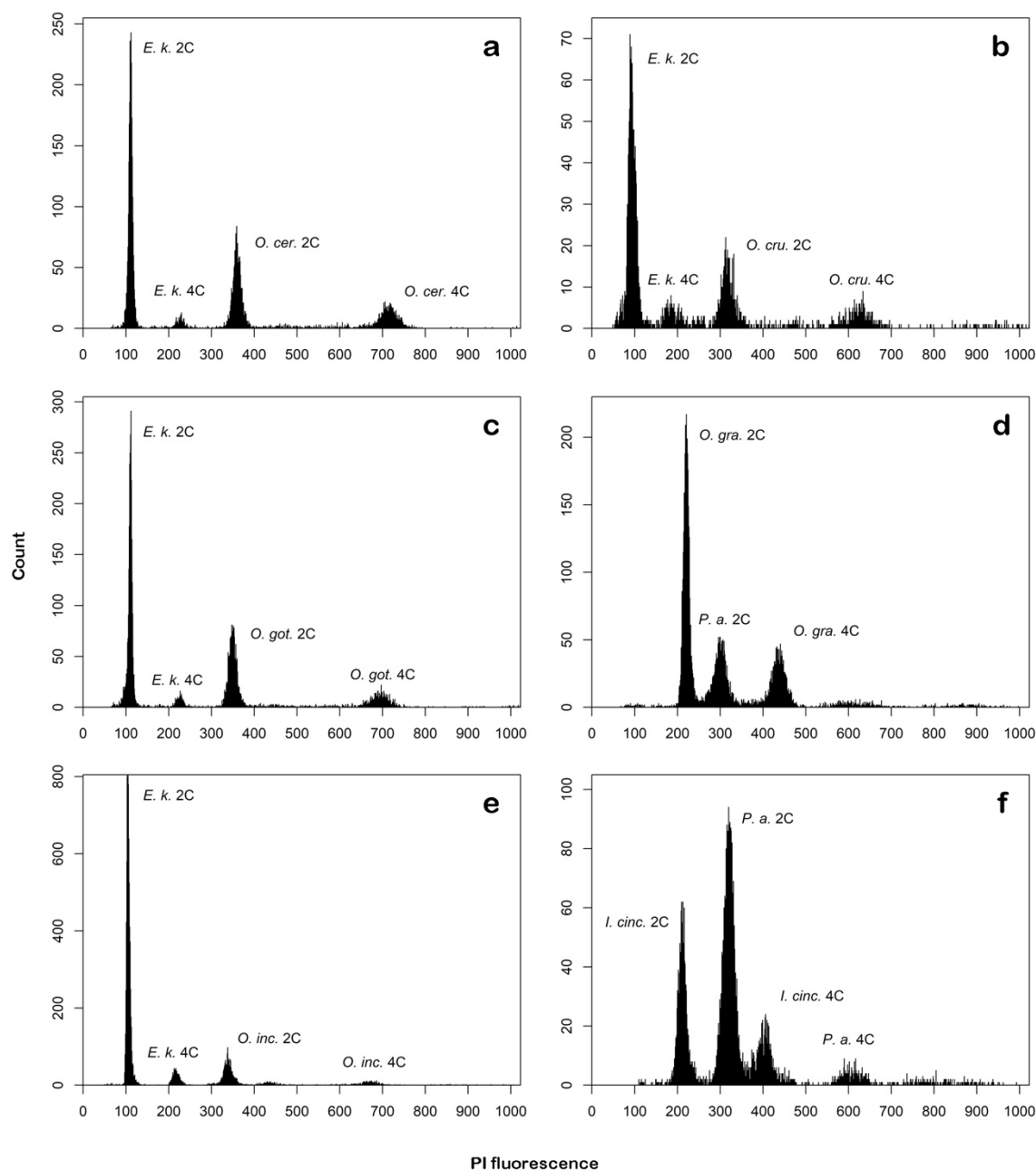
Díky změření velikosti genomů na průtokovém cytometru je možné porovnat naměřené hodnoty mezi samicemi a samci a odhalit tak případné rozdíly v genomu. Rovněž lze odhalit variabilitu mezi jednotlivými druhy a populacemi. V případě, že by u samice chyběl chromozom W a měla by tedy konstituci pohlavních chromozomů Z0, měl by mít samec větší genom, jelikož by měl o jeden chromozom Z více. Byla tedy stanovena nulová hypotéza H_0 : samec nemá větší genom než samice.

Z odečtených výsledků velikostí haploidních genomů z cytometru byl proveden dvouvýběrový t-test v programu R v RStudio pro test dané hypotézy. Statistické zhodnocení bylo provedeno u druhů *O. cerasi*, *O. gothica* a *O. incerta*. U druhů, u kterých nebylo dosaženo minimálně tří měření jak od samice, tak samce, byl vypočten pouze průměr hodnot se směrodatnou odchylkou. Výsledky shrnuté v **Tabulce V**.

Tabulka V: Shrnuté výsledky měření velikosti genomů. ♀ = počet úspěšně změřených samic. ♂ = počet úspěšně změřených samců. 1C = průměrná velikost haploidního genomu [pg]. sd = směrodatná odchylka. NA = nelze vypočítat.

Druh	♀	♂	1C ♀ [pg]	1C ♂ [pg]	Dvouvýběrový t-test
<i>Orthosia cerasi</i>	3	3	1,455 (sd = 0,017)	1,453 (sd = 0,010)	t = 0,2325, df = 4, p-value = 0,5862
<i>Orthosia cruda</i>	2	1	1,618 (sd = 0,107)	1,519 (sd = NA)	NA
<i>Orthosia gothica</i>	6	5	1,422 (sd = 0,022)	1,454 (sd = 0,070)	t = -1,0518, df = 9, p-value = 0,1602
<i>Orthosia gracilis</i>	3	2	0,934 (sd = 0,035)	0,918 (sd = 0,031)	NA
<i>Orthosia incerta</i>	3	3	1,260 (sd = 0,152)	1,429 (sd = 0,021)	t = -1,9134, df = 4, p-value = 0,06412
<i>Perigrapha i-cinctum</i>	2	3	0,887 (sd = 0,006)	0,897 (sd = 0,053)	NA

