

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Cytogenetická analýza vybraných mutantních linií
bource morušového**

Bakalářská práce

Adriana Crhonková

Školitel: RNDr. Petr Nguyen, Ph.D.

České Budějovice 2021

Crhonková A., 2021: Cytogenetická analýza vybraných mutantních linií bource morušového. [Cytogenetic analysis of chosen mutant lineages of *Bombyx mori*. Bc. Thesis, in Czech] – 39 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Bombyx mori is the main model organism in order Lepidoptera, the biggest group with female heterogamety (ZZ/ZW). In past 5000 years of its breeding arose many mutant strains, kept in stocks in Japan, China or other countries. This study is focused on sex-limited p^B (black larval marking) *Bombyx mori* (TWPB) strain. The aim is to confirm the presence of neo-W chromosome.

Prohlášení:

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

V Českých Budějovicích, 8. 12. 2021

.....

Adriana Crhonková

Poděkování:

Ráda bych poděkovala svému školiteli Petrovi za vedení mé bakalářské práce, pro které mi nabídl velice zajímavé téma, a za vřelé přijetí do jeho laboratoře. Stejně tak můj dík patří Monče, která jakožto Petrova pravá ruka, měla na starost naučit mě většinu metod v laboratoři i následné zpracování výsledků. Také bych chtěla poděkovat Martě, Aničce a Lukášovi za pomoc ve chvíli největší nouze. Anetě děkuji za velmi nápomocnou zpětnou vazbu po přečtení téměř finální verze této práce. Dále děkuji všem ostatním členům naší laboratoře za vytvoření skvělé atmosféry, do které se pokaždé ráda vracím. Děkuji i Magdě Zrzavé za poutavé hodiny genetiky, které mě motivovaly vydat se právě tímto směrem. A nakonec bych chtěla poděkovat mojí rodině a přátelům za to, že pro mě byli a jsou oporou v dobrém i zlém.

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Pohlavní chromozomy	1
1.2	Chromozomy motýlů	2
1.2.1	Chromozom Z	4
1.2.2	Chromozom W	6
1.2.2.1	Pohlavně specifický heterochromatin	8
1.2.2.2	Vznik chromozomu W	9
1.3	Neopohlavní chromozomy	11
1.4	<i>Bombyx mori</i>	13
1.4.1	Mutantní linie <i>TWPB</i>	14
2	Cíle práce.....	16
3	Metody	17
3.1	Materiály	17
3.2	Příprava chromozomálních preparátů	17
3.3	Izolace genomové DNA.....	18
3.4	Značení hybridizačních sond	18
3.5	Genomová <i>in situ</i> hybridizace	18
3.6	Zpracování fotografií a měření chromozomů	19
4	Výsledky.....	20
5	Diskuze.....	22
6	Závěr.....	26
7	Bibliografie.....	27
8	Přílohy	39

1 Úvod

1.1 Pohlavní chromozomy

Pohlaví organismu může být determinováno různými způsoby. U některých organismů pohlaví závisí na podnětech z okolního prostředí, jako je teplota nebo sociální kontext, u jiných je pohlaví určeno geneticky. Poslední zmíněný způsob může zahrnovat různé mechanismy, od determinace pohlaví jediným genem, až po specializované pohlavní chromozomy (Rice, 1996). Rozeznáváme dva základní systémy chromozomálního určení pohlaví: XX/XY, kdy chromozom Y je specifický pro samčí pohlaví, a WZ/ZZ, kdy chromozom W je specifický pro samičí pohlaví (Sahara et al., 2012).

Obecně je uznávána hypotéza, že pohlavní chromozomy vznikly z homologního páru autozomů, které se postupně diferencovaly, až daly vznik heteromorfnímu páru pohlavních chromozomů. Prvním krokem tohoto procesu je vznik dvou oddělených pohlaví. U hermafroditů produkujících samčí i samičí gamety dojde ke vzniku samičího pohlaví vzniklého recesivní mutací pro samčí sterilitu m^s („male-sterility“). V přítomnosti samic je pro hermafrofitu výhodnější tvořit pouze samčí gamety. To vede k selekci druhé dominantní mutace f^s („female-sterility“) způsobující samičí sterilitu. Pokud lokusy těchto dvou mutací budou v blízké vazbě, vznikne většinová populace s homogametickými samicemi nesoucími alely $f^f m^s / f^f m^s$ a heterogametickými samci $f^s m^f / f^f m^s$. Pokud je dominance opačná (m^s, f^s), vzniká samičí heterogametické pohlaví (Charlesworth, 1996).

Dalším krokem je potlačení rekombinace mezi úseky chromozomů nesoucími geny pro determinaci pohlaví. Velikost úseku s potlačenou rekombinací se může postupně zvětšovat až dojde k potlačení rekombinace mezi celými chromozomy a vzniku chromozomálního určení pohlaví. (Rice, 1996; Charlesworth et al., 2000). Co stojí za tímto mechanismem je však spekulativní. Dlouho byla zastávána hypotéza, podle které dochází na pohlavních chromozomech v blízkosti oblasti determinující pohlaví k hromadění pohlavně antagonistických genů („sex-antagonistic genes“), tzn. genů výhodných pro jedno pohlaví, ale nevýhodných pro druhé (Charlesworth et al., 2005). Tento model však zatím nebyl empiricky prokázán (Perrin, 2021). Recentně tak byly navrženy alternativní hypotézy, jako např. neutrální model potlačení rekombinace (Perrin, 2021; Jeffries et al., 2021). Podle něj je homologní rekombinace běžným opravným mechanismem. Chybné rozpoznání homologní sekvence však může vést ke škodlivým přestavbám. Proto existuje poměrně přesný mechanismus pro hledání homologních sekvencí (Renkawitz et al., 2014)

a mechanismem pro opravu špatného párování (Spies & Fishel, 2015). Z tohoto důvodu je v oblasti genů pro determinaci pohlaví snížena pravděpodobnost rekombinace a mutace se zde snáze akumulují, čímž dále zvětšují rozsah nehomologní sekvenční a snižují tak frekvenci rekombinace podél čím dál většího úseku chromozomu (Jeffries et al., 2021).

Jako důsledek potlačené rekombinace genový obsah pohlavně specifického chromozomu (Y nebo W) postupně degeneruje, až může dojít ke ztrátě pohlavně specifického chromozomu nebo ke vzniku nového mechanismu určení pohlaví na jiném chromozomu. Např. u rodu *Drosophila* došlo k transpozici genu determinujícího pohlaví z chromozomu 4 na nynější chromozom X. Chromozom 4 se tak z vysoce diferenciovaného pohlavního chromozomu přeměnil zpět na autozom, zůstává však heterochromatizovaný (Vicoso & Bachtrog, 2013).

1.2 Chromozomy motýlů

Řád Lepidoptera (motýli a můry) zahrnuje okolo 160 000 popsáných druhů (Kristensen et al., 2007). Karyotypován byl však jejich zlomek. Mitotické chromozomy motýlů jsou malé, velmi početné, a morfologicky uniformní (de Prins & Saitoh, 2003). Jsou holocentrické, tzn. kinetochor se tvoří po celé délce chromozomu. Nemají tak lokalizovanou centromeru (Traut et al., 2007; Sahara et al., 2012), jejíž pozice bývá používána jako jeden z hlavních určovacích znaků pro sestavení karyogramu (O'Connor, 2008). Jejich identifikace je tím pádem velmi problematická. Ani klasické proužkovací metody neposkytly na mitotických chromozomech motýlů žádný vzor. Pro cytogenetické studie jsou mnohem uchopitelnější pachytení chromozomy. V tomto stádiu se homologní chromozomy párují a tvoří delší bivalenty s typickými chromomerovými vzory. Toho využil Traut (1976) k identifikaci chromozomů u modelového organismu *Bombyx mori* (čeleď Bombycidae). Charakteristický chromomerový vzor byl však rozeznatelný pouze u šesti bivalentů. Cytogenetický výzkum byl tak po dlouhou dobu omezen na pouhé počítání chromozomů. K výraznému pokroku došlo s příchodem fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH) a jejích modifikací jako například genomové *in situ* hybridizace (GISH) nebo komparativní genomové hybridizace (CGH), které nám umožňují identifikovat jednotlivé chromozomy nebo lokalizovat specifické sekvenční (Goldsmith, 2010). Wu a kol. (1999) zkonstruovali dvě knihovny bakteriálních umělých chromozomů, což jsou dlouhé fragmenty jaderné DNA vložené do plazmidu, u organismu *Bombyx mori* (čeleď Bombycidae; p50-knihovna a C108-knihovna) a identifikovali klony nesoucí známé geny. Postupně bylo do vazebné mapy ukotveno 523 BAC-klonů nesoucích 342 známých genů, 85 sekvencí EST

(„Expressed Sequence Tag“) a 1775 markerů SNP („single nucleotide polymorphism“; Yasukochi et al., 2006; Yamamoto et al., 2008). Samčí genom bource byl osekvenován dvěma nezávislými skupinami z Japonska a Číny (Mita et al., 2004; Xia et al., 2004) a v kombinaci s konstruovanou vazebnou mapou se stal podkladem pro mnoho srovnávacích studií. BAC-klony byly také metodou BAC-FISH mapovány na jednotlivé chromozomy bource a pomohly tak k identifikaci jednotlivých chromozomů (Yoshido et al., 2005).

Haploidní počet chromozomů u skupiny Lepidoptera se nejčastěji pohybuje mezi $n=30-31$ chromozomy, kdy $n=31$ je považován za ancestrální stav, jak potvrdily karyologické studie u bazálních druhů motýlů (Lukhtanov, 2000), i novější genetické a fyzické mapy v kombinaci s analýzou genomových dat (Baxter et al., 2011; Sahara et al., 2013; Van't Hof et al., 2013). U některých skupin se však počet chromozomů výrazně liší. K redukci počtu chromozomů pravděpodobně dochází díky chromozomálním fúzím. Tak je tomu například u rodu *Orgyia* (čeleď Lymantriidae), kdy *Orgyia antiqua* má $n=14$ a *Orgyia thyellina* má $n=11$ (Traut & Clarke, 1997). Nejnižší počet chromozomů $n=5$ byl nalezen u *Hypothyris thea* (čeleď Nymphalidae, (Brown Jr et al., 2004) a u *Agathymus aryna* (čeleď Hesperidae, (de Prins & Saitoh, 2003). Vysoké počty chromozomů u motýlů naopak vznikly rozpadem chromozomů („fission“). Například *Antheraea pernyi* (čeleď Saturniidae) má $n=49$ zatímco její blízký příbuzný *Antheraea yamamai* (čeleď Saturniidae) má $n=31$ odpovídající ancestrálnímu stavu Lepidoptera (Kawaguchi 1934, citováno v Goldsmith, 2010). Nejvyšší pozorovaný počet chromozomů byl pak objeven u modráška *Polyommatus atlantica* (čeleď Lycaenidae) s $n= 224-226$, díky kterému je znám jakožto nositel nejvyššího počtu chromozomů v celé živočišné říši (Lukhtanov, 2015).

Motýli mají společně se svou sesterskou skupinou Trichoptera (chrostíci) chromozomální určení typu *Abraxas*, tedy heterogametické samičí pohlaví. Touto vlastností se tyto dvě skupiny odlišují od ostatních hmyzích skupin s chromozomálním určením typu *Drosophila*, tedy heterogametickými samci (Traut et al., 2007; Sahara et al., 2012; Blackmon et al., 2016). Neditrysijské skupiny motýlů (tzv. „non-ditrysijská skupina“) sdílí společně se skupinou Trichoptera konstituci pohlavních chromozomů ZZ/Z0 (Marec & Novák, 1998; Lukhtanov, 2000; toto tvrzení bylo však zpochybněno, viz kapitola 1.2.2.2.). U linií Tischeriidea a Ditrysia, zahrnujících 98% dnes žijících druhů, pak můžeme pozorovat systém ZZ/ZW, nebo jeho různé odvozené varianty, např. ZW_1W_2/ZZ

nebo $Z_1Z_2W/Z_1Z_1Z_2Z_2$. Systém $ZZ/Z0$ se může druhotně objevovat i u pokročilejších skupin jako důsledek degenerace a ztráty chromozomu W (Traut et al., 2007; Sahara et al., 2012).

