

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Analýza chromosomu W u skvrnopásníka lískového,
*Lomaspilis marginata***

Diplomová práce

Bc. Miriam Demková

Školitel: RNDr. Magda Zrzavá, Ph.D.

České Budějovice 2022

Demková, M., 2022: Analýza chromosomu W u skvrnopásníka lískového, *Lomaspilis marginata*. [Analysis of the W chromosome in the clouded border (*Lomaspilis marginata*), Mgr. Thesis, in Czech] – 41 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

The aim of this master thesis was to analyse variability of sex chromosomes in *Lomaspilis marginata* (Geometridae). Several families of this species were tested for the presence of sex chromatin and also for their variability in the W chromosome composition using comparative genomic hybridization. My results of this study indicated existence of at least three different types of the W chromosome in the investigated species.

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 dne 13. 4. 2022

.....

Miriam Demková

Poděkování

Chtěla bych velmi poděkovat své školitelce Magdě Zrzavé za věnovaný čas a odborné vedení, a také hlavně za obrovskou dávku trpělivosti a podpory. Dále bych ráda poděkovala týmu naší laboratoře za pomoc a rady při experimentální části práce. Za odbornou konzultaci při fylogenetické části práce patří mé díky také Zdeňku Faltýnkovi Fricovi. V neposlední řadě bych ráda poděkovala Michalu Zapletalovi a Janu Hrnčířovi za věnované samice skvrnopásníka. Děkuji také své rodině za podporu i v časech, kdy se mi zdálo dokončení této práce nemožné.

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1 Chromosomální určení pohlaví motýlů	1
1.2 Evoluce pohlavních chromosomů.....	1
1.3 Pohlavní chromosomy u motýlů	2
1.3.1 Evoluce pohlavních chromosomů motýlů.....	2
1.3.2 Vzhled a funkce pohlavních chromosomů motýlů.....	3
1.4 Sex chromatin u motýlů a jeho variace.....	4
1.5 Metody pro studium karyotypu.....	6
1.5.1 Základní charakteristika	6
1.5.2 Využití fluorescenčních in situ metod pro studium pohlavních chromosomů...6	
1.6 Skvrnopásník lískový, <i>Lomaspilis marginata</i>	7
2. Cíle práce.....	8
3. Materiál a metody.....	9
3.1 Materiál	9
3.2 Příprava preparátů	9
3.2.1 Příprava preparátů z malpighických trubic	9
3.2.2 Příprava chromosomálních preparátů.....	10
3.3 Izolace DNA metodou CTAB.....	10
3.4 Značení izolované DNA metodou Nick translase	11
3.5 Komparativní genomová hybridizace (CGH).....	11
3.6 Telomerická FISH.....	12
3.7 Prohlížení preparátů	12
3.8 Identifikace druhů pomocí metody barcoding	13
4. Výsledky.....	14
4.1 Sex chromatin u zkoumaných rodin	14

4.2	Charakteristika karyotypu	17
4.3	CGH analýza chromosomu W	19
4.4	Analýza sekvencí COI (barcoding).....	22
5.	Diskuze.....	23
5.1	Vnitrodruhová variabilita chromosomu W	23
5.2	Karyotyp skvrnopásníka	25
5.3	Analýza sekvencí COI (barcoding).....	26
6.	Závěr.....	28
7.	Literatura	29
8.	Přílohy	35

1. Úvod

1.1 Chromosomální určení pohlaví motýlů

U hmyzu lze nalézt dvojí chromosomální určení pohlaví. Prvním z nich je jeden z dosud nejvíce prostudovaných systémů, typ *Drosophila*. Tento systém se vyznačuje samčí heterogamii označující se jako XX/XY (samice/samec), vyskytující se u velké části hmyzu a u většiny obratlovců, včetně lidí (Blackmon et al., 2017; Kaiser a Bachtrog, 2010).