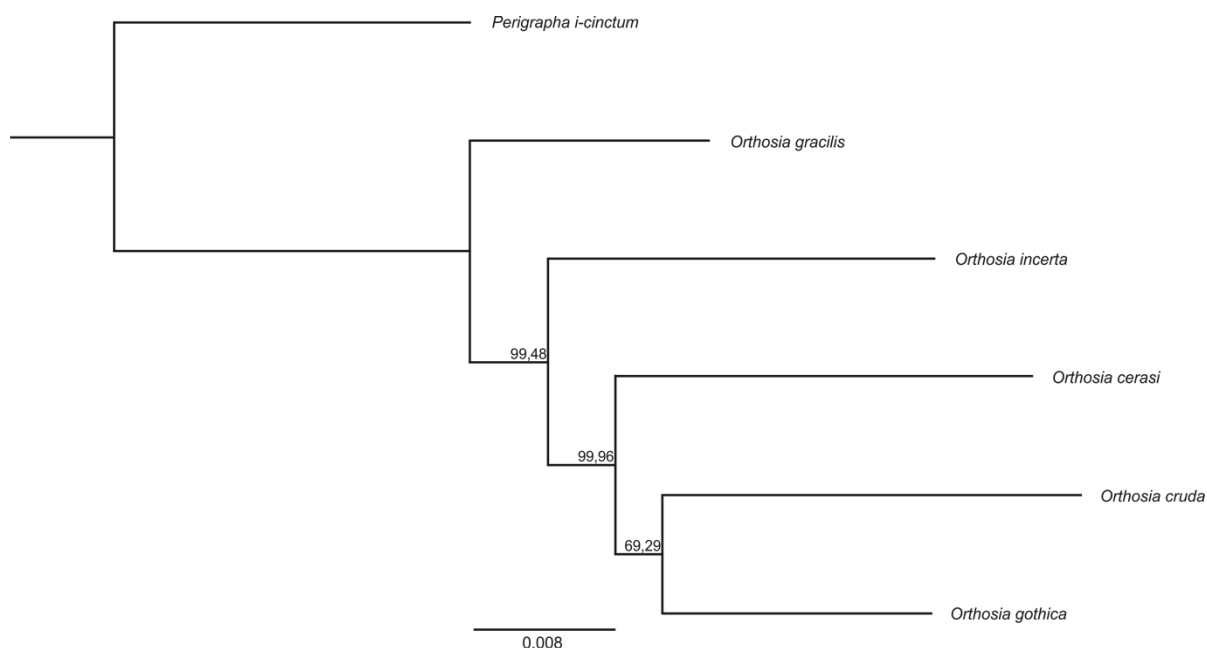
Na **Obrázku 8** jsou ukázány reprezentativní histogramy získané z průtokového cytometru pro každý druh, které ukazují závislost relativního množství fluorescence (PI fluorescence) na množství analyzovaných jader (Count). Jednotlivé píky představují počet měřených jader a k nim přiřazené množství fluorescence. Píky 2C znamenají diploidní jádra, jejich dvojnásobek 4C jsou pak tetraploidní jádra. Obrázky **8a-f** byly vytvořeny Petrem Kouteckým. Do jednotného obrázku byly jednotlivé histogramy seskládány v programu Adobe Photoshop CS6 verze 13.0.



Obrázek 8: Reprezentativní histogram z měření na průtokovém cytometru pro (a) samce *Orthosia cerasi* (*O. cer.*), (b) samce *Orthosia cruda* (*O. cru.*), (c) samce *Orthosia gothica* (*O. got.*), (d) samice *Orthosia gracilis* (*O. gra.*), (e) samce *Orthosia incerta*. (*O. inc.*), (f) samce *Perigrapha i-cinctum*. (*I. cinc.*). Standardem pro měření byli zavíječ moučný *Ephestia kuehniella* (*E. k.*), histogramy **a**, **b**, **c**, **e**, a ruměnice pospolná *Pyrrhocoris apterus* (*P. a.*), histogramy **d**, **f**. Osa X (PI fluorescence) = relativní množství fluorescence. Osa Y (Count) = počet měřených jader.

4.7 Fylogenetická analýza

Bayesova analýza s milionem iterací vygenerovala fylogenetický strom, který byl zakořeněn druhem *P. i-cinctum*. Bylo ukázáno, že nejodvozenějším druhem rodu *Orthosia* je *O. gracilis* pro niž jsou sesterskou skupinou ostatní zkoumané druhy. Dvojice *O. cruda* a *O. gothica* představuje monofyletickou skupinu s nejmladším větvením. Pro toto větvení byla ovšem vypočítána nejnížší pravděpodobnost, a to 69,29. Sesterským taxonem k této dvojici je pak *O. cerasi*. Toto větvení je podpořeno pravděpodobností 99,96. Pro skupinu tvořenou druhy *O. cerasi*, *O. cruda* a *O. gothica* je sesterským taxonem *O. incerta*. Pravděpodobnostní podpora tohoto větvení byla spočtena na 99,48. Výsledný fylogenetický strom je na **Obrázku 9**.



Obrázek 9: Výsledný fylogenetický strom zkoumaných druhů. Bayesiánské posteriorní pravděpodobnosti pro jednotlivé nody zobrazeny v obrázku u jednotlivých větvení. Délka větví reprezentuje evoluční změnu v čase. Měřítko reprezentuje průměrný počet nukleotidových substitucí na pozici.

5 DISKUZE

O chromozomálních konstitucích druhů rodu *Orthosia* z čeledi Noctuidae je dosud velmi málo informací. Jediné cytogenetické studie provedené na družích rodu *Orthosia* pochází z roku 1968 a 1975. V první zmíněné práci byl zjištěn počet chromozomů u samic a samců u *Orthosia gracilis*. Autoři práce se rovněž zaměřili na pozorování sex chromatinu a zjistili, že se u *O. gracilis* takový chromatin nenachází. Z těchto poznatků byla u tohoto druhu vyvozena chromozomální konstituce Z0/ZZ. Rovněž byly v této práci podrobeny studiu druhy *O. gothica* a *O. stabilis*, u kterých byla zjištěna přítomnost pohlavně specifického sex chromatinu (Traut & Mosbacher, 1968). V druhé zmíněné práci byly spočítány počty chromozomů v haploidních jádrech u druhů *O. cruda*, *O. gothica*, *O. gracilis*, *O. incerta*, *O. miniosa*, *O. munda*, *O. stabilis* a *O. rorida* (Werner, 1975).

Tato diplomová práce se zaměřila na cytogenetický výzkum u vybraných druhů rodu *Orthosia* a ověření případné ztráty chromozomu W u samic *O. gracilis*.

5.1 Absence sex chromatinu

Přítomnost sex chromatinu v interfázních polyploidních jádrech samic byla donedávna považována za důkaz přítomnosti chromozomu W. Jak ale dokazují recentní výzkumy, přítomnost či absence sex chromatinu mnohdy nemusí o stavu chromozomu W příliš vypovídat (Hejníčková et al., 2021; Vlašánek et al., 2017).

V této práci byl pohlavně specifický sex chromatin nalezen pouze v polyploidních jádrech samic *P. i-cinctum*. Přítomnost kondenzovaného sex chromatinu u samic naznačuje, že se u toho druhu chromozom W nachází. Dále byl sex chromatin nalezen v některých jádrech u samic *O. gracilis* a *O. incerta*. Jelikož byl ale podobný útvar nalezen i v některých jádrech samců, je možné, že se jedná o heterochromatinizovaný chromozom B. Přítomnost chromozomu B by vysvětloval rovněž i fakt, že útvar podobný sex chromatinu byl nalezen pouze v některých jádrech.

U ostatních druhů, tedy u *O. cerasi*, *O. cruda* a *O. gothica* přítomnost sex chromatinu detekována nebyla. Jak navrhuje Hejníčková et al., 2021, která prověřovala důvěryhodnost sex chromatinu jako markeru přítomnosti chromozomu W, lze nepřítomnost sex chromatinu vysvětlit několika způsoby. Prvním z nich je absence chromozomu W u samic. V této práci ovšem bylo objeveno, že všechny zkoumané druhy chromozom W mají a jeho ztráta tedy byla vyvrácena. Dalšími navrhovanými způsoby jsou přítomnost částečně transkripčně aktivního

chromozomu neo-W, nízká diferenciace chromozomu W od ostatních částí genomu nebo asociace chromozomu W s transkripčně vysoce aktivním jadérkem.

Je zajímavé, že u samic *O. gothica* byl v práci Werner (1975) sex chromatin pozorován, zatímco v této práci sex chromatin u tohoto druhu pozorován nebyl. Příčinou těchto rozporuplných výsledků může být existence různých chromozomálních ras či odlišné složení chromozomu W (Hejníčková et al., 2021). Další možností je, že se u analyzované samice *O. gothica* v práci Werner z roku 1975 nacházel B chromozom, který rovněž může způsobovat tvorbu heterochromatinového tělíska (Voleníková, 2012).