Embrya mající chromozomy ZW se vyvinou v samice a ZZ v samce. Primární signál pro tento vývoj může být dvojího typu: 1) chromozom W nese dominantní pohlaví determinující gen, a spouští vývoj v samici, pokud W není přítomen, dochází k vývoji v samce nebo 2) chromozom Z nese recesivní, pohlaví determinující gen pro vývoj v samce, který působí proti genu nebo samičímu mateřskému efektu pro vývoj v samici, který může být na autozomu nebo chromozomu W (Sahara et al., 2012; Traut et al., 2007). Všechny skupiny $ZZ/Z0$ jsou pro determinaci pohlaví závislé na počtu chromozomů Z („Z-counting system“). U organismů se systémem ZZ/ZW není jisté, zda je jejich pohlaví určeno genem determinujícím pohlaví, jako je tomu u bource *Bombyx mori* (čeleď Bombycidae), nebo je na chromozomu W nezávislé jako u *Samia cynthia ssp.* (čeleď Saturniidae) a pravděpodobně tedy také podléhá Z-counting systému (Yoshido et al., 2016; Abe et al., 2008). Abe a kol. (2008) identifikovali pomocí deleční mapování na mutantech *Bombyx mori* (čeleď Bombycidae) gen determinující pohlaví *Fem* („*Feminiser*“) na krátkém úseku odpovídajícímu RAPD (náhodná amplifikace polymorfní DNA, „Random Amplification of Polymorphic DNA“) markeru W-Rikishi. Ten je prekurzorem *Fem* piRNA („piwi interacting RNA“; Suzuki et al., 2003; Funaguma et al., 2005), jejíž cílovým genem je Z-vázaný gen *Masc* („*Masculinizer*“). Umlčení exprese genu *Masc* messenger *Fem* piRNA vede k alternativnímu sestřihu *Bmdxs* („*doublesex*“) v samičí verzi. Pokud k umlčení *Masc* messenger RNA nedojde, dochází k sestřihu *Bmdxs* v samčí verzi a následuje kaskáda vývoje v samce (Kiuchi et al., 2014).

1.2.1 Chromozom Z

Chromozom Z se ve svých sekvencích v mnohém podobá autozomům, je tvořen euchromatinem, oproti chromozomu W je mnohem stabilnější a obsahuje velké množství genů. Pomocí analýz Z-vázaných genů byl potvrzen jejich vliv na larvální vývoj, adaptaci k prostředí, sexuální chování nebo reprodukční izolaci (Sperling, 1994; Kroemer et al., 2011; Kost et al., 2016). K reprodukční izolaci mohou přispívat Z-vázané geny mající vliv například na voltinismus (*Pdd* „*postdiapause development time*“) nebo geny ovlivňující samičí odpověď na feromony (*Resp*), pozorované u *Ostrinia nubilalis* (čeleď Crambidae), které se nacházejí v oblasti mezi geny *Tpi/OR*, u které došlo k zablokování rekombinace v důsledku inverze (Dopman et al., 2005; Wadsworth et al., 2015; Kozak et al., 2019). Přítomnost markerového genu *Tpi* byla potvrzena na chromozomu Z i u dalších organismů,

jako je *Bombyx mori* (čeleď Bombycidae; Yasukochi et al., 2006), *Heliconius melpomene* (čeleď Nymphalidae; Jiggins et al., 2005), *Ostrinia nubilalis* (čeleď Crambidae; Dopman et al., 2004) a *Papilio glaucus* (čeleď Papilionidae; Scriber et al., 1996).

I další srovnávací studie ukázaly, že genový obsah chromozomu Z je napříč skupinou Lepidoptera poměrně konzervovaný i u vzdáleně příbuzných linií (Fraïsse et al., 2017), zároveň se však objevují významné chromozomální přestavby v podobě translokací, transpozicí, inverzí nebo fúzí, které mohou mít významnou roli při adaptivní evoluci a speciaci (Yasukochi et al., 2009; Van't Hof et al., 2013). Yasukochi (2009) pomocí BAC-FISH mapování srovnával genový obsah u *Manduca sexta* (čeleď Sphingidae) a *B. mori* (čeleď Bombycidae), oba příslušníky nadčeledi Bombycoidea. Potvrdil konzervovanou syntenii u 20 chromozomů, z toho 19 mělo zachované pořadí srovnávaných genů. Celkově bylo zmapováno 124 ze 131 orthologů *B. mori*. U chromozomu Z bylo pořadí genů zachováno pouze u třetiny chromozomu, další dvě třetiny měly geny v obráceném pořadí, což nasvědčuje rozsáhlé inverzi. Srovnávací studie vazebné mapy u *Biston betularia* (čeleď Geometridae) s genomem fylogeneticky poměrně vzdáleného *B. mori* (čeleď Bombycidae) ukázala, že pouze 2 z 157 mapovaných genů se nacházelo na jiném chromozomu. V této studii bylo mapováno celkem 17 chromozomů obsahujících alespoň 3 orthologní geny (minimální nutný počet genů pro zjištění pořadí na chromozomu) a z toho 12 mělo zachované pořadí genů. U chromozomu Z byly nalezeny dvě inverze a dvě transpozice (Van't Hof et al., 2013). Srovnání Z-vázaných genů u *Camerana ohridella* (čeleď Gracillariidae, linie Ditrysia), *Nemophora degeerella* (čeleď Adelidae, „non-ditrysián“ linie) a *Triodia sylvina* (Hepialidae, „non-ditrysián“ linie) proti genomu *Bombyx mori* (čeleď Bombycidae, linie Ditrysia) ukázalo výskyt velkých syntenních bloků v rámci chromozomu Z napříč celou skupinou Lepidoptera (Fraïsse et al., 2017).

Akumulace velkého množství genů výhodných pro samčí pohlaví je pravděpodobně způsobena pomocí tzv. efektu rychlé evoluce chromozomu Z („Faster-Z-effect“). Nově vzniklé recesivní mutace na chromozomu Z se u samic nachází v hemizygotním stavu (Z0 nebo ZW) a jsou tak vystaveny selekci (Mank et al., 2010).

Dalším intenzivně studovaným tématem dotýkajícím se chromozomu Z je kompenzace genové dávky, což je regulační mechanismus srovnávající úroveň genové exprese mezi homogametickým a heterogametickým pohlavím. Samci mají dvě kopie chromozomu Z, zatímco samice pouze jednu. Výsledkem je poloviční úroveň transkripce

a translace Z-vázaných genů, které dále mohou ovlivňovat úroveň transkripce autozomálních genů (Wijchers & Festenstein, 2011). Autozomální monozomie, tj. forma aneuploidie, kdy normálně diploidní pár chromozomů je zredukován na jednu kopii, běžně bývá smrtelná. Proto byla dlouho předpokládána nutná přítomnost nějakého kompenzačního mechanismu. Další studie na ptácích (Arnold et al., 2008) nebo *Schistosoma mansoni* (třída Trematoda, Vicoso & Bachtrog, 2011) však ukázaly, že kompletní kompenzace genové dávky není podmínkou, naopak byla přisuzována pouze skupinám s heterogametickými samci, zatímco u skupin se samičím heterogametickým pohlavím měla chybět (Mank, 2013). Tento názor potvrzovaly první studie kompenzace genové dávky u motýlů na *B. mori* (čeleď Bombycidae, (Zha et al., 2009) a *Plodia interpunctella* (čeleď Pyralidae; Harrison et al., 2012). Novější práce u *B. mori* (Walters & Hardcastle, 2011) a *Manduca sexta* (Smith et al., 2014) však ukázaly kompletní kompenzaci genové dávky u těchto organismů. Naopak u motýlů rodu *Heliconius* (čeleď Nymphalidae; Walters et al., 2015) byla potvrzena pouze částečná kompenzace genové dávky. Na základě těchto výsledků Walters (2015) formuloval dvě možná vysvětlení:

- a) Vyvinuly se nezávisle na sobě dva mechanismy pro kompenzaci genové dávky,
- b) nebo je v rámci skupiny Lepidoptera vyvinut mechanismus částečné kompenzace genové dávky, který u nadčeledi Bombycoidea dosáhl vyšší úrovně, tedy kompletní kompenzace genové dávky, a naopak byl zcela ztracen u čeledi Pyralidae.

U rodu *Danaus plexippus* (čeleď Nymphalidae) byly na jeho neopohlavním chromozomu Z nalezeny dva mechanismy kompenzace genové dávky. U ancestrální části odpovídající chromozomu Z ostatních motýlů byl pozorován mechanismus částečné kompenzace, zatímco u neo-Z části autozomálního původu je kompenzace genové dávky úplná. Existence dvou mechanismů kompenzace na jediném chromozomu byla velice překvapivá (Gu et al., 2019).

1.2.2 Chromozom W

Oproti chromozomu Z bylo na chromozomu W nalezeno velmi malé množství genů. Tazima (1964) pomocí pokusů s indukovanými translokacemi, delecemi a dalšími manipulacemi s chromozomem W identifikoval přibližnou polohu genu pro determinaci pohlaví zvaného *Fem* u *B. mori* (čeleď Bombycidae). U tohoto organismu byl dále nalezen gen *Esd* („egg-size-determining“) mající vliv na velikost vajíčka (Kawamura, 1988). Při pokusech na mutantech *Ephestia kuehniella* (čeleď Pyralidae) byl translokován fragment

chromozomu W nesoucí faktor zabraňující vývoji v samce (tzv. „*male-killing factor*“; Marec et al., 2001). U organismu *Antheraea pernyi* (čeleď Saturniidae) bylo nalezeno několik kopií jinak Z-vázanému genu *period*. Jedna varianta, *perW*, kóduje zkrácený protein, jiná pro změnu produkuje antisense RNA (Gotter et al., 1999).

Dalším rozdílem oproti chromozomu Z je vysoká míra heterochromatizace způsobená velkým počtem repetitivních sekvencí a mobilních elementů, tvořících většinu chromozomu W. Sahara (2003) využil metody komparativní genomové hybridizace (CGH) a srovnával rozdílně značené genomové sondy samic a samců u tří organismů, *B. mori*, *E. kuehniella* a *Galleria mellonella*. Ačkoli samičí celogenomová sonda obsahuje DNA chromozomu W, zatímco samčí nikoli, obě se vázaly na chromozom W. Na základě výsledků analýzy tak byly identifikovány dva druhy repetitivních sekvencí. První skupinou jsou repetitivní sekvence vyskytující se v rámci celého genomu, zatímco druhou skupinu tvoří W-specifické repetitivní sekvence. Známou vlastností repetitivních sekvencí je jejich rychlá evoluce, která je v případě chromozomu W podpořena potlačením rekombinace mezi chromozomem W a Z. Vítková (2007) využila CGH a mezidruhovou hybridizaci (Zoo-FISH) pro srovnání chromozomů W u několika zástupců čeledi Pyralidae. Pomocí Zoo-FISH srovnávala *E. kuehniella* se třemi různě fylogeneticky vzdálenými druhy, *Cadra cautella* a *P. interpunctella* a *Galleria mellonella*. Ačkoliv byla nalezena homologie odpovídající fylogenetické vzdálenosti jednotlivých druhů, CGH odhalila velké strukturální a molekulární rozdíly i mezi nejpříbuznějšími druhy. To poukazuje na dynamickou evoluci chromozomu W (Vítková et al., 2007; Sahara et al., 2012).

Z důvodu velkého množství repetitivních sekvencí bývá chromozom W vyloučen ze sekvenování genomu, kde by mohl způsobovat značné problémy v pozdějším skládání genomu (Traut et al., 2007; Sahara et al., 2012; Deakin et al., 2019). Abe (2005) pomocí RAPD markerů vybrali 14 W-specifických BAC klonů *B. mori* a osekvenovali je. Při skládání BAC-klonů se nepodařilo sestavit jeden ucelený kontig z důvodu velkého množství repetitivních sekvencí, ale bylo odhaleno mnoho LTR a non-LTR retrotranspozomů, retroposonů, DNA transposonů a jejich derivátů. V nejnovějších studiích u organismů jako je *Cydia pomonella* (čeleď Tortricidae), *Dryas iulia* (čeleď Nymphalidae) nebo *Kallima inachus* (čeleď Nymphalidae) se však podařilo pomocí různých sekvenačních strategií sestavit i chromozom W (Wan et al., 2019; Yang et al., 2020; Lewis et al., 2021). Yang et al. (2020) sekvenovali genom *Kallima inachus* (čeleď Nymphalidae)

včetně samičího pohlavního chromozomu. Jejich chromozomu W ukázala, že 67,89 % chromozomu je složeno z repetitivních sekvencí.

1.2.2.1 *Pohlavně specifický heterochromatin*

Pohlavní chromozomy mohou tvořit pohlavně specifický heterochromatin (jinak také nazývaný sex-chromatin). Lze jej pozorovat v interfázních samičích jádrech a odpovídá heterochromatinizovanému pohlavnímu chromozomu. Můžeme jej pozorovat u skupiny Mammalia (savci), kde se jedná o chromozom X, kdy k heterochromatizaci dochází v důsledku kompenzace genové dávky. U skupiny Lepidoptera odpovídá chromozomu W a bývá často používán jako nepřímý důkaz jeho výskytu v karyotypu zkoumaného organismu. Jeho absence však nemusí nutně značit i absenci chromozomu W (Traut & Marec, 1996; Šíchová et al., 2015; Hejníčková et al., 2021).