Do druhého systému chromosomálního určení pohlaví s heterogametickými samicemi patří motýli (Lepidoptera) spolu s příbuznou skupinou chrostíků (Trichoptera). Většina druhů z těchto skupin má chromosomální konstituci WZ/ZZ (samice/samec), existují však i další varianty jako je varianta postrádající chromosom W u samic (Z0/ZZ) či varianty s mnohočetnými pohlavními chromosomy jako je například W_1W_2Z/ZZ či $WZ_1Z_2/Z_1Z_1Z_2Z_2$ a další nalezené kombinace (Traut a Marec, 1996; Traut, Sahara a Marec, 2007).

1.2 Evoluce pohlavních chromosomů

Pohlavní chromosomy mají úlohu v determinaci pohlaví jedince a jsou obvykle zásadní pro jeho plodnost. Vývoj heteromorfních pohlavních chromosomů probíhal nezávisle v mnoha živočišných i rostlinných skupinách, na něž zřejmě působily podobné evoluční mechanismy (Charlesworth, 1996).

Obecně se má za to, že pohlavní chromosomy vznikají z homologního páru autosomů, kdy jeden z těchto homologů získá faktor determinující pohlaví. Geny specifické pro dané pohlaví se postupně dostanou do těsné genové vazby s těmito faktory. Pro obě pohlaví je výhodné tyto geny předávat společně na daném pohlavním chromosomu, a proto je rekombinace mezi heterogametickými chromosomy buď úplně potlačena, nebo je omezená pouze na malý úsek chromosomů. Tím dochází ve vývoji pohlavních chromosomů ke vzniku morfologicky a funkčně odlišných chromosomů (Charlesworth et al., 2005; Kaiser a Bachtrog, 2010). Při omezené či žádné rekombinaci ale dochází k akumulaci mutací a mobilních elementů na chromosomu a dlouhodobě k úplné degeneraci těchto nerekombinujících regionů. Výsledkem je, že tento pohlavní chromosom obsahuje velké množství repetitivní DNA a malé množství funkčních genů, což způsobuje, že morfologie chromosomu je převážně heterochromatinového charakteru (Kaiser a Bachtrog, 2010). Může tak dojít k úplné ztrátě aktivity pohlavního chromosomu a jeho genů, čemuž předchází přemístění genů determinujících pohlaví na autosom či nahrazení jejich funkce jiným lokusem. Tento cyklus

se poté může znovu opakovat. Při studiu pohlavních chromosomů motýlů je možné narazit na druhy nacházející se v různých fázích tohoto cyklu (Charlesworth, 1996). Různé strukturní změny na pohlavních chromosomech, jako je například fúze s autosomy, mohou odstartovat vznik tzv. neo-pohlavních chromosomů, jejichž nová část se může začít znovu pohlavně diferencovat (Carvalho a Clark, 2005).

Vznik pohlavních chromosomů se však také alternativně přisuzuje chromosomu B. Jedná se o nadpočetné chromosomy vyskytující se u mnoha rostlin a živočichů, které až na výjimky neobsahují protein-kódující geny a mají omezenou funkci v genomu. U mery přelétavé (*Cacopsylla peregrina*) se ukázalo, že chromosom B se dokázal zařadit do standardního karyotypu párováním a achiasmatickou segregací s univalentním chromosomem X a během evoluce se tento chromosom B přeměnil v chromosom Y (Nokkala et al., 2003). Integrace chromosomu B do karyotypu a jeho následná transformace do chromosomu Y nastala zřejmě i v případě octomilek (*Drosophila*). Tato hypotéza byla rozebírána například v práci Hackstein et al. (1996).