Tato práce tedy potvrzuje, že použití sex chromatinu jako jediného markeru pro určení přítomnosti či absenci chromozomu W je nevhodné.

5.2 Počty chromozomů

Za konzervovaný počet chromozomů u motýlů (Lepidoptera) v haploidním stavu se považuje $n = 31$ (Robinson, 1971). Chromozomy motýlů ovšem mohou díky nelokalizované centromere snadno podléhat stabilním přestavbám, a tak lze nalézt druhy, které se mezi sebou počtem chromozomů liší i přes vzájemnou blízkou příbuznost. Tak tomu bylo nalezeno například u modrásků, kde se počty chromozomů pohybují od $n = 10$ až po $n = 226$. Navíc u modráska *Lysandra coridon* byla objevena dokonce i vnitrodruhová variabilita v počtech chromozomů mezi různými populacemi (Coutsis et al., 2001). Podobná vnitrodruhová variabilita byla rovněž nalezena u bělásků rodu *Leptidea*, kde se haploidní počet chromozomů mezi populacemi lišil od $n = 28$ do $n = 53$ (Lukhtanov et al., 2011).

Podobná variabilita v rámci blízké příbuzných druhů byla objevena i v této práci. Určení počtu chromozomů v jádře bylo komplikováno způsobem přípravy preparátů, kdy se pro rozprostření macerované tkáně po podložním sklíčku používá tzv. spreading metoda. Touto přípravou se sice zajistí rovnoměrné nanesení macerované tkáně na preparát, ale často nemusí být jádra na preparátech kompletní či může více jader splývat do jednoho. I přesto se podařilo určit počet chromozomů u všech zkoumaných druhů. Pouze u druhu *P. i-cinctum* byl objeven konzervovaný počet chromozomů, tedy $2n = 62$, a to jak u samic, tak u samců. U zbylých zkoumaných druhů byl počet chromozomů odlišný od ancestrálního, s tím že nejmenší počet byl objeven u *O. gracilis* (samice $2n = 27$, samci $2n = 28$) a nejvyšší u *O. gothica* (samice $2n = 71$, samci $2n = 72$). U *O. gracilis* tak byly potvrzené počty z publikace Traut a Mosbacher, 1968.

Zjištěné počty chromozomů a jejich vysokou variabilitu napříč druhy potvrzuje i práce z roku 1975 (Werner, 1975), ve které byly spočítány počty chromozomů u osmi zástupců rodu *Orthosia*, a to u *O. cruda*, *O. miniosa*, *O. gracilis*, *O. stabilis*, *O. incerta*, *O. gothica* a *O. rorida*. Zjištěné počty chromozomů v této práci byly shodné s počty chromozomů zjištěnými v této diplomové práci u druhů *O. cruda*, *O. gothica*, *O. gracilis*. Oproti tomu, u druhu *O. incerta* byl v této diplomové práci zjištěný nižší počet chromozomů v diploidním jádře, a to o dva. Je tedy možné, že u druhu *O. incerta* existuje rovněž vnitrodruhová variabilita s existencí několika chromozomálních ras.

Výše zmíněná práce z roku 1975 ukazuje neobyčejně velkou proměnlivost v počtu chromozomů mezi jednotlivými druhy. Ani u jednoho z druhů nebyl nalezen konzervovaný počet chromozomů, tedy $n = 31$. Nejnížší počet haploidních chromozomů byl nalezen u *O. gracilis* ($n = 14$) a naopak nejvyšší počet byl nalezen u *O. rorida* ($n = 120$). Je tedy zřejmé, že tato skupina je cytogeneticky velice zajímavá díky své variabilitě napříč druhy. Zvláštností je, že u jiných skupin z čeledi Noctuidae se počty chromozomů příliš neměnily a často se rovnaly konzervovanému počtu $n = 31$. Rod *Orthosia* je tedy v této variabilitě mezi Noctuidae unikátní (Werner, 1975). Tyto odlišnosti v počtech chromozomů mohou být způsobeny genomovou nestabilitou, která se může projevovat prostřednictvím fúzí a rozpadů chromozomů. Takové chromozomální přestavby mohou hrát důležitou roli v evolučních procesech jako je speciace či adaptace a jsou usnadněny holocentrickou stavbou motýlích chromozomů (Cicconardi et al., 2021; de Vos et al., 2020).

Je zajímavé, že u tří ze zkoumaných druhů (*O. cruda*, *O. gothica*, *O. gracilis*) bylo v diploidních jádrech u samic nalezeno o jeden chromozom méně nežli u samců. To by mohlo naznačovat, že chromozom W u těchto druhů chybí. Metody CGH a GISH ovšem odhalily, že chromozom W přítomen je. Navíc u druhů *O. cruda* a *O. gothica* ukazuje chromozom W částečnou heterochromatinizaci, která by mohla být tvořena původním chromozomem W. Je tedy pravděpodobné, že u těchto druhů došlo k fúzi autozomu s původním chromozomem W a vznikl tak chromozom neo-W.

5.3 Přítomnost chromozomu W

Původně byla pro zjištění přítomnosti či absence chromozomu W používána metoda CGH, později se ale přestala dařit hybridizace na preparáty, a tak byla později provedena i metoda GISH. Bohužel, spousta cenného materiálu byla použita při nefunkčních hybridizacích, a tak ztracena.

Jedním z nejdůležitějších cílů této práce bylo ověření případné ztráty chromozomu W u *O. gracilis*. Ověřená nepřítomnost sex chromatinu ve většině polyploidních jader a jeden chybějící chromozom u samic skutečně naznačovalo, že je případná ztráta možná. Po provedení CGH na mitotických preparátech ale bylo zřejmé, že se chromozom W u samic nachází. Zeleně značená samičí sonda zřetelně hybridizovala po celé délce jednoho z chromozomů, a to pouze u samic. Je tedy pravděpodobné, že se jedná právě o chromozom W. Ověření přítomnosti chromozomu W u *O. gracilis* pak bylo rovněž provedeno pomocí metody GISH na pachytenních chromozomech. Vzhledem k tomu, že je u samic v diploidním jádře lichý počet chromozomů, je pravděpodobné, že došlo fúzí starého W s některým z autozomů k vytvoření chromozomu neo-W. Schéma tohoto procesu je na **Obrázku 10**.



Obrázek 10: Alternativní uspořádání pohlavních chromozomů vysvětlující absenci sex chromatinu a jednoho chromozomu v mitotických jádrech samic.

U druhu *O. cerasi* byl výskyt chromozomu W prokázán díky metodě GISH. Při této metodě na chromozom W výrazně nasedala samičí červená sonda. DAPI podbarvení ovšem na tomto chromozomu neodhalilo významnou abundanci heterochromatinu. Chromozom W u *O. cruda* naopak vykazuje silnou heterochromatinizaci ve své terminální části tvořené kulovitým útvarem. Tento kulovitý útvar byl rovněž silně naznačen samičí zelenou sondou v metodě CGH a samičí červenou sondou v metodě GISH. Vzhledem k tomu, že pouze část chromozomu je tvořena heterochromatinem a že u samice je v diploidním jádře o jeden chromozom méně nežli u samců, je pravděpodobné, že má tento druh chromozom neo-W. Podobná situace se nachází u druhu *O. gothica*. Tam byla přítomnost chromozomu W potvrzena pomocí metody CGH, kdy na zhruba polovinu chromozomu silně hybridizovala

samičí zelená sonda. Rovněž této částí chromozomu W odpovídala i silně heterochromatinová část. U tohoto druhu bylo rovněž zjištěno, že diploidní počet chromozomů u samic je o jeden méně nežli u samců. I v tomto případě jde tedy pravděpodobně o chromozom neo-W. U *O. incerta* byla přítomnost chromozomu W odhalena metodou GISH i CGH. V obou dvou případech nasedala samičí sonda po téměř celé délce chromozomu, a to především v jednotlivých malých blocích. Druh *P. i-cinctum*, který byl zvolen jako "outgroup" vykazuje heterochromatinizaci po celém chromozomu W a rovněž tak hybridizaci samičí sondy při metodě GISH.