Heterochromatin může být pozorován v různých tkáních u larev i dospělců. Většina tkání obsahuje pouze jedno heterochromatinové tělísko kulovitěho tvaru, nehledě na úroveň ploidie dané tkáně (White 1973). Nejnapadnější je však ve vysoce polyploidních buňkách (Traut & Marec, 1996; Traut et al., 2007). V rámci skupiny Lepidoptera byly nalezeny i výjimky, například *E. kuehniella* má ve svých folikulárních a nutritivních buňkách více heterochromatinových tělísek, důvod však není znám (Traut et al., 2007). I u druhů s pohlavním chromozomem neo-W vzniklým fúzí, který má i euchromatinovou část, byl pozorován rozpad heterochromatinového tělíska na více menších. Jde například o *Orgyia antiqua* (čeleď Lymantriidae; Traut & Marec, 1997), ale stejný jev lze pozorovat i u mutantních linií *E. kuehniella*, nebo *B. mori*, u kterých došlo k indukovaným fúzím nebo translokacím mezi chromozomem W a autozomem (Marec & Traut, 1994; Yokoyama et al., 2000).

Heterochromatinové tělísko obsahuje několik tisíců kopií chromozomu W, a bylo proto využíváno jako zdroj W-specifické DNA. Po vyříznutí z interfázního jádra metodou laserové mikrodisekce může být použito jako barvící sonda pro fluorescenční *in situ* hybridizaci (Fuková et al., 2007; Vítková et al., 2007; Dalíková et al., 2017), nebo pro sekvenování. Traut (2013) sekvenoval DNA *E. kuehniella* (čeleď Pyralidae) získanou laserovou mikrodisekcí chromozomu W. Objevil mobilní elementy, mikrosatelity, nebo inserce mitochondriální DNA, nebyly však nalezeny žádné protein-kódující geny.

1.2.2.2 Vznik chromozomu W

Lukhtanov (2000) ve své starší práci zabývající se vznikem pohlavního chromozomu W zastával hypotézu vzniku chromozomu W u společného předka skupin Ditrysia a Tischeriidae a navrhoval dva možné způsoby jeho vzniku:

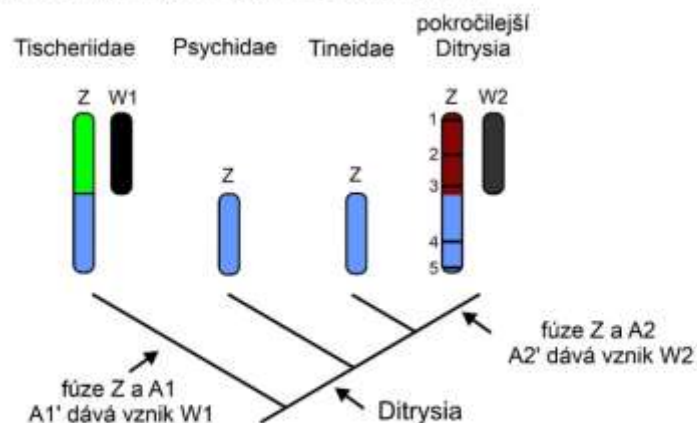
- a) fúzí ancestrálního pohlavního chromozomu Z s autozomem, dávající vznik systému neo-Z/W. Chromozom W by tak vznikl z autozomu (Traut & Marec, 1997; Lukhtanov, 2000),
- b) vznik nového pohlavního chromozomu W z nadpočetného chromozomu B (Lukhtanov, 2000).

Druhý způsob byl podporován sdíleným ancestrálním počtem chromozomů $n=31$ mezi neditrysijskými skupinami („non-ditryan group“) a skupinou Ditrysia. Při fúzi pohlavních chromozomů s některým autozomem je předpokládán pokles v počtu chromozomů (Lukhtanov, 2000).

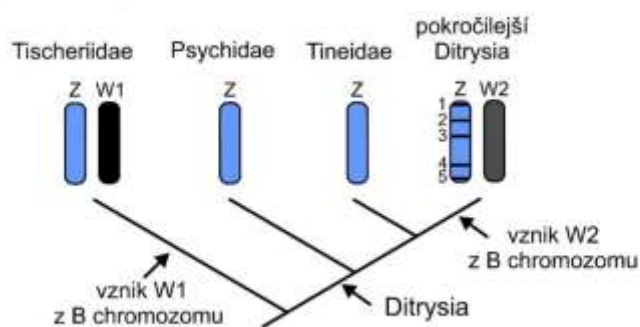
Oproti starším studiím (Lukhtanov, 2000; Traut et al., 2007; Sahara et al., 2012) Dalíková et al. (2017) vzala v potaz také absenci chromozomu W u bazálních ditrysijských linií Psychidae (Seiler 1959) a Tineidae (fylogenetické vztahy zobrazeny na obrázku 1). Dalíková et al. (2017) zdůrazňují, že informace o absenci W u Tineidae je zatím limitována studií na jednom jediném zástupci *Tineola bisselliella*. Za předpokladu, že linie Tineidae skutečně postrádá chromozom W, pak navrhuje hypotézu dvou nezávislých vzniků pohlavního chromozomu W u skupin Ditrysia a Tischeriidae, a to hned v několika variacích (obrázek 1):

- a) dvě fúze chromozomu Z s autozomem
- b) dva vzniky W z nadpočetného B chromozomu
- c) jedna fúze chromozomu Z s autozomem a vznik z B chromozomu

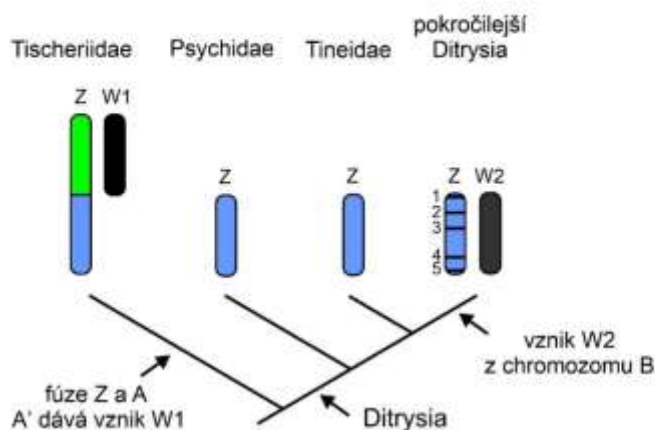
a) dvě fúze chromozomu Z s autozomem



b) dva vzniky W z nadpočetného B chromozomu



c) jedna fúze chromozomu Z s autozomem a vznik z B chromozomu



Obrázek 1: Zvažované varianty dvou nezávislých vzniků chromozomu W. **a** Dvě fúze chromozomu Z s autozomem dávající vznik chromozomům W, **b** dva vzniky chromozomu W z nadpočetného B chromozomu, **c** jedna fúze u linie Tischeriidae a jeden vznik z nadpočetného B chromozomu u pokročilejších skupin linie Ditrysia (Dalíková et al., 2017, upraveno).

Dalíková et al. (2017) se přiklání k hypotéze dvou nezávislých vzniků chromozomu W na základě výsledků jejich studie podporující syntenii Z-vázaných genů u skupiny Euheteroneura (Ditrysia a Tischeriidae). U linie Tischeriidae preferují hypotézu vzniku fúze chromozomu Z s autozomem. Té nahrává nižší počet chromozomů u Tischeriidae, a tedy je předpokládán výskyt chromozomálních fúzí. U linie Ditrysia naopak předpokládají vznik z chromozomu B.

Další zajímavou studii provedla Voleníková (2017), která identifikovala chromozom W u zástupců nadčeledi Hepialoidea („non-ditrysián“ linie), kde byl podle starších studií předpokládán systém ZZ/ZO (cf. Traut a kol. 2007, Sahara a kol. 2012). Ten byl však nepřímě určen pouze na základě absence heterochromatinového tělíska u samic. Na základě fylogenetických vztahů a počtů chromozomů v karyotypu Voleníková (2017) navrhuje možnost, že systém ZZ/ZW vznikl už u společného předka celé linie Hepialoidea a Ditrysia.

Fraïsse et al. (2017) provedli srovnávací studii mezi *Cameraria ohridella* (čeleď Gracillariidae, Ditrysia), *Nemophora degeerella* (čeleď Adelidae, neditrysián linie) a *Triodia sylvina* (Hepialidae, neditrysián linie) a na základě syntenie Z-vázaných genů zjištěné z genomických dat zavrhuje možnost fúze s autozomem a přiklání se ke vzniku chromozomu W z nadpočetného chromozomu B. Analýza osekvenovaného genomu u *Dryas iulia* (čeleď Nymphalidae, linie Ditrysia) zahrnující i chromozom W ukázala vysoký obsah repetitivních sekvencí a žádný genový obsah odpovídající chromozomu Z nebo jakýmkoliv autozomům, tudíž se autoři také přiklání k hypotéze vzniku W z chromozomu B (Lewis et al., 2021).

1.3 Neopohlavní chromozomy

U pohlavních chromozomů, stejně jako u autozomů, může docházet k různým chromozomálním přestavbám. Mezi tyto přestavby spadají transpozice pohlaví determinujícího genu z pohlavního chromozomu na autozom (Woram, 2003), nový vznik pohlaví determinujícího genu na autozomu (Tanaka et al., 2007), k translokaci mezi autozomem a pohlavním chromozomem (Yoshida et al., 2014), nebo k fúzi autozomu s pohlavním chromozomem za vzniku tzv. neopohlavních chromozomů (Charlesworth & Charlesworth, 1980). Takovéto chromozomy bývají poměrně mladé a nacházejí se v rané fázi procesu diferenciaci, tzn. jejich autozomální část ještě není plně degradovaná v důsledku potlačené rekombinace, a jsou proto vhodné pro zkoumání evoluce pohlavních chromozomů (Pala et al., 2012).

I u skupin, jako savci (Mammalia) nebo dvoukřídli (Diptera), u kterých byly pohlavní chromozomy podrobně studovány a považovány za stabilní, bylo zjištěno, že během vývoje jejich pohlavních chromozomů došlo k chromozomálním přestavbám (Vicoso & Bachtrog, 2013). U rodu *Drosophila* (řád Diptera) byl popsán opakovaný a nezávislý vznik neo-pohlavních chromozomů. Srovnávací analýzy neo-pohlavních chromozomů starých 0,1 milionu let (*D. albomicans*), 1 milion let (*D. Miranda*) a 15 milionů let (*D. pseudoobscura*) poskytují nevšední možnost studia molekulární evoluce pohlavních chromozomů (Bachtrog, 2013). U koljušky *Gasterosteus aculeatus* (třída Actinopterygii, řád Gasterosteiformes) byl analyzován neo-pohlavní chromozom X a bylo u ní zjištěno, že fúze pohlavního chromozomu s autozomem vedla k vazbě lokusů pro behaviorální izolaci a hybridní sterilitu, které společně vytváří reprodukční bariéru mezi dvěma blízké příbuznými sympatrickými druhy (Kitano et al., 2009).

Mongue et al. (2017) pomocí bioinformatických analýz odhalili neo-pohlavní chromozomy neo-Z a neo-W u rodu *Danaus* (čeleď Nymphalidae). Tento objev je inspiroval k cytogenetické analýze karyotypu *D. plexippus*. Odhalili, že samci i samice mají $n=30$ a pomocí metody GISH identifikovali chromozom W jako součást velkého páru chromozomů. Prostřednictvím CGH analyzovali molekulární kompozici pohlavního chromozomu neo-W, kde byla zjištěna vysoká míra přítomnosti repetitivních sekvencí. Dále tato metoda odhalila dvě oblasti lišící se strukturu chromozomu W, kdy dvě třetiny jsou heterochromatizovány a patrně představují ancestrální chromozom W a zbylá třetina je tvořena euchromatinem a patrně představuje zfúzovaný autozom. U chromozomu neo-Z byl prokázán vznik fúzí ancestrálního chromozomu Z s autozomem, který je homologní s chromozomem 16 u *B. mori* (čeleď Bombycidae). Stáří neopohlavního systému je na základě fylogenetických vztahů v kombinaci s přítomností neopohlavních chromozomů u zástupců r. *Danaus* odhadováno na 5 milionů let (Mongue et al., 2017).

U motýlů byl zjištěn častý vznik neopohlavních chromozomů. Traut (2007) ve své práci uvedl 40 druhů s identifikovaným karyotypem, z toho 12 mělo mnohonásobné pohlavní chromozomy, a mnohem více studií hlásí jejich výskyt v dalších zástupcích (Nguyen et al., 2013; Šíchová et al., 2015; Šíchová et al., 2016). Vznik neopohlavních chromozomů může být dvojího typu. Prvním je chromozomální rozpad ancestrálního chromozomu Z nebo W za vzniku Z_1Z_2W nebo ZW_1W_2 (Suomalainen, 1969a). Druhým je fúze nebo translokace autozomu s ancestrálním chromozomem Z nebo W za vzniku neo- ZW_1W_2 nebo neo- WZ_1Z_2 (Suomalainen, 1969b).