1.3 Pohlavní chromosomy u motýlů

1.3.1 Evoluce pohlavních chromosomů motýlů

Motýli (Lepidoptera) jsou velmi početná skupina hmyzu, čítající přes 137 000 doposud popsáných druhů (van Nieurkerken, 2011). Zhruba 98 % druhů motýlů patří do skupiny Ditrysia (Kristensen a Skalski, 1999). Samičí heterogamie se u sesterských skupin chrostíků (Trichoptera) a motýlů (Lepidoptera) vyvinula pravděpodobně před 180 miliony let u jejich společného předka. Varianta Z0/ZZ (samice/samec) je považována za ancestrální, ze které se poté vyvinula varianta s chromosomem W, tedy konstituce WZ/ZZ (samice/samec), kterou má většina druhů motýlů. Obecně vzato, vývoj pohlavních chromosomů motýlů zahrnuje jejich vznik, degeneraci (případně fúze s autosomy) a nakonec jejich možné ztráty i u pokročilých motýlů (Hejníčková et al., 2021; Lukhtanov 2000; Sahara, Yoshido a Traut, 2012). Na základě dalších nálezů se objevily teorie o vícero nezávislých počátcích vzniku chromosomu W, například u skupin Tischeriidae a Ditrysia (Dalíková et al., 2017a). Doposud však nebyl evoluční původ chromosomu W zcela objasněn, a tak je vhodným objektem pro další studium pohlavních chromosomů.

1.3.2 Vzhled a funkce pohlavních chromosomů motýlů

Chromosom Z se na rozdíl od chromosomu W vyznačuje poměrně konzervovanou strukturou euchromatinového charakteru s množstvím funkčních genů, podobně jako je to i u pohlavního chromosomu X u savců (Sahara, Yoshido a Traut, 2012). Genetickým mapováním byla potvrzena značná syntenie bloků genů na chromosomu Z i u příbuzensky vzdálených druhů (Dalíková et al., 2017a; Traut, Sahara a Marec, 2007; Yasukochi, 2006). Na chromosomu Z se nachází mimo jiné geny důležité pro vývoj a reprodukci daného organismu, z nichž je mnoho exprimováno v testes (shrnutí v Sahara, Yoshido a Traut, 2012).

Chromosom W je charakteristický svojí heterochromatinovou strukturou s četnými repetitivními úseky DNA a s doposud zjištěným malým počtem protein-kódujících genů. Kvůli velkému množství těchto repetitivních sekvencí bylo po dlouhou dobu velmi obtížné tento chromosom osekvenovat a získat tak o jeho složení více detailních informací (Traut et al., 2013) a i dnes máme o složení chromosomu W motýlů jen málo informací. Achiasmatická meióza, tj. meióza postrádající crossing-over, je charakteristická pro samice motýlů a je jednou z příčin rychlého vývoje chromosomu W (Traut a Marec, 1996). Tento chromosom může být tedy díky této rychlé expanzi různých repetitivních sekvencí odlišný i mezi příbuznými druhy motýlů, což bylo potvrzeno pomocí metody Zoo – FISH (fluorescenční in situ hybridizace) s malovací W sondou mezi skvrnopásníkem angreštovým (*Abraxas grossulariata*) a skvrnopásníkem jilmovým (*Abraxas sylvata*) (Zrzavá et al., 2018).

Doposud se zjistilo, že chromosom W je například u bource morušového (*Bombyx mori*), nebo obaleče jablečného (*Cydia pomonella*) složen převážně z retrotranspozabilních elementů (Abe et al., 2005; Fuková et al., 2007), což souvisí s absencí rekombinace u tohoto pohlavního chromosomu a následnou kumulací těchto repetitivních sekvencí. Studie zaměřené na satelitní DNA, která je považována za hlavní komponentu heterochromatinu, odhalily doposud několik specifických satelitních sekvencí (satDNA) umístěných na chromosomu W. Tato satDNA se může velmi dynamicky vyvíjet a její výskyt na pohlavním chromosomu (a v genomu obecně) je velmi různorodý i v rámci jednoho druhu. Například analýza karyotypu travaříkovitých (*Crambidae*) (Cabral-de-Mello et al., 2021) ukázala, že na jejich chromosomu W se nachází pouze menší množství rozptýlených satelitních sekvencí, zatímco u zavíječe paprikového (*Plodia interpunctella*) může satDNA tvořit výraznější blok (Dalíková et al., 2017b). U bělásků rodu *Pieris* bylo zmapováno několik rodin satDNA, kdy některé rodiny satDNA byly společné pro všechny rody bělásků a jiné byly naopak unikátní pro konkrétní rod. V rámci karyotypu bělásků se satDNA vyskytovaly v blocích na chromosomu W a jiné tvořily bloky na autosomech (Pinkrová, 2020). Funkce satDNA v genomu není zatím zcela objasněna,