5.4 FISH

Pomocí metody FISH byly lokalizované telomerické sekvence a klastry 18S rDNA. Podjednotka 18S rDNA je považována za klasický cytogenetický marker. Geny kódující tuto podjednotku se nachází v klastrech tvořených několika stovkami až tisíci kopii a dohromady s dalšími podjednotkami rDNA spolupracují na tvorbě jadérka (Nguyen et al., 2010; Prokopowich et al., 2003). V nedávno publikované práci zabývající se markerem 18S rDNA u motýlů (Lepidoptera) bylo odhaleno, že ancestrální stav u této skupiny je jeden terminální klastř 18S rDNA na pachytenních chromozomech (Provazníková et al., 2021). Pro čeleď Noctuidae byl ancestrální počet klastřů 18S rDNA určen rovněž na jeden klastř na pachytenních chromozomech (Nguyen et al., 2010). U rodu *Orthosia* studovaném v této diplomové práci byla ovšem nalezena vysoká různorodost v počtu těchto klastřů, a to od 4 až do 14 klastřů na mitotických chromozomech.

Zajímavým výsledkem z této práce je, že u druhu *O. gracilis* byly na mitotických chromozomech nalezeny rozdílné počty signálů ze sondy 18S mezi samicemi a samci. U samic byly nalezeny čtyři klastry, kdežto u samců jich bylo nalezeno pět. Možné vysvětlení je, že se u tohoto druhu nachází vnitrodruhový polymorfismus, kdy na jednom z homologů z páru autozomů se podjednotka 18S nachází, ale na homologním chromozomu tato podjednotka chybí. Dalším vysvětlením by mohl být nadbytečný chromozom B nesoucí klastř 18S, to by ale bylo v jádře o jeden chromozom více a takový úkaz pozorován nebyl.

Bohužel se v této práci nepodařilo u všech druhů jednoznačně určit počet klastřů 18S rDNA podjednotky. Pro přesnější určení počtu a rovněž i polohy klastřů by bylo zapotřebí hybridizace sondy na pachytenní chromozomy, které jsou delší a kolem aktivních klastřů rDNA mají patrná jadérka. To ovšem z důvodu nedostatku preparátů a času nebylo v této práci možné.

Telomerická FISH byla provedena především pro odhalení případných multivalentů pohlavních chromozomů. Žádný takový multivalent pomocí telomerické FISH odhalen nebyl což mohlo být zapříčiněno buď nepřítomností multivalentů či slabým rozlišením a slabé hybridizací při telomerické FISH.

5.5 Velikost genomů

Některé hodnoty velikostí genomů byly naměřené pouze orientačně, a to kvůli nedostatku materiálu na měření a tím pádem nemožnosti zajistit biologické triplicáty. I přesto lze z provedených měření usoudit, že se genomové velikosti samic a samců zkoumaných druhů statisticky významně neliší. Z výsledků dvouvýběrového t-testu je zřejmé, že ani v jednom případě nelze vyvrátit nulovou hypotézu. Statisticky je tedy velikost genomů mezi samicemi a samci u druhů *O. cerasi*, *O. gothica*, a *O. incerta* podobná. U ostatních druhů, u kterých kvůli nedostatku opakování nebylo možné výsledky zhodnotit statistickým testem, a byly tedy vypočteny pouze průměry, je možné se domnívat, že u nich pravděpodobně rozdíl ve velikosti genomu taktéž nebude. Z výsledků těchto měření tedy vyplývá, že by samice těchto druhů měly mít chromozom W. Tento výsledek byl potvrzen i metodami CGH a GISH jak bylo popsáno výše (viz kapitoly 4.3 a 4.4).

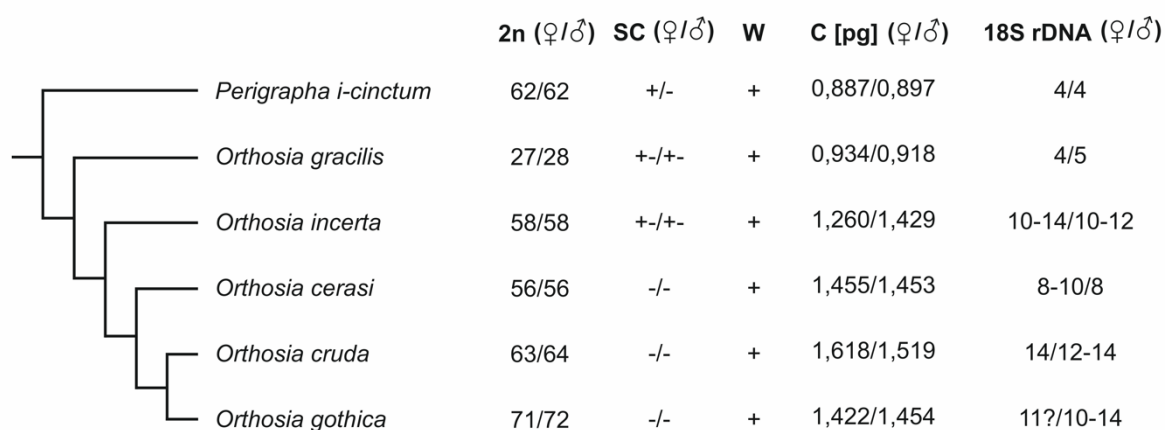
Hodnoty naměřených haploidních genomů jsou u druhů v této práci průměrně vyšší než hodnoty které byly u motýlů (Lepidoptera) naměřeny. Průměrná velikost haploidního genomu u motýlů je $0,66 \pm 0,04$ pg (Gregory & Hebert, 2003). Možným vysvětlením stavu nalezeného v této práci je přítomnost nějakého fenoménu, který zvětšuje genom a destabilizuje chromozomy. Takovým fenoménem by mohla být vysoká aktivita repetitivních sekvencí a jejich vysoká abundance (Klein & O'Neill, 2018). Tuto karyotypovou nestabilitu dokazuje nejen velikost genomu, ale také různé počty chromozomů od ancestrálního počtu u jednotlivých druhů skupiny a různorodý počet klastrů rDNA. Jak navrhuje Kreklová ve své bakalářské práci z roku 2017, pro karyotypovou nestabilitu je předcházející zvýšení velikosti genomu nezbytné.