Vzniklé neopohlavní chromozomy mohou být zafixovány meiotickým drivem. Samičí meióza je asymetrická, tj. ze čtyř vznikajících buněk pouze jedna dává vznik vajíčku. Homologní chromozomy tak mezi sebou bojují o začlenění do vaječné buňky, což může být ovlivňováno meiotickým drivem, kdy dojde k nenáhodné segregaci chromozomů a je preferována jedna genetická varianta, např. nově vzniklý neopohlavní chromozom (Sandler & Novitski, 1957). Nguyen & Carabajal Paladino (2016) však zpochybňují roli meiotického drivu z důvodu holokinetické povahy chromozomů u motýlů. Jelikož u nich chybí centromera, kinetochor se váže po celé délce chromozomu, což může ovlivňovat meiotický drive (Pokorná et al., 2014). Podrobnější analýzy kinetochoru však ukázaly, že mikrotubuly se vážou jen na 30-70% povrchu chromozomu (Wolf, 1994), což ukazuje spíše na absenci meiotického drivu (Nguyen & Carabajal Paladino, 2016). Za hlavní hnací sílu evoluce neo-pohlavních chromozomů je některými autory navrhována selekce. Z-vázané geny hrají velkou roli v prezygotických a postzygotických reprodukčních bariérách (viz kapitola 1.2.1.). Nguyen et al. (2013) ve své studii na *Cydia pomonella* (čeleď Tordicidae) ukázali, že díky fúzi mezi autozomem (odpovídající chromozomu 15 u *B. mori*) a chromozomem Z se dostaly do vazby geny významně přispívající k adaptaci na prostředí a reprodukční izolaci.

1.4 *Bombyx mori*

Bourec morušový, *Bombyx mori* (čeleď Bombycidae), je významný modelový organismus z řádu Lepidoptera. Má velký ekonomický význam jakožto producent hedvábí. Byl vyšlechtěn ze svého divokého příbuzného *Bombyx mandarina* (čeleď Bombycidae). Po dobu cca 5000 let byl vystavován přímé selekci pro vlastnosti zvyšující produkci a kvalitu hedvábí. Důsledkem domestikace se stal jediným organismem v rámci hmyzu, který je při rozmnožování zcela odkázán na člověka (Wurm, 2003; Goldsmith, 2010).

Bourec morušový byl mnoho let modelovým organismem pro biologii motýlů, během dvacátého století se však stal objektem zájmu i v oblasti genetiky. Bylo nalezeno několik spontánních mutací v chovných liniích, jiné vznikly křížením s nejbližším příbuzným *B. mandarina* se kterým stále dokáže produkovat plodné hybridní potomstvo (Goldsmith, 2010). V chovných centrech nacházejících se v Číně, Japonsku, Koreji nebo Indii jsou udržovány stovky různých linií, dělených dle geografické příslušnosti a různých vlastností týkajících se ekonomické prospěšnosti dané linie. Mezi takové vlastnosti patří adaptace k masovému chovu, odolnost vůči virům, množství a kvalita vyprodukovaného hedvábného vlákna nebo fertilita (Sohn, 2002). Dále jsou chovány i linie s různými

morfológickými, behaviorálními či biochemickými odlišnostmi (Goldsmith, 2010). Bourec morušový byl také součástí různých pokusů využívajících radiace způsobující přestavby chromozomů. Podařilo se přenést viditelné morfológické znaky vajíček, larev nebo kokonů, z autozomů na chromozom W. Takovéto mutantní linie byly poté využívány pro třídění pohlaví („autosexing“) v hedvábnictví („sericulture“; Tazima, 1964, Nagaraju, 1996, Fujii et al., 2006).

Haploidní počet chromozomů *B. mori* je $n=28$ (de Prins & Saitoh, 2003) a má chromozomální systém ZZ/ZW. Chromozom W nese již dříve zmiňovaný gen *Fem* podmiňující determinaci samičího pohlaví (Abe et al., 2008; viz kapitola 1.2. a 1.2.2.2.). Na chromozomu Z můžeme najít geny s morfológickými efekty jako je *Vg* („vestigial“) negativně ovlivňující vývoj křídel, *Spli* („soft and pliable“) způsobující měkkost těla larvy, *Md* („muscle dystrophy“) vedoucí k dystrofii svalů zodpovědných za mávání křídlů, nebo *Od* („distinct oily“), což je mutace v ukládání kyseliny močové v pokožce larvy a způsobující tak její průhlednost připomínající papír politý olejem (Fujii et al., 2010).

B. mori byl po *D. melanogaster* (Adams et al., 2000) druhým osekvenovaným organismem v rámci hmyzu. První sekvenování samčího genomu *B. mori* provedly dvě nezávislé skupiny z Japonska a Číny (Mita et al., 2004; Xia et al., 2004). Výsledná data obou skupin byla později integrována (The International Silkworm Genome Consortium, 2008). S příchodem sekvenování nové generace byl genom *B. mori* znova osekvenován pomocí technologií Illumina a PacBio. V této verzi byly díky dlouhým čtením opraveny některé chyby a doplněny neosekvenované úseky („gaps“). Výsledkem je sekvence genomu sestávající z 696 „scaffoldů“, se statistikou $N50 = 16.8$ Mb (Kawamoto et al., 2019).

1.4.1 Mutantní linie TWPB

Tazima (1941, citováno v Tanaka, 2000 a Yokoyama et al., 2003) objevil linii *Bombyx mori* s mutací pro „sable“ mutantní zbarvení larvy („sable larval marking“) značenou p^{Sa} translokovanou na pohlavní chromozom W z chromozomu 2, který je nositelem mutantního lokusu p pro zbarvení larvy. Tazima (1942, 1943, 1944, citováno v Tanaka, 2000) poté tuto linii podrobil rentgenovému ozařování, kdy díky postupným delecím získal linii s normálním zbarvením ($+^p$) vázaným na chromozom W. Tato linie přišla o značný kus translokovaného chromozomu 2. Spontánně z ní poté vznikly linie s pohlavně vázanou mutací pro „moricaud“ mutantní zbarvení larvy („moricaud larval marking“) p^M

(Tazima, 1955, citováno v Tanaka, 2000 a Sreekumar et al., 2010) a s černým zbarvením larvy p^B (Sasaki, 1955, citováno v Tanaka, 2000 a Yokoyama et al., 2003).

Tanaka et al. (2000) objevili u linie p^B s pohlavně vázanou mutací pro černé zbarvení larvy (*TWPB*) snížený počet haploidních chromozomů $n=27$ a nezvykle velký bivalent ve fázi pachytene. Dále byl pozorován rozpad heterochromatinové tělíska na několik menších. Analýzy pozorovaného bivalentu odhalily, že se jedná o neopohlavní chromozom vzniklý fúzí se dvěma autozomy, konkrétně fragmentem chromozomu 2 a s chromozomem 5, řazené v tomto pořadí.

2 Cíle práce

Pohlavní chromozom W nebyl v rámci genomového projektu *Bombyx mori* sekvenován (Mita, 2004; Xia et al., 2004; The International Silkworm Genome Consortium, 2008), kvůli vysokému obsahu repetitivních sekvencí, které by mohly ztěžovat následné skládání genomu („genome assembly“). Znalost molekulárního složení pohlavního chromozomu W je však důležitá k pochopení evoluce pohlavních chromozomů (cf. Tomaszekiewicz et al., 2017).

W-specifická DNA pro sekvenování může být získána metodou laserové mikrodisekce heterochromatinového tělíska v samičích interfázních jádrech (Fuková et al., 2007; Traut et al., 2013). Tato metoda však může být těžko uchopitelná u organismů s neopohlavními chromozomy, kde bývá často pozorován rozpad heterochromatinového tělíska. Alternativou k laserové mikrodisekci může být třídění chromozomů pomocí průtokové cytometrie („flow-sorting“), které funguje na principu rozlišení chromozomů dle velikosti a obsahu GC bazí. Nevýhodou této metody je, že chromozomy podobné velikosti, nebo fragmenty chromozomů, nemusí být jednoznačně rozlišeny a mohou tak být tříděny jako jeden chromozom (Tomaszekiewicz et al., 2017). Motýli mají uniformní chromozomy malé velikosti, proto pro ně za normálních okolností není průtoková cytometrie vhodnou metodou pro získávání W-specifické DNA. U mnoha motýlů byl však pozorován nápadně velký chromozomální pár, často identifikovaný jako neopohlavní chromozomy vzniklé fúzí (Tanaka et al., 2000; Nguyen et al., 2013; Mongue et al., 2017). U těchto druhů by metoda průtokové cytometrie mohla být užitečným nástrojem pro studium pohlavních chromozomů.

Cílem této práce je pomocí cytogenetické analýzy ověřit přítomnost neo-W chromozomu u mutantní linie *TWPB* bource morušového *Bombyx mori* (čeleď Bombycidae).

3 Metody

3.1 Materiály

Mutantní linie *TWPB* bource morušového *Bombyx mori* s pohlavně vázanou mutací pro zbarvení larvy byla získána od prof. Yokoyama (Tokyo University of Agriculture and Technology, Japonsko). Housenky byly po vylíhnutí krmeny na listech moruše. Dospělci byly ručně spáření a samičky nechány vyklást na filtrační papír.

U diapauzních vajíček byl použit protokol pro přerušení diapauzy s využitím kyseliny chlorovodíkové („hot acid treatment“). Vajíčka byla inkubována v kyselině chlorovodíkové o hustotě $1,11 \text{ g.cm}^{-3}$ (odpovídá 15%, Perelman, 1999), která byla připravena ze zásobní 35% kyseliny chlorovodíkové (odpovídá hustotě $1,26 \text{ g.cm}^{-3}$, Perelman, 1999). Zředěná kyselina byla předeřhřata na 46°C ve vodní lázni. Vajíčka na filtračním papíru a byla vložena do kyseliny a inkubována 5 minut. Následně byla vajíček promývána pod tekoucí vodou po dobu 20 minut. Po oschnutí se larvy bourců z vajíček začaly líhnout po 18 dnech.

3.2 Příprava chromozomálních preparátů

Larvy bource byly 3. den 5. (posledního) instaru pitvány ve fyziologickém roztoku (Glaser 1917 cit. v Lockwood, 1961); 0,9% NaCl, 0,042% KCl, 0,025% CaCl_2 , 0,02% NaHCO_3) a poté z nich byly připraveny chromozomální preparáty podle Mediouni (2004) metodou roztěru („spreading“) na histologické ploténce. Ovaria ze samic byla fixována ve fixáži (etanol, chloroform a kyselina mravenčí v poměru 6:3:1) po dobu 10 minut. Na podložní sklíčko očištěné kyselým ethanolem (1% HCl v etanolu) byla přidána kapka 60% kyseliny octové a wolframovou jehlou do ní byly přeneseny jednotlivé ovariooly, které byly následně wolframovou jehlou macerovány. Suspenze byla poté rozetřena po podložním sklíčku na histologické ploténce zahřáté na 45°C . Následovalo odvodnění v ethanolové řadě (70%, 80%, 100%) po dobu 30 sekund. Preparáty byly skladovány v -80°C do dalšího použití.

3.3 *Izolace genomové DNA*

Z dospělců bource byla extrahována gDNA pomocí cetyltrimetylamoniumbromidu (CTAB) dle protokolu Winnepenninckx a kol. (1993). Byla provedena homogenizace tkáně a její následná inkubace 15-17 h při teplotě 37 °C v extrakčním pufru (0,1 g tkáně/2,5 ml extrakčního pufru) obsahujícího 2% CTAB, 100 mM Tris-HCl (pH 8), 40 mM EDTA, 1,4 M NaCl, 0,2% β-merkaptoetanol a 0,1 mg/ml proteinázu K. Po inkubaci byl lyzát promíchán se stejným objemem chloroformu a výsledná směs byla centrifugována 15 min při 9000 rpm a teplotě 4 °C. Vodná fáze obsahující gDNA byla opatrně odpipetována do nové zkumavky. Byla přidána RNáza A do výsledné koncentrace 50 mg/ml extrakčního pufru. Následovala inkubace při 37 °C po dobu 30 min. Poté byly ke směsi ve zkumavce přidány 2/3 objemu isopropanolu a DNA byla precipitována po dobu 2 h při pokojové teplotě. Vysrážená DNA byla 15 min centrifugována při teplotě 4 °C, 9 000 rpm. Poté byl pelet 2x promyt 70% ethanolem a následně rozpuštěn ve vodě. Pomocí Qubit 3.0 fluorometru (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) byla změřena koncentrace izolované DNA a byla provedena kontrola kvality pomocí spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, USA).