nicméně ukazuje se, že může hrát roli v mnoha funkčních procesech organismu, jako je například organizace chromatinu či zajištění chodu párování a segregace chromosomů (Biscotti et al. 2015).

Chromosom W je tedy u většiny druhů tvořen heterochromatinem a je obvykle zvýrazněn DAPI podbarvením. Protože se většinou jedná o jediný chromosom v komplementu, který je tvořen heterochromatinem, bývá snadné ho rozeznat od chromosomu Z během párování v pachytene v meiotické profázi I. Toto ale není vždy pravidlem, protože mohou nastat případy, kdy u některých druhů chromosom W není podbarvením DAPI zvýrazněný a je nutné ho vizualizovat pomocí molekulárně cytogenetických technik jako je CGH (komparativní genomová hybridizace) nebo FISH (fluorescenční in situ hybridizace) s malovací sondou (Traut, Sahara a Marec, 2007; Fuková et al., 2007). Fúze pohlavního chromosomu s autosomem může být mimo jiné jednou z častých příčin změn ve vzhledu a konstituci pohlavních chromosomů. Příkladem může být kropenatý jetelový (*Chiasmia clathrata*), u něhož fúzí autosomu s ancestrálním chromosomem W došlo ke vzniku neo-W chromosomu a systému WZ_1Z_2 (Hejníčková et al, 2021).

Funkce chromosomu W jako determinanty pohlaví se potvrdila zatím pouze v případě bource morušového (*Bombyx mori*), kde přítomnost samičího specifického signálu *Fem* piRNA nacházejícího se na chromosomu W determinuje následný vývoj v samici (Kiuchi et al. 2014). Naopak postradatelnost chromosomu W se projevila u reciprokého křížení poddruhů martináče pajasanového (*Samia cynthia*), kdy křížením vznikly nejenom předpokládané kombinace pohlavních chromosomů, ale zároveň se objevily i samice bez chromosomu W a samci s přítomným chromosomem W. Tato studie ukázala, že přítomnost či nepřítomnost chromosomu W nemá u martináče vliv na determinaci pohlaví ani na reprodukční schopnosti (Yoshido et al., 2016).

1.4 Sex chromatin u motýlů a jeho variace

Chromosom W tvoří v interfázních jádrech samic obvykle nápadně tmavší kulovitý útvar, tzv. sex chromatin, který je dobře viditelný v polyploidních buňkách a je složený z mnoha kopií chromosomu W. To, že je sex chromatin skutečně tvořen chromosomem W, bylo prokázáno např. u obaleče jablečného (*Cydia pomonella*), kdy byl přítomen sex chromatin v interfázních jádrech samic, a zároveň pomocí FISH s malovací sondou připravenou ze sex chromatinu byl skutečně identifikován chromosom W v bivalentu WZ (Fuková et al., 2007).

Sex chromatin je považován za indikátor přítomnosti chromosomu W, ale toto tvrzení není vždy platné (Traut a Marec, 1996). Například při analýze pohlavních chromosomů některých druhů bazálních motýlů z čeledi hrotnokřídlecovití (*Hepialidae*) se ukázalo, že v jádrech polyploidních buněk se žádný sex chromatin nenachází, avšak GISH (genomová in situ hybridizace) a CGH přítomnost diferencovaného chromosomu W v karyotypu potvrdila (Voleníková, 2015). Vzhledem k těmto výsledkům tedy nelze s určitostí interpretovat nepřítomnost sex chromatinu v polyploidních jádrech samic jako absenci chromosomu W.