Při studiu vzájemné závislosti velikostí genomu a počtu klastrů rDNA u eukaryot byla mezi těmito hodnotami objevena silná korelace (Prokopowich et al., 2003). Bylo ukázáno, že s navýšením počtu klastrů rDNA úzce souvisí genomové repete (Dalíková et al., 2022). Je známo, že repete rovněž souvisí s velikostí genomu tím způsobem, že čím více repetitivních sekvencí, tím větší genom (Elliott & Gregory, 2015). Vzhledem k tomu, že u druhů studovaných v této práci byl pozorován zvýšený počet rDNA klastrů oproti ancestrálnímu

stavu, je možné, že s tímto pozorováním souvisí rovněž vyšší naměřené hodnoty velikosti genomů a tím pádem zmnožení repetitivních sekvencí. Navíc nejnížší průměrná velikost genomů byla naměřena u druhů, u kterých byl zjištěn nejnížší počet rDNA klastrů (*O. gracilis* a *P. i-cinctum*). Pro testování, zda a jak spolu tyto hodnoty souvisí, by ovšem bylo nutné nejprve přesně určit počet rDNA klastrů na chromozomech a poté změřit velikost genomu pomocí průtokové cytometrie u většího vzorku jedinců. Následně by bylo zapotřebí osekvenování genomů a bioinformatických analýz k nalezení repetice napomáhajících šíření rDNA (Dalíková et al., 2022).

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo posouzení stavu pohlavních chromozomů u vybraných druhů rodu *Orthosia*. Nejprve byla u všech druhů stanovena přítomnost či absence sex chromatinu v polyploidních jádrech malpighických tubic. Přítomnost typického sex chromatinu byla potvrzena pouze u samic *Perigrapha i-cinctum* z příbuzného rodu. Dále byly určeny počty chromozomů u samic i samců zkoumaných druhů. Ancestrální počet chromozomů ($2n = 62$) byl nalezen pouze u *P. i-cinctum*. Pomocí metod CGH a GISH byl u samic všech druhů objeven pohlavní chromozom W. Díky tomu byla vyvrácená hypotéza o druhotné ztrátě chromozomu W u druhu *Orthosia gracilis*. Navíc u tohoto druhu, a dále u druhu *Orthosia cruda* a *Orthosia gothica*, byla stanovena hypotéza o přítomnosti chromozomu neo-W, a to na základě jednoho chybějícího chromozomu v mitotických jádrech u samic oproti samcům, chybějícího sex chromatinu a heterochromatinové části chromozomu W. Dalším krokem bylo zjištění počtu klastrů 18S rDNA metodou FISH. U všech zkoumaných druhů byl zjištěn zmnožený počet těchto klastrů. Metoda FISH byla použita rovněž pro vizualizaci telomerických sekvencí chromozomů. Následně byla u samic a samců všech druhů změřená průměrná velikost haploidního genomu. Tímto způsobem bylo zjištěno, že samci nemají větší velikost genomu než samice, čímž bylo podpořeno tvrzení o přítomnosti chromozomu W u samic. Nakonec byl úspěšně sestaven fylogenetický strom zkoumaných druhů podle Bayesiánské analýzy. Nalezené znaky navázané na fylogenetické vztahy skupiny jsou shrnuté v **Obrázku 11**.



Obrázek 11: Shrnutí nalezených znaků navázaných na fylogenezi zkoumaných druhů rodu *Orthosia*. $2n$ = diploidní počet chromozomů, SC = stav sex chromatinu (+ = SC přítomný, - = absence SC, +/- = v různých jádrech přítomnost i absence SC), W = přítomnost (+)

chromozomu W u samic, **C [pg]** = průměrná velikost haploidního genomu v pikogramech,
18S rDNA = počet klastrů 18S rDNA na mitotických chromozomech. ♀ = samice, ♂ = samci.
Fylogenetické vztahy bez zachovaného měřítka.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Abbott, J. K., Nordén, A. K., & Hansson, B. (2017). Sex chromosome evolution: Historical insights and future perspectives. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1854), 20162806. <https://doi.org/10.1098/rspb.2016.2806>
- Abe, H., Seki, M., Ohbayashi, F., Tanaka, N., Yamashita, J., Fujii, T., Yokoyama, T., Takahashi, M., Banno, Y., Sahara, K., Yoshido, A., Ihara, J., Yasukochi, Y., Mita, K., Ajimura, M., Suzuki, M. G., Oshiki, T., & Shimada, T. (2005). Partial deletions of the W chromosome due to reciprocal translocation in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*, 14(4), 339–352. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2005.00565.x>
- Bachtrog, D. (2006). A dynamic view of sex chromosome evolution. *Current Opinion in Genetics & Development*, 16(6), 578–585. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.10.007>
- Bachtrog, D., Mank, J. E., Peichel, C. L., Kirkpatrick, M., Otto, S. P., Ashman, T.-L., Hahn, M. W., Kitano, J., Mayrose, I., Ming, R., Perrin, N., Ross, L., Valenzuela, N., & Vamossi, J. C. (2014). Sex Determination: Why So Many Ways of Doing It? *PLoS Biology*, 12(7), e1001899. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001899>
- Buntrock, L., Marec, F., Krueger, S., & Traut, W. (2012). Organ growth without cell division: Somatic polyploidy in a moth, *Ephestia kuehniella*. *Genome*, 55(11), 755–763. <https://doi.org/10.1139/g2012-060>
- Charlesworth, B. (1991). The evolution of sex chromosomes. *Science*, 251(4997), 1030–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1998119>
- Charlesworth, B. (1996). The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Current Biology*, 6(2), 149–162. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00448-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00448-7)
- Charlesworth, B., & Charlesworth, D. (1997). Rapid fixation of deleterious alleles can be caused by Muller's ratchet. *Genetical Research*, 70(1), 63–73. <https://doi.org/10.1017/S0016672397002899>
- Charlesworth, D., Charlesworth, B., & Marais, G. (2005). Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity*, 95(2), 118–128. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800697>
- Cicconardi, F., Lewis, J. J., Martin, S. H., Reed, R. D., Danko, C. G., & Montgomery, S. H. (2021). Chromosome Fusion Affects Genetic Diversity and Evolutionary Turnover of

- Functional Loci but Consistently Depends on Chromosome Size. *Molecular Biology and Evolution*, 38(10), 4449–4462. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab185>
- Clark, F. E., & Kocher, T. D. (2019). Changing sex for selfish gain: B chromosomes of Lake Malawi cichlid fish. *Scientific Reports*, 9(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55774-8>
- Coutsis, J., De Prins, J., & De Prins, W. (2001). The chromosome number and karyotype of the two morphs of *Polyommatus (Lysandra) coridon* from Greece (Lepidoptera: Lycaenidae). *Phegea*, 29, 63–71.
- Dalíková, M., Provazníková, I., Provazník, J., Grof-Tisza, P., Pepi, A., & Nguyen, P. (2022). The role of repetitive DNA in re-patterning of major rDNA clusters in Lepidoptera. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2022.03.26.485928>
- Dalíková, M., Zrzavá, M., Hladová, I., Nguyen, P., Šonský, I., Flegrová, M., Kubíčková, S., Voleníková, A., Kawahara, A. Y., Peters, R. S., & Marec, F. (2017). New Insights into the Evolution of the W Chromosome in Lepidoptera. *Journal of Heredity*, 108(7), 709–719. <https://doi.org/10.1093/jhered/esx063>
- de Vos, J. M., Augustijnen, H., Bäscher, L., & Lucek, K. (2020). Speciation through chromosomal fusion and fission in Lepidoptera. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 375(1806), 20190539. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0539>
- Elliott, T. A., & Gregory, T. R. (2015). What's in a genome? The C-value enigma and the evolution of eukaryotic genome content. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1678), 20140331. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0331>
- Folmer, O., Black, M., Wr, H., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3, 294–299.
- Fraïsse, C., Picard, M. A. L., & Vicoso, B. (2017). The deep conservation of the Lepidoptera Z chromosome suggests a non-canonical origin of the W. *Nature Communications*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01663-5>
- Fuková, I., Nguyen, P., & Marec, F. (2005). Codling moth cytogenetics: Karyotype, chromosomal location of rDNA, and molecular differentiation of sex chromosomes. *Genome*, 48(6), 1083–1092. <https://doi.org/10.1139/g05-063>
- Fuková, I., Traut, W., Vítková, M., Nguyen, P., Kubíčková, S., & Marec, F. (2007). Probing the W chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from