3.4 *Značení hybridizačních sond*

Izolovaná gDNA byla fluorescenčně značena metodou „nick translace“ fluorochromem Cy3-dUTP (Jenna Bioscience, Jena, Germany). Značící reakce o objemu 40 µl obsahovala 2 µg DNA, 1x nick translační pufr (5 mM Tris-HCl, 0,5 mM MgCl₂, 0,0005% BSA; pH 7,5), 10 mM β-merkaptoetanol, 50 µM dATP, 50 µM dCTP, 50 µM dGTP, 10 µM dTTP, 20 µM Cy3-dUTP, 40 U DNA polymerázy I (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a 0,01 U DNázy I. Značící reakce gDNA byla inkubována po dobu 3,5 hodiny v 15°C. Poté byl pro zastavení reakce přidán 10x koncentrovaný nanášecí („loading“) pufr (50% glycerol, 250 mM EDTA, 5,9 mM bromphenol blue).

3.5 *Genomová in situ hybridizace*

Genomová *in situ* hybridizace byla použita pro detekování chromozomu W. Využívá fluorescenčně značených celogenomových sond hybridizovaných spolu s nadbytkem samčí gDNA (Mediouni et al., 2004). Prvním krokem bylo ošetření preparátů roztokem RNázy A (100 µg/ml) po dobu 1 h v 37°C a následné blokování v 5x Denhartovo reagens (7 ml 50x Denhart's solution, obsahující 1% Ficoll, 1% polyvinylpyrrolidone a 1% hovězí sérový albumin; + 63 ml vody) ve vodní lázni vyhřáté na 37°C. Poté byly preparáty denaturovány

70% formamidem v 2x SSC po dobu 3,5 min při teplotě 68°C, a nakonec byly odvodněny ve studeném 70 % etanolu 1 min s následným dokončením etanolové řady (po 30 s v 80% a 100% etanolu).

Druhým krokem byla příprava hybridizační směsi. Ta obsahovala 300 ng samičí značené sondy, kompetitorovou DNA (3 µg samčí gDNA) a 25 µg sonikované DNA z lososích spermii (Sigma-Aldrich). Samčí gDNA byla před přidáním do hybridizační směsi fragmentována inkubací v 99°C po dobu 20 min. Hybridizační směs byla vysrážena přidáním 1/10 objemu 3 M octanu sodného a 2,5 násobku objemu ledového 100% etanolu a poté centrifugována při 4°C po dobu 20 min na 14 000 rpm. Poté byla promyta studeným 70% etanolem. Takto vysrážená DNA byla rozpuštěna v 50% deionizovaném formamidu a 10% dextran sulfátu v 2x SSC po dobu 30-45 min za teploty 37°C a následně denaturována po dobu 5 min v 90°C a poté okamžitě zchlazena na ledu.

Třetím krokem byla samotná hybridizace. Na denaturované preparáty byla přidána hybridizační směs o objemu 10 µl a preparát byl přikryt krycím sklem (24 x 50 mm). To bylo překryto kaučukovým lepidlem Fixogum (Marabuwerke GmbH, Tamm, SRN). Hybridizace probíhala po dobu 3 dnů v teplotě 37°C ve vlhké komůrce. Poté bylo lepidlo odstraněno a preparáty byly namočeny do 1% Tritonu X-100 v 0,1x SSC. Následovalo praní v 1% Tritonu X-100 v 0,1x SSC přehřátém na teplotu 62 °C po dobu 5 min a v 1% Ilfotolu (Ilford) po dobu 2 minut. Preparáty byly barveny DAPI (2-(4-amidinophenyl)-1H-indole-6-carboxamidin) v DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan) o koncentraci 0,5 µg/ml. Preparát byl překryt krycím sklem (24 x 50 mm) a zafixován lakem na nehty.

3.6 Zpracování fotografií a měření chromozomů

Hybridizační experimenty byly dokumentovány pomocí fluorescenčního mikroskopu Leica DM6 (Leica Microsystems, Wetzlar, Německo) vybaveného černobílou kamerou Andor Zyla sCMOS (Oxford Instruments, Abingdon, Anglie) a systémem THUNDER Imager (Leica Microsystems).

Černobílé fotografie byly barveny v Adobe Photoshop Elements 2021, červeně pro signály samičí hybridizační sondy značené Cy3 a světle modře pro DAPI. Měření délky chromozomů bylo provedeno pomocí softwaru ImageJ (Scheiner, 2012).

4 Výsledky

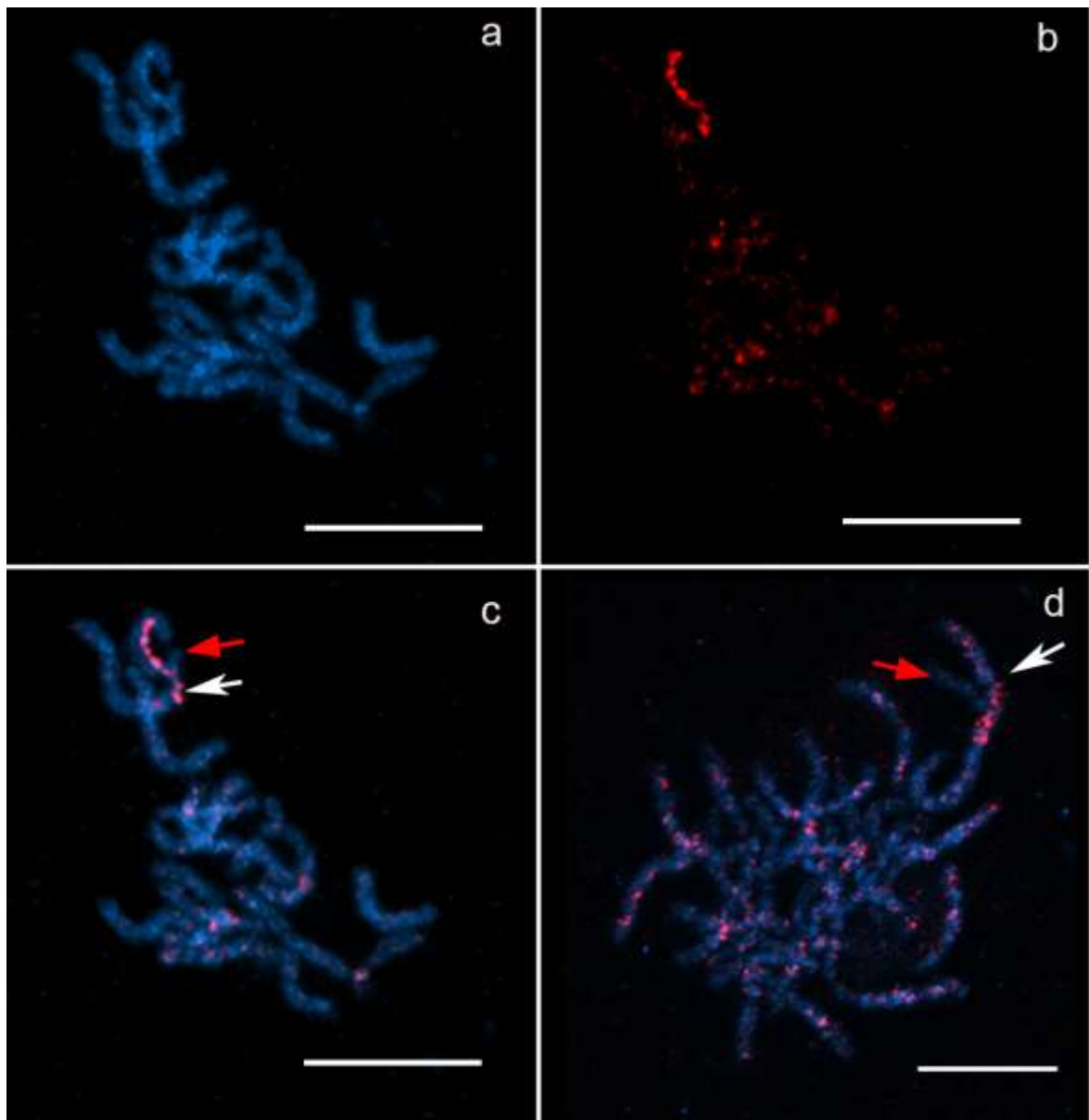
Pro ověření přítomnosti neopohlavního chromozomu W u mutantní linie *TWPB* bource morušového *Bombyx mori* (čeleď Bombycidae) byla využita metoda genomové *in situ* hybridizace (GISH, obrázek 2a-d). Na samičí chromozomální preparáty byla hybridizována samičí genomová sonda společně s nadbytkem neznačené samčí kompetitorové gDNA. Sonda zvýraznila 46,2 % (SD = 0,05) dlouhého chromozomu, odpovídající ancestrálnímu chromozomu W. Celogenomová sonda označila také krátké úseky na většině chromozomů, které pravděpodobně odpovídají repetitivní DNA. Na pohlavním chromozomu W zpravidla nebyl pozorován výraznější signál po barvení DAPI. Dále bylo pozorováno nedokonalé párování pohlavních chromozomů (obrázek 2 c, d), kdy chromozom Z charakteristicky „odstával“ od chromozomu W.

Byly spočítány pachytení chromozomové páry ze tří jader a následně byla změřena jejich délka (tabulka 1 a tabulka 2 v příloze). V komplementu bylo pozorováno 27 chromozomových párů. Chromozom neo-W průměrně zaujímal 7,23 % z celkové délky všech chromozomů v komplementu (směrodatná odchylka SD = 0,442), což při délce 530 Mbp odpovídá 38,319 Mbp (Tabulka 1). Neopohlavní chromozom W se díky fúzi oproti ancestrálnímu chromozomu W zvětšil 2,187x (SD = 0,218).

Tabulka 1: Metrická analýza pohlavního chromozomu W ze tří pachyteních jader.

	jádro 1	jádro 2	jádro 3
délka komplementu (μm)	223,560	203,273	162,951
délka pohl. chromozomů (μm)	14,911	14,785	12,630
ancestrální W* (μm)	7,921	6,176	5,524
podíl pohl. chr. v komplementu (%)	6,67	7,27	7,75
průměrný podíl pohl. chr. v komplementu (%) ± SD	7,23±0,442		

* oblast chromozomu W značená GISH



Obrázek 2: Genomová *in situ* hybridizace na samičích pachyteních komplementech. **a** Chromozomy byly podbarveny DAPI (modrá), DAPI pozitivní heterochromatin na chromosomu W byl spíše výjimkou, **b** Samičí genomová sonda byla značena fluorochromem Cy3 (červená), **c, d** Překryté signály DAPI a celogenomové sondy. Bílá šipka ukazuje na signál samičí sondy označující ancestrální část chromozomu W. Červená šipka ukazuje na „odstávající“ chromozom Z. Měřítko 10 μm .

5 Diskuze

Cílem této práce bylo potvrdit přítomnost neopohlavního chromozomu W u mutantní linie *TWPB* modelového organismu *Bombyx mori*. U normální linie („wild type“) bylo v pachytene zaznamenáno $n = 28$ chromozomových párů. Pohlavní bivalent bývá přibližně stejné velikosti jako ostatní chromozomové páry, kdy tvoří přibližně 3,62 % z celkové délky všech chromozomů v komplementu ($SD = 0,376$) odpovídající 19,175 Mbp (Yoshido et al., 2005). Genomová *in situ* hybridizace označila u normální linie chromozom W po celé jeho délce (Sahara et al., 2003). GISH se samičí sondou však v pachyteních komplementech samic linie *TWPB* zvýraznila pouze 46,2 % ($SD = 0,050$) pohlavního chromozomu W, který patrně odpovídá ancestrálnímu chromozomu W. U tří jader byl stanoven počet spárovaných pachyteních chromozomů a jejich délky (tabulka 1 a tabulka 2 v příloze). Celkem bylo pozorováno $n = 27$ spárovaných chromozomů. Pohlavní chromozomy průměrně zaujímaly 7,23 % z celkové délky pachyteního komplementu ($SD = 0,442$) odpovídající 38,319 Mbp. Byly tedy o 19,144 Mbp větší než WZ bivalent divoké linie, což potvrzuje fúzi ancestrálního chromozomu W s autozomem. Dle Tanaka (2000) došlo u linie *TWPB* k fúzi mezi chromozomem W, fragmentem chromozomu 2 a chromozomem 5. Během udržování této linie bylo však pozorováno odlomení chromozomu 5 a později jeho opětovné připojení (prof. Yokoyama, osobní sdělení). Tento jev byl pozorován i u mutantních linií *E. kuehniella*, kde docházelo k rozpadu neopohlavních chromozomů a poté k opětovným fúzím vzniklých fragmentů, někdy i s jinými autozomy (Traut, 1986). Pro ověření současného složení neopohlavního chromozomu W u *TWPB* linie bource je tak třeba provést další analýzy.