Sex chromatin v polyploidním jádře může nabývat i mnoho atypických podob, obvykle odpovídajících i změněnému charakteru chromosomu W. Normální sex chromatin (tvořící kulovité tělísko) koresponduje většinou i s nálezem jasně diferencovaného chromosomu W v karyotypu, který je převážně heterochromatinového charakteru (Rathjens, 1974; Traut et al., 1986). U zavíječe moučného (*Ephesia kuehniella*), na jehož linii bylo aplikováno gamma záření, bylo popsáno několik podob sex chromatinu vzniklých následkem chromosomálních aberací. Fúzí autosomu s chromosomem W, nebo také translokací části chromosomu Z na chromosom W se může změnit podoba sex chromatinu na několik rozptýlených různě velkých heterochromatinových fragmentů až v některých případech může dojít k jeho úplné absenci. Fragmentace sex chromatinu je patrně zapříčiněna tendencemi transkripčně aktivního euchromatinu autosomálního původu k větší rozvolněnosti ve srovnání s bloky heterochromatinu na chromosomu W/neo-W (Rathjens, 1974; Traut et al., 1986; Traut a Marec, 1996; Traut, Sahara a Marec, 2007). U některých druhů může být jejich euchromatinová část chromosomu W asociována také s transkripčně aktivním jadérkem, což by mohl být možný důvod změny sex chromatinu uváděný například u běločárníka smrkového (*Hylaea fasciaria*). Fragmentovaná verze sex chromatinu byla pozorována také například u samic píďalky obecné (*Epirrhoe alternata*), zde se mohlo jednat o rozštěpení ancestrálního chromosomu W a následný vznik multivalentu $W_1W_2W_3Z/ZZ$ (Hejníčková et al., 2021). Existují i výjimky, jako například u monarchy stěhovavého (*Danaus plexippus*), který má chromosom W složený z jasně diferencované evolučně starší heterochromatinové části a mladší euchromatinové části, i přesto byl v jeho polyploidních jádrech nalezen normální sex chromatin (Mongue et al., 2017).

Změna podoby sex chromatinu může být ovlivněna také výskytem některých konkrétních sekvencí předávaných u samic na chromosomu W, jako je například různá četnost některých mobilních elementů, zatím však není tento princip u motýlů zcela objasněn. Intraspecifický polymorfismus byl pozorován u samic zejkovce hluchavkového (*Pseudopanthera macularia*), jak uvádí ve své práci Hejníčková et al. (2021). V jedné linii

byly nalezeny samice zejkovce postrádající sex chromatin a bez diferencovaného chromosomu W, zároveň se v dalších liniích objevily samice s normálním sex chromatinem a s diferencovaným chromosomem W.

1.5 Metody pro studium karyotypu

1.5.1 Základní charakteristika

Motýli jsou z cytogenetického hlediska ne příliš prozkoumaná skupina, neboť vlastnosti jejich chromosomů přináší jistá úskalí pro studium karyotypu a mapování chromosomů. U motýlů jsou chromosomy celkem malé, početné a holocentrické (tj. bez centromer), navíc u nich nelze použít klasické cytogenetické techniky založené na G-pruhování. Před příchodem molekulárních metod byly výzkumy zaměřené hlavně na počítání chromosomů a studium jejich morfologie. Ke studiu přibližné kompozice pohlavních chromosomů jsou často využívány fluorescenční in situ metody, jejichž některé příklady jsou uvedeny v kapitole níže.

Počet chromosomů je u motýlů obecně udáván nejčastěji v rozmezí $n=29$ až $n=31$. K dispozici jsou i nálezy karyotypu s více chromosomy, ale také s velmi redukovaným počtem, přičemž $n=31$ je udáván jako ancestrální počet (Lukhtanov 2000; Robinson, 1971; Sahara et al., 2012; Sobit et al., 2002).