- microdissected sex chromatin. *Chromosoma*, 116(2), 135–145. <https://doi.org/10.1007/s00412-006-0086-0>
- Gregory, T. R., & Hebert, P. D. N. (2003). Genome size variation in lepidopteran insects. *Canadian Journal of Zoology*, 81(8), 1399–1405. <https://doi.org/10.1139/z03-126>
- Hejníčková, M., Dalíková, M., Potocký, P., Tammaru, T., Trehubenko, M., Kubíčková, S., Marec, F., & Zrzavá, M. (2021). Degenerated, undifferentiated, rearranged, lost: High variability of sex chromosomes in Geometridae (Lepidoptera) identified by sex chromatin. *Cells*, 10(9), 2230. <https://doi.org/10.3390/cells10092230>
- Hejníčková, M., Dalíková, M., Zrzavá, M., Marec, F., Lorite, P., & Montiel, E. E. (2023). Accumulation of retrotransposons contributes to W chromosome differentiation in the willow beauty *Peribatodes rhomboidaria* (Lepidoptera: Geometridae). *Scientific Reports*, 13(1), 534. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27757-3>
- Hejníčková, M., Koutecký, P., Potocký, P., Provazníková, I., Voleníková, A., Dalíková, M., Visser, S., Marec, F., & Zrzavá, M. (2019). Absence of W Chromosome in Psychidae Moths and Implications for the Theory of Sex Chromosome Evolution in Lepidoptera. *Genes*, 10(12), 1016. <https://doi.org/10.3390/genes10121016>
- Jeffries, D. L., Gerchen, J. F., Scharmann, M., Pannell, J. R., & Jeffries, D. L. (2021). A neutral model for the loss of recombination on sex chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 376(1832), 20200096. <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0096>
- Kamiya, T., Kai, W., Tasumi, S., Oka, A., Matsunaga, T., Mizuno, N., Fujita, M., Suetake, H., Suzuki, S., Hosoya, S., Tohari, S., Brenner, S., Miyadai, T., Venkatesh, B., Suzuki, Y., & Kikuchi, K. (2012). A Trans-Species Missense SNP in Amhr2 Is Associated with Sex Determination in the Tiger Pufferfish, *Takifugu rubripes* (Fugu). *PLoS Genetics*, 8(7), e1002798. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002798>
- Keegan, K. L., & Wagner, D. L. (2022). A Preliminary Molecular Phylogeny for *Stiria* (Noctuidae, Stiriinae) and Description of a New Species from Texas. *The Journal of the Lepidopterists' Society*, 76(3), 175–182. <https://doi.org/10.18473/lepi.76i3.a2>
- Kiuchi, T., Koga, H., Kawamoto, M., Shoji, K., Sakai, H., Arai, Y., Ishihara, G., Kawaoka, S., Sugano, S., Shimada, T., Suzuki, Y., Suzuki, M. G., & Katsuma, S. (2014). A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm. *Nature*, 509(7502), 633–636. <https://doi.org/10.1038/nature13315>

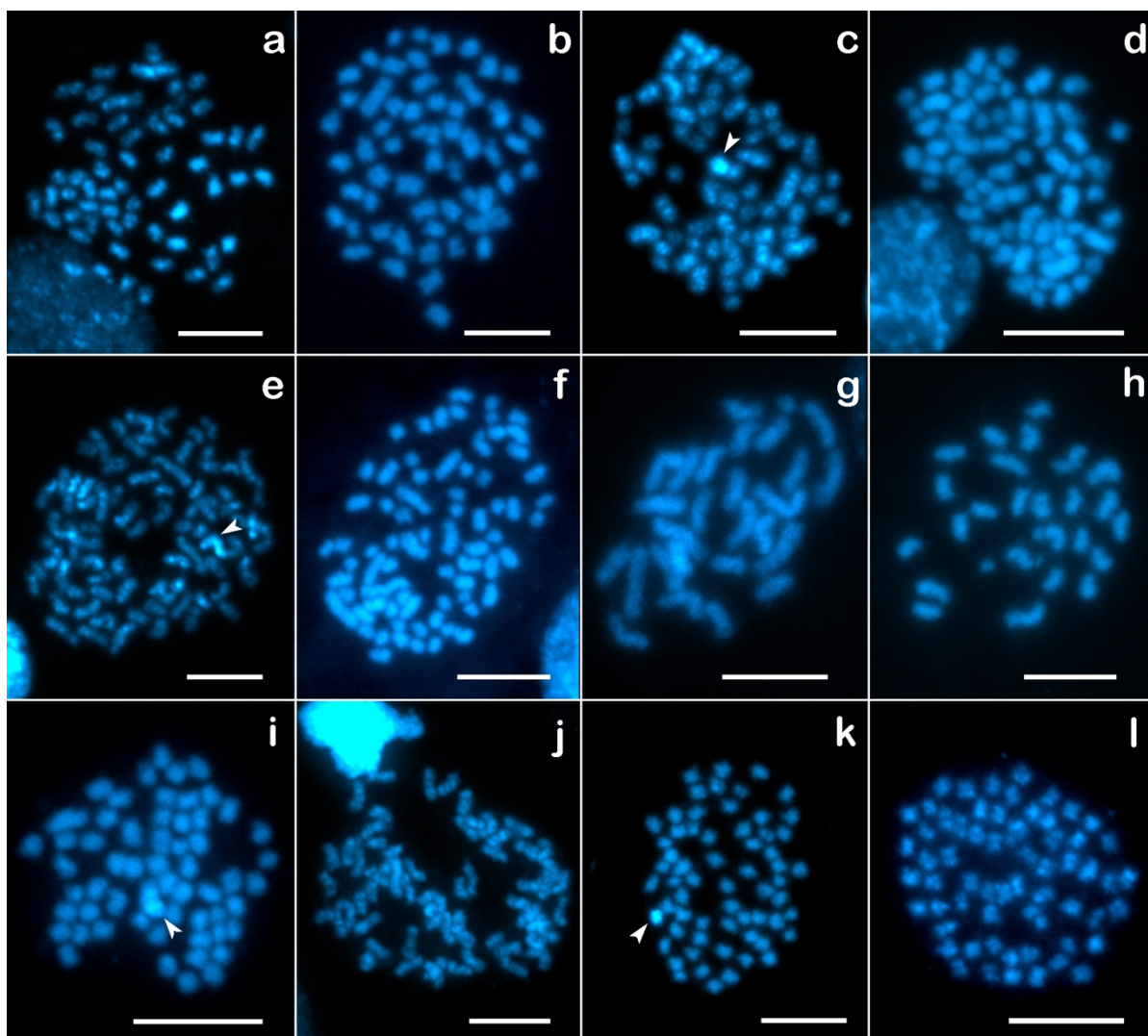
- Klein, S. J., & O'Neill, R. J. (2018). Transposable elements: Genome innovation, chromosome diversity, and centromere conflict. *Chromosome Research*, 26(1–2), 5–23. <https://doi.org/10.1007/s10577-017-9569-5>
- Kreklová, M. (2017). *Holokinetický drive a jeho role v karyotypové evoluci motýlů*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
- Lewis, J. J., Cicconardi, F., Martin, S. H., Reed, R. D., Danko, C. G., & Montgomery, S. H. (2021). The *Dryas iulia* Genome Supports Multiple Gains of a W Chromosome from a B Chromosome in Butterflies. *Genome Biology and Evolution*, 13(7), 1–13. <https://doi.org/10.1093/gbe/evab128>
- Lukhtanov, V. A. (2000). Sex chromatin and sex chromosome systems in nonditrysian Lepidoptera (Insecta). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 38(2), 73–79. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0469.2000.382130.x>
- Lukhtanov, V. A., Dincă, V., Talavera, G., & Vila, R. (2011). Unprecedented within-species chromosome number cline in the Wood White butterfly *Leptidea sinapis* and its significance for karyotype evolution and speciation. *BMC Evolutionary Biology*, 11(1), 109. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-109>
- Mank, J. E., & Ellegren, H. (2007). Parallel divergence and degradation of the avian W sex chromosome. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(8), 389–391. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.05.003>
- Marec, F., & Traut, W. (1994). Sex chromosome pairing and sex chromatin bodies in W-Z translocation strains of *Epehestia kuehniella* (Lepidoptera). *Genome*, 37, 426–435.
- Nguyen, P., & Carabajal, P. L. (2016). On the Neo-Sex Chromosomes of Lepidoptera. In P. Pontarotti (Ed.), *Evolutionary Biology: Convergent Evolution, Evolution of Complex Traits, Concepts and Methods* (s. 171–185). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-41324-2>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10709-009-9424-5>
- Nguyen, P., Sýkorová, M., Šíchová, J., Kůta, V., Dalíková, M., Čapková Frydrychová, R., Neven, L. G., Sahara, K., & Marec, F. (2013). Neo-sex chromosomes and adaptive potential in tortricid pests. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(17), 6931–6936. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220372110>