Fyzické mapování sond připravených z umělých bakteriálních chromozomů (BAC), tzv. BAC-FISH, může odhalit složení neopohlavního chromozomu W. BAC-FISH mapování bylo provedeno na mutantní linii bource *ZWII*, kde se podařilo identifikovat všech 28 bivalentů a přiřadit je k vazebné skupině a sestavit tak kompletní karyotyp. BAC-FISH se tak prokázala jako vhodná metoda pro karyotypování u organismů pro které nefungují klasické proužkovací metody (Yoshido et al., 2005). Později např. u *Cydia pomonella* (čeleď Tortricidae) byla tato metoda použita pro analýzu neo-pohlavního chromozomu Z, u kterého byla předpokládána translokace autozomální oblasti nesoucí lokus kontrolující rezistenci vůči insekticidům v rámci čeledi Tortricidae (Heckel, 1998). Nguyen et al. (2013) tak provedli BAC-FISH mapování u *C. pomonella*, které potvrdilo fúzi mezi chromozomem Z a autozomem odpovídající chromozomu 15 v referenčním genomu *B. mori*.

V této studii bylo na některých chromozomálních samičích preparátech z *B. mori* linie *TWPB* pozorováno neúplné párování pohlavních chromozomů (viz obrázek 2 c, d). U této linie pohlavní chromozom neo-W tvoří multivalent s chromozomem Z a 5. Neúplné párování může být způsobeno zpožděným párováním ve fázi pachytene. Takový jev pozoroval i Kawamura (1991) u *B. mori* mutantní linie Sy s pohlavně vázanou mutací pro žluté zbarvení kokonu („sex-limited yellow cocoon“) způsobenou translokací velkého fragmentu chromozomu 2. V rané fázi pachytene popsal zpožděné párování chromozomu neo-W s chromozomem Z a chromozomem 2. Pokud se fragment chromozomu 2 translokovaný na chromozom W nespároval se svým homologem, vytvořil později smyčku. Podobně bylo pozorováno u mutantní linie *E. kuehniella* neúplné párování nebo párování fragmentovaných částí chromozomu W se sebou samými z důvodu jejich různé velikosti (Traut et al., 1986).

Ke studiu párování multivalentů byla úspěšně použita fluorescenční *in situ* hybridizace s (TTAGG)_n telomerickou sondou (telo-FISH). Telomerická repetice TTAGG je konzervovaná u mnoha řádů z třídy Insecta (hmyz; Okazaki et al., 1993; Sahara et al., 1999) a bývá využívána pro zvýraznění koncových oblastí chromozomů. Toho může být využito při detekci multivalentů pohlavních chromozomů, kde telomerická sonda označuje konce chromozomů (Yoshido et al., 2005). Zvýraznění telomer jednotlivých chromozomů v kombinaci s GISH poskytuje pak lepší rozlišení konstituce pohlavních chromozomů. Yoshido et al. (2005) pomocí této metody rozlišil konstituci pohlavních chromozomů u *Antheraea yamamai* (čeleď Saturniidae), *Orgyia antiqua* a *O. thyellina* (čeleď Lymantriidae). Zatímco u *A. yamamai* byl pozorován plně diferenciovaný bivalent ZW, u *O. antiqua* byla identifikována konfigurace neo-W neo-Z, pravděpodobně vzniklá fúzí obou pohlavních chromozomů s autozomálním párem. Tomu nasvědčuje i euchromatinová struktura části chromozomu, která nebyla detekována metodou GISH. U *O. thyellina* byla pozorována konstituce neo-ZW₁W₂, která patrně vznikla rozpadem původního neo-W v diferencované oblasti.

V této studii nebyl zpravidla na chromozomu W po barvení DAPI pozorován heterochromatin (s výjimkou jednoho jádra, viz obrázek 2a) typický pro mnoho druhů motýlů. Toto pozorování je v rozporu se Sahara et al. (2003), kde DAPI pozitivní blok u *B. mori* byl jednou z navrhovaných metod pro identifikaci pohlavního bivalentu. Autoři podotýkají, že heterochromatin chromozomu W je rozptýlen při použití hypotonického roztoku při přípravě chromozomálních preparátů. Hypotonický roztok však během tvorby

chromozomálních preparátů pro tuto studii použit nebyl. Traut et al. (2019) analyzovali strukturu chromatinu a aktivitu pohlavních chromozomů u *B. mori* a ukázali, že chromozom W je ve fázi pachytene umlčen pomocí epigenetické modifikace histonu H3, H3K9me2. Ve fázi postpachytene je však transkripčně aktivní. Vzhledem k velkému množství repetitivních sekvencí a absenci protein kódujících genů na chromozomu W (Abe et al., 2005; Traut et al., 2013) je tento jev vysvětlován tzv. neplánovanou transkripcí a/nebo transkripcí nekódující RNA (Traut et al., 2019). U druhů s mladými neo-pohlavními chromozomy, jako je *Orgyia spp.*, byl pozorován rozpad heterochromatinového tělíska v interfázních samičích jádrech (Traut & Clarke, 1997). Důvodem je pravděpodobně transkripční aktivita zfúzovaných autozomálních částí neo-pohlavních chromozomů, které narušují jinak epigeneticky inaktivované heterochromatinové úseky a způsobují rozpad heterochromatinových tělísek (Traut & Marec, 1996). Stejně by mohla být vysvětlena nepřítomnost heterochromatinu po barvení DAPI na neopohlavním chromozomu W mutantní linie *TWPB B. mori*.

Chromozom W je považován za důležitý pro fertilitu a fitness samic. Na chromozomu W se nachází gen *Fem* který je prekurzorem piRNA podílející se na určení pohlaví (viz kapitola 1.2.). U mutantní linie *KG B. mori* byla pozorována W-vázaná mutace genu *Fem* způsobující maskulinizaci externích genitálií a vznik abnormalit u ovárií (Fujii et al., 2009). Podobného fenotypového projevu bylo docíleno u transgenních samic bource s expresí samčí verze genu *Bmdsx* (Suzuki et al. 2005). U těchto mutantních samic byla často pozorována nepřítomnost vajíček v ovariolách. Takovéto mutace mohou být dobrým zdrojem pro analyzování mechanismu determinace pohlaví u *B. mori* (Fujii et al., 2010). Chromozom neo-W mutantní linie *TWPB* je díky vzniklé fúzi přibližně 2,187x větší než ostatní chromozomy v karyotypu ($SD = 0,218$). Toho lze využít pro třídění chromozomů průtokovou cytometrií, kterou u nemutantních linií bource nelze použít z důvodu uniformity chromozomů (Yoshido et al., 2005). Průtoková cytometrie je v současnosti využívána hlavně pro třídění mitotických chromozomů u rostlin (Doležel et al., 2021), které pak mohou být využity na další analýzy, např. sekvenování jednotlivých chromozomů (Mayer et al., 2011; Martis et al., 2013). Sortováním bychom tak mohli zvýšit zastoupení pohlavního chromozomu W ve vzorku a snížit tak jeho komplexitu, což by mělo usnadnit následné bioinformatické analýzy (Tomaszkiewicz et al., 2017). Původně autozomální části neopohlavního chromozomu W mohou být srovnány s odpovídajícími autozomy a může být určena jejich míra degenerace. Sekvence chromozomu W i v nejnovější verzi genu bource

stále chybí (Kawamoto et al., 2019). Znalost sekvence chromozomu W by mohla být přínosem pro hledání protein-kódujících genů nebo rekonstrukci transpozonů a identifikaci pohlavně specifických markerů (Fuková et al., 2009; Traut et al., 2013).

6 Závěr

Cytogenetická analýza potvrdila přítomnost neopohlavního chromozomu W u mutantní linie *TWPB* bource morušového *Bombyx mori*. Přítomnost neopohlavního chromozomu W vzniklého fúzí podporuje snížený počet chromozomových párů $n=27$ v samičích pachyteních jádrech oproti $n=28$ typickým pro normální linii. Genomová *in situ* hybridizace zvýraznila ancestrální část chromozomu W odpovídající zhruba polovině chromozomu a potvrdila tak fúzi s autozomem. Metrická analýza ukázala, že chromozom neo-W představuje 7,23 % (SD = 0,442) z celkové délky všech chromozomů v komplementu, což odpovídá 38,319 Mbp. Velikost neopohlavního chromozomu se ve srovnání s ancestrálním chromozomem W zvětšila 2,187x (SD = 0,218).

7 Bibliografie

- Abe, H., Fujii, T., Tanaka, N., Yokoyama, T., Kakehashi, H., Ajimura, M., Mita, K., Banno, Y., Yasukochi, Y., Oshiki, T., Neno, M., Ishikawa, T., & Shimada, T. (2008). Identification of the female-determining region of the W chromosome in *Bombyx mori*. *Genetica*, 133(3), 269-282.
- Abe, H., Mita, K., Yasukochi, Y., Oshiki, T., & Shimada, T. (2005). Retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Cytogenetic and Genome Research*, 110(1-4), 144-151.
- Adams, M., Celniker, S., Holt, R., Evans, C., Gocayne, J., Amanatides, P., Scherer, S., Li, P., Hoskins, R., Galle, R., George, R., Lewis, S., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S., Sutton, G., Wortman, J., Yandell, M., Zhang, Q. et al. (2000). The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287(5461), 2185-2195.
- Arnold, A., Itoh, Y., & Melamed, E. (2008). A bird's-eye view of sex chromosome dosage compensation. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 9(1), 109-127.
- Bachtrog, D. (2013). Y-chromosome evolution: emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration. *Nature Reviews Genetics*, 14(2), 113-124.
- Baxter, S., Davey, J., Johnston, J., Shelton, A., Heckel, D., Jiggins, C., Blaxter, M., & Ingvarsson, P. (2011). Linkage mapping and comparative genomics using next-generation RAD sequencing of a non-model organism. *PLoS ONE*, 6(4).
- Blackmon, H., Ross, L., & Bachtrog, D. (2016). Sex determination, sex chromosomes, and karyotype evolution in insects. *Journal of Heredity*, 108(1), 78-93.
- Brown Jr, K., Von Schoultz, B., & Soumalainen, E. (2004). Chromosome evolution in Neotropical Danainae and Ithomiinae (Lepidoptera). *Hereditas*, 141(3), 216-236.
- Carabajal Paladino, L., Provazníková, I., Berger, M., Bass, C., Aratchige, N., López, S., Marec, F., Nguyen, P., & Barluenga, M. (2019). Sex chromosome turnover in moths of the diverse superfamily Gelechioidea. *Genome Biology and Evolution*, 11(4), 1307-1319.
- Dalíková, M., Zrzavá, M., Hladová, I., Nguyen, P., Šonský, I., Flegrová, M., Kubíčková, S., Voleníková, A., Kawahara, A., Peters, R., & Marec, F. (2017). New insights into the evolution of the W chromosome in Lepidoptera. *Journal of Heredity*, 108(7), 709-719.
- de Prins, J., & Saitoh, K. (2003). 17. Karyology and sex determination. *Band 4: Arthropoda, 2 Hälfte: Insecta, Lepidoptera, Moths and Butterflies, Teilband/Part 36, Vol 2: Morphology, Physiology, and Development*, 449-468.

- Deakin, J., Potter, S., O'Neill, R., Ruiz-Herrera, A., Cioffi, M., Eldridge, M., Fukui, K., Marshall Graves, J., Griffin, D., Grutzner, F., Kratochvíl, L., Miura, I., Rovatsos, M., Srikulnath, K., Wapstra, E., & Ezaz, T. (2019). Chromosomics: Bridging the gap between genomes and chromosomes. *Genes*, 10(8), 627.
- Doležel, J., Lucretti, S., Molnár, I., Cápál, P., & Giorgi, D. (2021). Chromosome analysis and sorting. *Cytometry Part A*, 99(4), 328-342.
- Dopman, E., Perez, L., Bogdanowicz, S., & Harrison, R. (2005). Consequences of reproductive barriers for genealogical discordance in the European corn borer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(41), 14706-14711.
- Dopman, E., Bogdanowicz, S., & Harrison, R. (2004). Genetic mapping of sexual isolation between E and Z pheromone strains of the European corn borer (*Ostrinia nubilalis*). *Genetics*, 167(1), 301-309.
- Fraïsse, C., Picard, M., & Vicoso, B. (2017). The deep conservation of the Lepidoptera Z chromosome suggests a non-canonical origin of the W. *Nature Communications*, 8(1).
- Fujii, T., Tanaka, N., Yokoyama, T., Ninaki, O., Oshiki, T., Ohnuma, A., Tazima, Y., Banno, Y., Ajimura, M., Mita, K., Seki, M., Ohbayashi, F., Shimada, T., & Abe, H. (2006). The female-killing chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*, was generated by translocation between the Z and W chromosomes. *Genetica*, 127(1-3), 253-265.
- Fujii, T., Daimon, T., Abe, H., Katsuma, S., & Shimada, T. (2009). Newly identified mutation of the W-linked female determinant gene causing masculinization of the female in the silkworm, *Bombyx mori*. In Proceedings of the 60th Meeting of the Japanese Society of Sericulture Science Kanto Branch, Tokyo, Japan (p. 22).
- Fujii, T., Abe, H., & Shimada, T. (2010). Molecular analysis of sex chromosome-linked mutants in the silkworm *Bombyx mori*. *Journal of Genetics*, 89(3), 365-374.
- 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.
- Funaguma, S., Suzuki, M., Tamura, T., & Shimada, T. (2005). The Bmdsx transgene including trimmed introns is sex-specifically spliced in tissues of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Science*, 5(1).
- Goldsmith, M. (2010). Recent Progress in Silkworm Genetics and Genomics. In M. Goldsmith & F. Marec, *Molecular biology and genetics of the Lepidoptera* (pp. 25-41). CRC Press.