1.5.2 Využití fluorescenčních in situ metod pro studium pohlavních chromosomů

Jednou z využívaných fluorescenčních in situ metod je komparativní genomová hybridizace (CGH), založená v tomto případě na kompetici celogenomových fluorescenčně značených sond ze samčí a samičí genomové DNA na cílovém chromosomálním preparátu. Při studiu motýlů je tato metoda často využívána k identifikaci přibližného složení chromosomu W na samičím preparátu (Traut et al., 1999). Podle poměru intenzit hybridizačního signálu obou sond na chromosomu W lze odlišit dva typy sekvencí: sekvence, které jsou společné pro celý genom, ale zároveň jsou přítomné na chromosomu W (samčí i samičí sonda hybridizují s W přibližně stejně intenzivně) a sekvence specifické nebo výrazně obohacené na chromosomu W (samičí sonda bude na chromosom W hybridizovat jako jediná nebo výrazně silněji), (Fuková et al., 2007; Sahara et al., 2003).

K identifikaci chromosomů je možné aplikovat také genomovou in situ hybridizaci (GISH). Používá se značená samičí sonda a neznačená samčí sonda ve vyšší koncentraci, které hybridizují na samičí chromosomy. Cílem je zvýraznění samičích specifických sekvencí na

chromosomu W, díky čemuž je možné chromosom W rozeznat od ostatních chromosomů. (Silva et al., 2013; Yoshido et al., 2006). Právě Yoshido et al. (2006) ve své práci zdárně použil metodu GISH pro identifikaci chromosomu W u několika druhů motýlů.

Jednou z dalších možných metod pro studium kompozice chromosomu W je použití W-specifické malovací sondy. Příprava sondy spočívá v laserové mikrodisekci sex chromatinu z malpighických buněk samic, následné namnožení a značení sondy pro hybridizaci na daném chromosomálním preparátu. Takto připravené sondy byly úspěšně použity např. v práci Fuková et al. (2007), kde jasně zvýraznily chromosom W u obaleče jablečného (*Cydia pomonella*).

1.6 Skvrnopásník lískový, *Lomaspilis marginata*

Skvrnopásník lískový (*Lomaspilis marginata*) je motýl patřící do čeledi píďalkovitých (Geometridae). Má poměrně variabilní zbarvení a vzor křídel. Hojně se vyskytuje v celé Evropě od dubna do srpna, a to ve dvou generacích. Housenka se živí lískou (*Coryus*), jívou (*Salix caprea*), břízou (*Betula*) a dalšími stromy (Reichholf-Riehm, 1996).

U píďalkovitých (Geometridae) byla nalezena absence sex chromatinu u mnoha nepříbuzných druhů, což by mohlo indikovat sekundární změny na chromosomu W, kdy došlo ke ztrátě tohoto chromosomu a přechodu na Z/ZZ systém pohlavních chromosomů, nebo k chromosomálním aberacím, které zahrnují chromosom W, jak bylo zmíněno v předchozích kapitolách (Hejníčková et al., 2021, Traut a Marec 1996).

Při našem studiu skvrnopásníka lískového byla objevena značná variabilita sex chromatinu u samic z několika různých rodin a lokalit a je tedy zjevné, že nastaly jisté změny na chromosomu W. Tato skutečnost činí zkoumaný druh motýla zajímavým studijním materiálem z hlediska možné vnitrodruhové variability.

2. Cíle práce

Cílem této diplomové práce je analýza sex chromatinu a chromosomu W u různých samic druhu skvrnopásníka lískového (*L. marginata*).