- Prokopowich, C. D., Gregory, T. R., & Crease, T. J. (2003). The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. *Genome*, 46(1), 48–50. <https://doi.org/10.1139/g02-103>
- Provazníková, I., Hejníčková, M., Visser, S., Dalíková, M., Carabajal Paladino, L. Z., Zrzavá, M., Voleníková, A., Marec, F., & Nguyen, P. (2021). Large-scale comparative analysis of cytogenetic markers across Lepidoptera. *Scientific Reports*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91665-7>
- Rice, W. R. (1987). The Accumulation of Sexually Antagonistic Genes as a Selective Agent Promoting the Evolution of Reduced Recombination Between Primitive Sex Chromosomes. *Evolution*, 41(4), 911–914. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1987.tb05864.x>
- Robinson, R. (1971). Lepidoptera Genetics. In *Lepidoptera Genetics*. <https://doi.org/10.1016/c2013-0-01588-5>
- Sahara, K., Yoshido, A., & Traut, W. (2012). Sex chromosome evolution in moths and butterflies. *Chromosome Research*, 20(1), 83–94. <https://doi.org/10.1007/s10577-011-9262-z>
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., & Flook, P. (1994). Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6), 651–701. <https://doi.org/10.1093/aesa/87.6.651>
- Steinemann, S., & Steinemann, M. (2005). Y chromosomes: Born to be destroyed. *BioEssays*, 27(10), 1076–1083. <https://doi.org/10.1002/bies.20288>
- Šíchová, J., Nguyen, P., Dalíková, M., & Marec, F. (2013). Chromosomal Evolution in Tortricid Moths: Conserved Karyotypes with Diverged Features. *PLoS ONE*, 8(5), e64520. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064520>
- Šíchová, J., Voleníková, A., Dincă, V., Nguyen, P., Vila, R., Sahara, K., & Marec, F. (2015). Dynamic karyotype evolution and unique sex determination systems in *Leptidea* wood white butterflies. *BMC Evolutionary Biology*, 15(1), 89. <https://doi.org/10.1186/s12862-015-0375-4>
- Traut, W., & Marec, F. (1996). Sex Chromatin in Lepidoptera. *The Quarterly Review of Biology*, 71(2), 239–256. <https://doi.org/10.1086/419371>

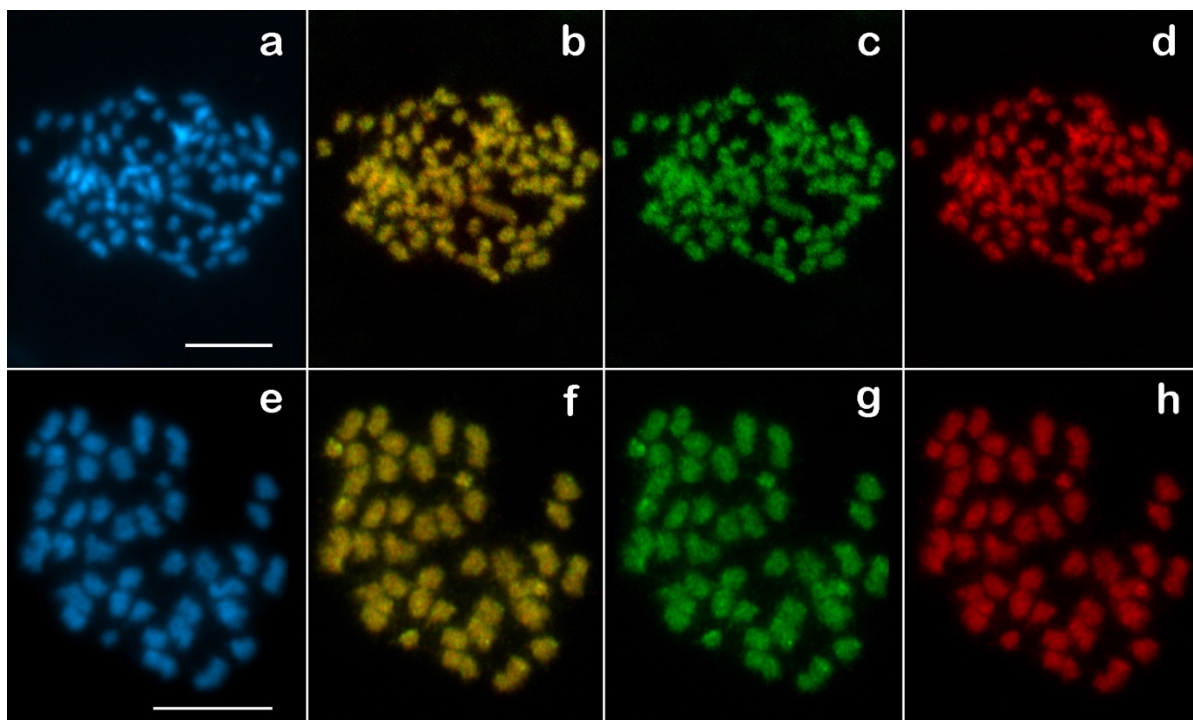
- Traut, W., & Marec, F. (1997). Sex Chromosome Differentiation in Some Species of Lepidoptera (Insecta). *Chromosome Research*, 5(5), 283–291. <https://doi.org/10.1023/B:CHRO.0000038758.08263.c3>
- Traut, W., & Mosbacher, G. C. (1968). Geschlechtschromatin bei Lepidopteren. *Chromosoma*, 25(3), 343–356. <https://doi.org/10.1007/BF01183125>
- Traut, W., Sahara, K., & Marec, F. (2007). Sex Chromosomes and Sex Determination in Lepidoptera. *Sexual Development*, 1(6), 332–346. <https://doi.org/10.1159/000111765>
- Traut, W., Schubert, V., Daliková, M., Marec, F., & Sahara, K. (2019). Activity and inactivity of moth sex chromosomes in somatic and meiotic cells. *Chromosoma*, 128(4), 533–545. <https://doi.org/10.1007/s00412-019-00722-8>
- Traut, W., Vogel, H., Glöckner, G., Hartmann, E., & Heckel, D. G. (2013). High-throughput sequencing of a single chromosome: A moth W chromosome. *Chromosome Research*, 21(5), 491–505. <https://doi.org/10.1007/s10577-013-9376-6>
- Vicoso, B., Kaiser, V. B., & Bachtrog, D. (2013). Sex-biased gene expression at homomorphic sex chromosomes in emus and its implication for sex chromosome evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(16), 6453–6458. <https://doi.org/10.1073/pnas.1217027110>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10577-007-1173-7>
- Vlašánek, P., Bartoňová, A., Marec, F., & Konvička, M. (2017). Elusive „*Parnassius mnemosyne*” (Linnaeus, 1758) larvae: Habitat selection, sex determination and sex ratio (Lepidoptera: Papilionidae). *SHILAP Revista de lepidopterologia*, 45(180), 561–569.
- Voleníková, A. (2012). *Aberantní výskyt heterochromatinu u zavíječe moučného, Ephestia kuehniella (Lepidoptera)*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
- Voleníková, A. (2015). *Analýza pohlavních chromosomů vybraných druhů primitivních motýlů z čeledi hrotnokřídlcovití (Lepidoptera: Hepialoidea)*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
- Wahlberg, N., Peña, C., Ahola, M., Wheat, C. W., & Rota, J. (2016). PCR primers for 30 novel gene regions in the nuclear genomes of lepidoptera. *ZooKeys*, 2016(596), 129–141. <https://doi.org/10.3897/zookeys.596.8399>