- Gotter, A., Levine, J., & Reppert, S. (1999). Sex-Linked period genes in the silkworm, *Antheraea pernyi*. *Neuron*, 24(4), 953-965.
- Gu, L., Reilly, P., Lewis, J., Reed, R., Andolfatto, P., & Walters, J. (2019). Dichotomy of dosage compensation along the neo Z chromosome of the monarch butterfly. *Current Biology*, 29(23), 4071-4077.
- Harrison, P., Mank, J., & Wedell, N. (2012). Incomplete sex chromosome dosage compensation in the Indian Meal Moth, *Plodia interpunctella*, based on de novo transcriptome assembly. *Genome Biology and Evolution*, 4(11), 1118-1126.
- Heckel, D. (1998). Linkage analysis of insecticide-resistant acetylcholinesterase in *Heliothis virescens*. *Journal of Heredity*, 89(1), 71-78.
- 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).
- Charlesworth, B., Harvey, P., Charlesworth, B., & Charlesworth, D. (2000). The degeneration of Y chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 355(1403), 1563-1572.
- Charlesworth, B. (1996). The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Current Biology*, 6(2), 149-162.
- Charlesworth, D., & Charlesworth, B. (1980). Sex differences in fitness and selection for centric fusions between sex-chromosomes and autosomes. *Genetical Research*, 35(2), 205-214.
- Charlesworth, D., Charlesworth, B., & Marais, G. (2005). Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity*, 95(2), 118-128.
- Jeffries, D., Gerchen, J., Scharmann, M., & Pannell, J. (2021). A neutral model for the loss of recombination on sex chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 376(1832).
- Jiggins, C., Mavarez, J., Beltrán, M., McMillan, W., Johnston, J., & Bermingham, E. (2005). A genetic linkage map of the mimetic butterfly *Heliconius melpomene*. *Genetics*, 171(2), 557-570.
- Kawaguchi, E. (1934). Zytologische Untersuchungen am Seidenspinner und seiner Verwandten. II. Spermatogenesese bei *Antheraea yamamai* Guérin, *Antheraea pernyi* Guénin, und ihre Bastard. *Jap J Genet*, 10, 135-151.

- Kawamoto, M., Jouraku, A., Toyoda, A., Yokoi, K., Minakuchi, Y., Katsuma, S., Fujiyama, A., Kiuchi, T., Yamamoto, K., & Shimada, T. (2019). High-quality genome assembly of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 107, 53-62.
- Kawamura, N. (1988). The egg size determining gene, *Esd*, is a unique morphological marker on the W chromosome of *Bombyx mori*. *Genetica*, 76(3), 195-201.
- Kitano, J., Ross, J., Mori, S., Kume, M., Jones, F., Chan, Y., Absher, D., Grimwood, J., Schmutz, J., Myers, R., Kingsley, D., & Peichel, C. (2009). A role for a neo-sex chromosome in stickleback speciation. *Nature*, 461(7267), 1079-1083.
- Kiuchi, T., Koga, H., Kawamoto, M., Shoji, K., Sakai, H., Arai, Y., Ishihara, G., Kawaoka, S., Sugano, S., Shimada, T., Suzuki, Y., Suzuki, M., & Katsuma, S. (2014). A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm. *Nature*, 509(7502), 633-636.
- Kost, S., Heckel, D., Yoshido, A., Marec, F., & Groot, A. (2016). A Z-linked sterility locus causes sexual abstinence in hybrid females and facilitates speciation in *Spodoptera frugiperda*. *Evolution*, 70(6), 1418-1427.
- Kozak, G., Wadsworth, C., Kahne, S., Bogdanowicz, S., Harrison, R., Coates, B., & Dopman, E. (2019). Genomic basis of circannual rhythm in the European corn borer moth. *Current Biology*, 29(20), 3501-3509.
- Kristensen, N., Scoble, M., & Karsholt, O. (2007). Lepidoptera phylogeny and systematics: the state of inventorying moth and butterfly diversity. *Zootaxa*, 1668(1), 699-747.
- Kroemer, J., Coates, B., Nusawardani, T., Rider, S., Fraser, L., & Hellmich, R. (2011). A rearrangement of the Z chromosome topology influences the sex-linked gene display in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 286(1), 37-56.
- Lee, J., Kiuchi, T., Kawamoto, M., Shimada, T., & Katsuma, S. (2015). Identification and functional analysis of a *Masculinizer* orthologue in *Trilocha varians* (Lepidoptera: Bombycidae). *Insect Molecular Biology*, 24(5), 561-569.
- Lewis, J., Cicconardi, F., Martin, S., Reed, R., Danko, C., Montgomery, S., & Betancourt, A. (2021). The *Dryas iulia* genome supports multiple gains of a W chromosome from a B chromosome in butterflies. *Genome Biology and Evolution*, 13(7).
- Lockwood, A. (1961). "Ringer", solutions and some notes on the physiological basis of their ionic composition. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2(4), 241-289.

- Lukhtanov, V. (2000). Sex chromatin and sex chromosome systems in nonditrysian Lepidoptera (Insecta). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 38(2), 73-79.
- Lukhtanov, V. (2015). The blue butterfly *Polyommatus (Plebicula) atlanticus* (Lepidoptera, Lycaenidae) holds the record of the highest number of chromosomes in the non-polyploid eukaryotic organisms. *Comparative Cytogenetics*, 9(4), 683-690.
- Mank, J. (2013). Sex chromosome dosage compensation: definitely not for everyone. *Trends in Genetics*, 29(12), 677-683.
- Mank, J., Vicoso, B., Berlin, S., & Charlesworth, B. (2010). Effective population size and the faster-X effect: Empirical results and their interpretation. *Evolution*, 64(3), 663-674.
- Marec, F., & Novák, K. (1998). Absence of sex chromatin corresponds with a sex-chromosome univalent in females of Trichoptera. *European Journal of Entomology*, 95(2), 197-209.
- Marec, F., Tothová, A., Sahara, K., & Traut, W. (2001). Meiotic pairing of sex chromosome fragments and its relation to atypical transmission of a sex-linked marker in *Ephestia kuehniella* (Insecta: Lepidoptera). *Heredity*, 87(6), 659-671.
- Marec, F., & Traut, W. (1994). Sex chromosome pairing and sex chromatin bodies in W-Z translocation strains of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). *Genome*, 37(3), 426-435.
- Martis, M., Zhou, R., Haseneyer, G., Schmutzer, T., Vrána, J., Kubaláková, M., König, S., Kugler, K., Scholz, U., Hackauf, B., Korzun, V., Schön, C., Doležel, J., Bauer, E., Mayer, K., & Stein, N. (2013). Reticulate evolution of the rye genome. *The Plant Cell*, 25(10), 3685-3698.
- Mayer, K., Martis, M., Hedley, P., Šimková, H., Liu, H., Morris, J., Steuernagel, B., Taudien, S., Roessner, S., Gundlach, H., Kubaláková, M., Suchánková, P., Murat, F., Felder, M., Nussbaumer, T., Graner, A., Salse, J., Endo, T., Sakai, H. et al. (2011). Unlocking the barley genome by chromosomal and comparative genomics. *The Plant Cell*, 23(4), 1249-1263.
- Mediouni, J., Fuková, I., Frydrychová, R., Dhouibi, M., & Marec, F. (2004). Karyotype, sex chromatin and sex chromosome differentiation in the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae). *Caryologia*, 57(2), 184-194.
- Mita, K., Kasahara, M., Sasaki, S., Nagayasu, Y., Yamada, T., Kanamori, H., ... & Sasaki, T. (2004). The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Research*, 11(1), 27-35.

- Mongue, A., Nguyen, P., Voleníková, A., & Walters, J. (2017). Neo-sex chromosomes in the monarch butterfly, *Danaus plexippus*. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 7(10), 3281-3294.
- Nagaraju, J. (1996). Sex determination and sex-limited traits in the silkworm, *Bombyx mori*; their application in sericulture. *Indian J. Seric*, 35, 83-89.
- Nguyen, P., Sykorova, M., Sichova, J., Kuta, V., Dalikova, M., Capkova Frydrychova, R., Neven, L., 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.
- Nguyen, P., & Carabajal Paladino, L. (2016). On the neo-sex chromosomes of Lepidoptera. *Evolutionary Biology*, 171-185.
- O'Connor, C. (2008) Karyotyping for chromosomal abnormalities. *Nature Education* 1(1):27
- Okazaki, S., Tsuchida, K., Maekawa, H., Ishikawa, H., & Fujiwara, H. (1993). Identification of a pentanucleotide telomeric sequence, (TTAGG)_n, in the silkworm *Bombyx mori* and in other insects. *Molecular and Cellular Biology*, 13(3), 1424-1432.
- Pala, I., Naurin, S., Stervander, M., Hasselquist, D., Bensch, S., & Hansson, B. (2012). Evidence of a neo-sex chromosome in birds. *Heredity*, 108(3), 264-272.
- Perelman, V. I. (1954). Malá chemická příručka. SNTL Praha, 158-159.
- Perrin, N. (2021). Sex-chromosome evolution in frogs: what role for sex-antagonistic genes?. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 376(1832).
- Pokorná, M., Rens, W., Rovatsos, M., & Kratochvíl, L. (2014). A ZZ/ZW sex chromosome system in the thick-tailed gecko (*Uroplatus fimbriatus*; Squamata: Gekkota: Carphodactylidae), a member of the ancient gecko lineage.: Gekkota. *Cytogenetic and Genome Research*, 142(3), 190-196.
- Renkawitz, J., Lademann, C., & Jentsch, S. (2014). Mechanisms and principles of homology search during recombination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(6), 369-383.
- Rice, W. (1996). Evolution of the Y sex chromosome in animals. *BioScience*, 46(5), 331-343.
- Sahara, K., Bando, H., Yasukochi, Y., Yoshido, A., Kawamura, N., Ohnuma, A., Abe, H., Mita, K., Oshiki, T., Shimada, T., & Asano, S. (2003). W-derived BAC probes as a new tool for identification of the W chromosome and its aberrations in *Bombyx mori*. *Chromosoma*, 112(1), 48-55.
- Sahara, K., Marec, F., & Traut, W. (1999). TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Research*, 7(6), 449-460.

- Sahara, K., Yoshido, A., Shibata, F., Fujikawa-Kojima, N., Okabe, T., Tanaka-Okuyama, M., & Yasukochi, Y. (2013). FISH identification of *Helicoverpa armigera* and *Mamestra brassicae* chromosomes by BAC and fosmid probes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 43(8), 644-653.
- Sahara, K., Yoshido, A., & Traut, W. (2012). Sex chromosome evolution in moths and butterflies. *Chromosome Research*, 20(1), 83-94.
- Sandler, L., & Novitski, E. (1957). Meiotic drive as an evolutionary force. *The American Naturalist*, 91(857), 105-110.
- Sasaki S, (1955). Genetical studies on the new sex-limited black marking of silkworm larvae. *Jpn. J. Genet.* 30: 185. (In Japanese)
- Scriber, J., Hagen, R., & Lederhouse, R. (1996). Genetics of mimicry in the tiger swallowtail butterflies, *Papilio glaucus* and *P. canadensis* (Lepidoptera: Papilionidae). *Evolution*, 50(1).
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., Eliceiri, K.W. "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis". *Nature Methods* 9, 671-675, 2012.
- Seiler J. 1959. Untersuchungen über die Entstehung der Parthenogenese bei *Solenobia triquetrella* F. R. (Lepidoptera, Psychidae). *Chromosoma*. 10:73–114.
- Smith, G., Chen, Y., Blissard, G., & Briscoe, A. (2014). Complete dosage compensation and sex-biased gene expression in the moth *Manduca sexta*. *Genome Biology and Evolution*, 6(3), 526-537.
- Sohn, E. (2002). *Paper contributed to expert consultataion on promotion of global exchange of sericulture germplasm satellite session of XIXth ISC Congress, September 21st-25th Bangkok, Thailand.* Conservation status of sericulture germplasm resources in Japan. Retrieved 2021-11-05, from <https://www.fao.org/3/ad108e/ad108e0i.htm>
- Sperling, F. (1994). Sex-linked genes and species differences in Lepidoptera. *The Canadian Entomologist*, 126(3), 807-818.
- Spies, M., & Fishel, R. (2015). Mismatch repair during homologous and homeologous recombination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(3).
- Sreekumar, S., Kadono-Okuda, K., Nagayasu, K., & Hara, W. (2010). Identification of 2nd chromosome region translocated onto the W chromosome by RFLP with EST-cDNA clones in the Gensei-kouken strains of the mulberry silkworm, *Bombyx mori* L. *Genetics and Molecular Biology*, 33(1), 27-35.
- Suomalainen, E. (1969a). On the sex chromosome trivalent in some Lepidoptera females. *Chromosoma*, 28(3), 298-308.