- Wahlberg, N., & Wheat, C. W. (2008). Genomic Outposts Serve the Phylogenomic Pioneers: Designing Novel Nuclear Markers for Genomic DNA Extractions of Lepidoptera. *Systematic Biology*, 57(2), 231–242. <https://doi.org/10.1080/10635150802033006>
- Werner, L. (1975). Zur Evolution des Karyotyps bei den Lepidopteren. Die Chromosomenzahlen der Noctuiden. *Genetica*, 45(3), 377–395. <https://doi.org/10.1007/BF01508313>
- Whiting, M. F. (2002). Phylogeny of the holometabolous insect orders: Molecular evidence. *Zoologica Scripta*, 31(1), 3–15. <https://doi.org/10.1046/j.0300-3256.2001.00093.x>
- Wright, A. E., Dean, R., Zimmer, F., & Mank, J. E. (2016). How to make a sex chromosome. *Nature Communications*, 7(1), 12087. <https://doi.org/10.1038/ncomms12087>
- Yoshido, A., & Marec, F. (2023). Deviations in the Z:A ratio disrupt sexual development in the eri silkmoth, *Samia cynthia ricini*. *Genetics*, 1–38. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyad023>
- Yoshido, A., Marec, F., & Sahara, K. (2005). Resolution of sex chromosome constitution by genomic in situ hybridization and fluorescence in situ hybridization with (TTAGG) n telomeric probe in some species of Lepidoptera. *Chromosoma*, 114(3), 193–202. <https://doi.org/10.1007/s00412-005-0013-9>
- Yoshido, A., Marec, F., & Sahara, K. (2016). The fate of W chromosomes in hybrids between wild silkmoths, *Samia cynthia ssp.*: No role in sex determination and reproduction. *Heredity*, 116(5), 424–433. <https://doi.org/10.1038/hdy.2015.110>
- Yoshido, A., Sahara, K., Marec, F., & Matsuda, Y. (2011). Step-by-step evolution of neo-sex chromosomes in geographical populations of wild silkmoths, *Samia cynthia ssp.* *Heredity*, 106(4), 614–624. <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.94>
- Yoshido, A., Šíchová, J., Pospíšilová, K., Nguyen, P., Voleníková, A., Šafář, J., Provazník, J., Vila, R., & Marec, F. (2020). Evolution of multiple sex-chromosomes associated with dynamic genome reshuffling in *Leptidea* wood-white butterflies. *Heredity*, 125(3), 138–154. <https://doi.org/10.1038/s41437-020-0325-9>

8 PŘÍLOHY



Obrázek 1: Počty chromozomů u samic a samců v diploidním jádře během mitózy. Jádra podbarvená DAPI. *Orthosia cerasi* (a) samice $2n = 56$, (b) samec $2n = 56$. *O. cruda* (c) samice $2n = 63$, šipka ukazuje na neo-W, (d) samec $2n = 64$. *O. gothica* (e) samice $2n = 71$, šipka ukazuje na neo-W, (f) samec $2n = 72$. *O. gracilis* (g) samice $2n = 27$, (h) samec $2n = 28$. *O. incerta* (i) samice $2n = 58$, šipka ukazuje na W, (j) samec $2n = 58$. *Perigrapha i-cinctum* (k) samice $2n = 62$, šipka ukazuje na W, (l) samec $2n = 62$. Měřítko = 10 μm .



Obrázek 2: CGH na mitotických jádrech samců *O. gothica* (**a-d**) a *O. gracilis* (**e-h**). Podbarvení DAPI (**a, e**), samičí zelená sonda a samčí červená sonda přes sebe (**b, f**), samičí zelená sonda (**c, g**), samčí červená sonda (**d, h**). Měřítko = 10 μm .

Tabulka I: Přehled primerů testovaných pro amplifikaci genů nevybraných pro fylogenetickou analýzu.

Lokus	Sekvence primerů 5'-3' (Forward/Reverse)	Délka produktu (bp)	Původ primerů
Arginine kinase	TNA CYG ARK CCC ART AYA AG TTG ATS AGY TCR GCG ATG	596	(Wahlberg & Wheat, 2008)
IDH	GGW GAY GAR ATG ACN AGR ATH ATH TGG TTY TTR CAI GCC CAN ACR AAN CCN CC	710	(Wahlberg & Wheat, 2008)
wingless	GAR TGY AAR TGY CAY GGY ATG TCT GG ACT ICG CAR CAC CAR TGG AAT GTR CA	400	(Wahlberg & Wheat, 2008)
CaATPase	GAATACGARCCBGAAATGGGWAARGT CDCCRTGRGCGGGGTCGTTRAAGTG	444	(Wahlberg et al., 2016)
DDX23	ACAAAAGATAAAGAACGTGARGARGARGCHAT TGATCTTTTTCAGACCARTGHCKRTCATCCCA	303	(Wahlberg et al., 2016)
ProSup	GACAACAATCGACTGGCAYCCNAAYAA CTGTCCAGTGACTGGAAYYTTYTTCATDGC	432	(Wahlberg et al., 2016)
PSb	GCTGGGAGCTACTGGVTGYTGGTGYGAYA AGATGCAGTCTCCAGTGTAGATRTCDCKYTC	366	(Wahlberg et al., 2016)
SSu72	CAGCTGACAGACCTAAYTGTTAYGARTTYGG CCGATTGTAGCTTCTTCRTGRTRTCYTG	249	(Wahlberg et al., 2016)