- Suomalainen, E. (1969b). Chromosome evolution in the Lepidoptera. *Chromosomes today*, 2, 132-138.
- Suzuki, M., Funaguma, S., Kanda, T., Tamura, T., & Shimada, T. (2003). Analysis of the biological functions of a doublesex homologue in *Bombyx mori*. *Development Genes and Evolution*, 213(7), 345-354.
- Suzuki, M. G., Funaguma, S., Kanda, T., Tamura, T., & Shimada, T. (2005). Role of the male BmDSX protein in the sexual differentiation of *Bombyx mori*. *Evolution & development*, 7(1), 58-68.
- Šíchová, J., Nguyen, P., Dalíková, M., Marec, F., & Doucet, D. (2013). Chromosomal evolution in tortricid moths: conserved karyotypes with diverged features. *PLoS ONE*, 8(5).
- Šíchová, J., Ohno, M., Dincă, V., Watanabe, M., Sahara, K., & Marec, F. (2016). Fissions, fusions, and translocations shaped the karyotype and multiple sex chromosome constitution of the northeast-Asian wood white butterfly, *Leptidea amurensis*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 118(3), 457-471.
- 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), 1-16.
- Tanaka, K., Abe, H., Tsuchida, K., Ninagi, O., Oshiki, T., & Yokoyama, T. (2000). Cytogenetic analysis shows that the unusually large chromosome in the sex-limited pB silkworm (*Bombyx mori*) strain consists of three chromosomes. *Hereditas*, 133(2), 95-103.
- Tanaka, K., Takehana, Y., Naruse, K., Hamaguchi, S., & Sakaizumi, M. (2007). Evidence for different origins of sex chromosomes in closely related *Oryzias* fishes: substitution of the master sex-determining gene. *Genetics*, 177(4), 2075-2081.
- Tazima Y, (1941). A simple method of sex discrimination by means of larval markings in *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.* 12: 184-188. (In Japanese).
- Tazima Y, (1942). Cytogenetical improvement of autosexing method with use of larval marking (I). *J. Seric. Sci. Jpn.* 13: 81-95. (In Japanese).
- Tazima Y, (1943). Cytogenetical improvement of autosexing method with use of larval marking (I). *J. Seric. Sci. Jpn.* 14: 76-89. (In Japanese).
- Tazima Y, (1944). Studies on chromosome aberrations in the silkworm. 11. Translocation involving second and W-chromosomes. *Bull. Seric. Exp. Sta. Jap.* 12: 109- 181. (In Japanese).

- Tazima Y, Kume T a Kamioka M, (1955). A new method of sex discrimination of silkworm larvae by a sex-limited moricaud marking. Reports of the Silk Science Research Institute. 5: 5-24. (In Japanese with English summary).
- Tazima, Y. (1964). The genetics of the silkworm. Logos Press.
- The International Silkworm Genome Consortium. (2008). The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(12), 1036-1045.
- Tomaszkiewicz, M., Medvedev, P., & Makova, K. (2017). Y and W chromosome assemblies: approaches and discoveries. *Trends in Genetics*, 33(4), 266-282.
- Traut, W. (1986). A genetic linkage study of W-chromosome-autosome fusion, breakage, and kinetic organization of chromosomes in *Ephestia* (Lepidoptera). *Genetica*, 69(1), 69-79.
- Traut, W., Sahara, K., & Marec, F. (2007). Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sexual Development*, 1(6), 332-346.
- Traut, W. (1976). Pachytene mapping in the female silkworm, *Bombyx mori* L. (Lepidoptera). *Chromosoma*, 58(3), 275-284.
- Traut, W., Weith, A., & Traut, G. (1986). Structural mutants of the W chromosome in *Ephestia* (Insecta, Lepidoptera). *Genetica*, 70(1), 69-79.
- Traut, W., & Clarke, C. (1997). Karyotype evolution by chromosome fusion in the moth genus *Orgyia*. *Hereditas*, 126(1), 77-84.
- Traut, W., & Marec, F. (1996). Sex chromatin in Lepidoptera. *The Quarterly Review of Biology*, 71(2), 239-256.
- Traut, W., & Marec, F. (1997). Sex chromosome differentiation in some species of Lepidoptera (Insecta). *Chromosome Research*, 5(5), 283-291.
- Traut, W., Vogel, H., Glöckner, G., Hartmann, E., & Heckel, D. (2013). High-throughput sequencing of a single chromosome: a moth W chromosome. *Chromosome Research*, 21(5), 491-505.
- Traut, W., Schubert, V., Dalíková, M., Marec, F., & Sahara, K. (2019). Activity and inactivity of moth sex chromosomes in somatic and meiotic cells. *Chromosoma*, 128(4), 533-545.
- Van't Hof, A., Nguyen, P., Dalíková, M., Edmonds, N., Marec, F., & Saccheri, I. (2013). Linkage map of the peppered moth, *Biston betularia* (Lepidoptera, Geometridae): a model of industrial melanism. *Heredity*, 110(3), 283-295.

- Vicoso, B., & Bachtrog, D. (2011). Lack of global dosage compensation in *Schistosoma mansoni*, a female-heterogametic parasite. *Genome Biology and Evolution*, 3, 230-235.
- Vicoso, B., & Bachtrog, D. (2013). Reversal of an ancient sex chromosome to an autosome in *Drosophila*. *Nature*, 499(7458), 332-335.
- Vítková, M., Fuková, I., Kubičková, S., & Marec, F. (2007). Molecular divergence of the W chromosomes in pyralid moths (Lepidoptera). *Chromosome Research*, 15(7), 917-930.
- Voleníková A (2015) Karyotype and sex chromosomes analysis of two species from basal lepidopteran family Hepialidae (Lepidoptera: Hepialidae). Mgr. Thesis, in Czech. 58 58 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Walters, J., & Hardcastle, T. (2011). Getting a full dose? Reconsidering sex chromosome dosage compensation in the silkworm, *Bombyx mori*. *Genome Biology and Evolution*, 3, 491-504.
- Walters, J., Hardcastle, T., & Jiggins, C. (2015). Sex chromosome dosage compensation in *Heliconius* butterflies: global yet still incomplete?. *Genome Biology and Evolution*, 7(9), 2545-2559.
- Wan, F., Yin, C., Tang, R., Chen, M., Wu, Q., Huang, C., Qian, W., Rota-Stabelli, O., Yang, N., Wang, S., Wang, G., Zhang, G., Guo, J., Gu, L., Chen, L., Xing, L., Xi, Y., Liu, F., Lin, K. et al. (2019). A chromosome-level genome assembly of *Cydia pomonella* provides insights into chemical ecology and insecticide resistance. *Nature Communications*, 10(1).
- White MJD (1973) Animal cytology and evolution. Third edition. Cambridge University Press, Cambridge, 961 pp.
- Wijchers, P., & Festenstein, R. (2011). Epigenetic regulation of autosomal gene expression by sex chromosomes. *Trends in Genetics*, 27(4), 132-140.
- Winnepenninckx, B. (1993). Extraction of high molecular weight DNA from molluscs. *Trends Genet*, 9, 407.
- Wolf, K. (1994). The unique structure of lepidopteran spindles. *International review of cytology*, (152), 1-48.
- Woram, R. (2003). Comparative genome analysis of the primary sex-determining locus in salmonid fishes. *Genome Research*, 13(2), 272-280.
- Wurm, F. (2003). Human therapeutic proteins from silkworms. *Nature Biotechnology*, 21(1), 34-35.

- Xia, Q., Zhou, Z., Lu, C., Cheng, D., Dai, F., Li, B., Zhao, P., Zha, X., Cheng, T., Chai, C., Pan, G., Xu, J., Liu, C., Lin, Y., Qian, J., Hou, Y., Wu, Z., Li, G., Pan, M. et al. (2004). A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 306(5703), 1937-1940.
- Yamamoto, K., Nohata, J., Kadono-Okuda, K., Narukawa, J., Sasanuma, M., Sasanuma, S., Minami, H., Shimomura, M., Suetsugu, Y., Banno, Y., Osoegawa, K., de Jong, P., Goldsmith, M., & Mita, K. (2008). A BAC-based integrated linkage map of the silkworm *Bombyx mori*. *Genome Biology*, 9(1).
- Yang, J., Wan, W., Xie, M., Mao, J., Dong, Z., Lu, S., He, J., Xie, F., Liu, G., Dai, X., Chang, Z., Zhao, R., Zhang, R., Wang, S., Zhang, Y., Zhang, W., Wang, W., & Li, X. (2020). Chromosome-level reference genome assembly and gene editing of the dead-leaf butterfly, *Kallima inachus*. *Molecular Ecology Resources*, 20(4), 1080-1092.
- Yasukochi, Y., Ashakumary, L., Baba, K., Yoshido, A., & Sahara, K. (2006). A Second-generation integrated map of the silkworm reveals synteny and conserved gene order between lepidopteran insects. *Genetics*, 173(3), 1319-1328.
- Yasukochi, Y., Tanaka-Okuyama, M., Shibata, F., Yoshido, A., Marec, F., Wu, C., Zhang, H., Goldsmith, M., Sahara, K., & Murphy, W. (2009). Extensive conserved synteny of genes between the karyotypes of *Manduca sexta* and *Bombyx mori* revealed by BAC-FISH mapping. *PLoS ONE*, 4(10).
- Yokoyama, T., Abe, H., Irobe, Y., Saito, K., Tanaka, N., Kawai, S., Ohbayashi, F., Shimada, T., & Oshiki, T. (2003). Detachment analysis of the translocated W chromosome shows that the female-specific randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker, Female-218, is derived from the second chromosome fragment region of the translocated W chromosome of the sex-limited pB silkworm (*Bombyx mori*) strain. *Hereditas*, 138(2), 148-153.
- Yoshida, K., Makino, T., Yamaguchi, K., Shigenobu, S., Hasebe, M., Kawata, M., Kume, M., Mori, S., Peichel, C., Toyoda, A., Fujiyama, A., Kitano, J., & Zhang, J. (2014). Sex chromosome turnover contributes to genomic divergence between incipient stickleback species. *PLoS Genetics*, 10(3).
- 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.
- Yoshido, A., Bando, H., Yasukochi, Y., & Sahara, K. (2005). The *Bombyx mori* karyotype and the assignment of linkage groups. *Genetics*, 170(2), 675-685.

- 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.
- Zha, X., Xia, Q., Duan, J., Wang, C., He, N., & Xiang, Z. (2009). Dosage analysis of Z chromosome genes using microarray in silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(5-6), 315-321.

8 Přílohy

Tabulka 2: Velikosti spárovaných chromozomů a velikosti ancestrální části neopohlavního chromozomu W zvýrazněné GISH ze 3 samičích pachyteních jader.

chromozom	velikost (μm)		
	jádro 1	jádro 2	jádro 3
ancestrální W	7,921	6,176	5,524
neo-W	14,911	14,785	12,630
1	13,064	12,254	9,696
2	11,531	10,397	7,263
3	9,054	9,906	7,051
4	9,042	8,651	6,982
5	8,814	8,575	6,847
6	8,471	8,457	6,622
7	8,343	8,188	6,610
8	8,286	8,060	6,573
9	8,140	7,836	6,171
10	8,137	7,751	5,935
11	7,967	7,409	5,668
12	7,957	7,086	5,611
13	7,771	7,036	5,552
14	7,699	6,825	5,514
15	7,629	6,753	5,424
16	7,596	6,079	5,275
17	7,371	5,948	5,108
18	7,243	5,902	5,077
19	6,984	5,271	4,924
20	6,708	5,248	4,757
21	6,540	5,245	4,253
22	6,464	5,113	4,228
23	5,592	4,895	4,148
24	5,367	4,790	3,504
25	4,536	4,580	3,258
26	4,422	4,057	2,746
celková délka	223,560	203,273	162,951