Dílními úkoly této práce bylo:

- 1) Zjistit u potomků několika rodin samic *L. marginata*, zda je v jejich malpighických trubicích přítomen sex chromatin, a v jaké formě se zde nachází.
- 2) Analyzovat kompozici chromosomu W u daných jedinců a ověřit tak, zda se variabilita sex chromatinu odráží i ve variabilitě podoby a složení chromosomu W.

3. Materiál a metody

3.1 Materiál

Za účelem získání materiálu pro cytogenetickou analýzu bylo pochyťáno v sezóně 2018 až 2020 celkem 16 samic druhu *L. marginata*. Tito motýli pocházeli z lokality u Českých Budějovic (Vrbenské rybníky), dále z lokalit v Novohradských horách (u obcí Kuří u Benešova nad Černou a Pohoří na Šumavě), okolí Moravského Krasu a z obce Javorník (Velká nad Veličkou). Samičky byly vloženy do plastových krabiček s živnou rostlinou (vrba jíva, *Salix caprea*) k naklazení vajíček. V sezóně 2018 se podařilo odchovat potomstvo od čtyř samic. V následující sezóně 2019 se podařilo odchovat potomstvo od osmi samic. V sezóně 2020 se podařilo odchovat potomstvo od čtyř samic, přičemž jejich preparáty byly vyhodnoceny a připraveny jinými členy laboratoře. Každý analyzovaný jedinec dostal unikátní kódové označení, které obsahovalo: 1) pohlaví jedince (F = samice, M = samec), 2) rok, kdy byla odchycena matka rodiny, číslo potomka dané samice. Např. F19-01-02 bylo označení pro druhou analyzovanou dceru první samice odchycené v roce 2019. Označení chycených samic bylo zároveň označení celé rodiny, např. F19-01 bylo označení samice chycené v přírodě v roce 2019, která byla matkou rodiny F19-01.

3.2 Příprava preparátů

3.2.1 Příprava preparátů z malpighických trubic

Pro zjištění přítomnosti či absence sex chromatinu byly z larev i z dospělých jedinců (jak samců, tak i samic) připraveny preparáty polyploidních interfázních jader malpighických trubic dle Trauta et al. (1986).

Vypitvání larev proběhlo ve fyziologickém roztoku a vyjmuté malpighické trubice byly pro lepší přehlednost nejprve nataženy a rozděleny na podložním sklíčku v kapce fyziologického roztoku. Poté byla na tento preparát nanесena kapka fixačního roztoku Carnoy (ethanol: chloroform: kyselina octová v poměru 6:3:1), ve které byl preparát fixován 1 minutu. Zbytky fixačního roztoku byly odsáty filtračním papírem a na preparát byl nanесen roztok laktoacetoorceinu (1,25% orcein v 49% kyselině octové a 49% kyselině mléčné), pro obarvení trubic. Preparát byl překryt krycím sklíčkem, po třech minutách byly odsáty zbytky laktoacetoorceinu pomocí filtračního papíru, a nakonec se kraje sklíčka překryly lakem na nehty. Sklíčka bylo možno po uschnutí laku prohlížet ve světelném mikroskopu či skladovat při 4°C, nejdéle však po dobu dvou týdnů.

3.2.2 Příprava chromosomálních preparátů

Z ovárií larev samic v posledním larválním instaru byly připraveny meiotické preparáty, které jsou vhodné pro zobrazení pohlavních chromosomů. Z křídelních disků tohoto instaru byly připraveny mitotické preparáty, sloužící hlavně k počítání chromosomů jedince. Z larev samců v předposledním larválním instaru byly pro meiotické preparáty použity testes a pro mitotické preparáty také křídelní disky.

Larvy byly ve vhodném stádiu vypitvány ve fyziologickém roztoku. Vyjmutý materiál byl ponechán ve fixačním roztoku Carnoy (viz kapitola výše) po dobu 15 minut. Testes a křídelní disky byly před samotnou fixací ponořeny do hypotonického roztoku 0,075M KCl na 10 minut. Poté byl materiál pomocí wolframových jehel vložen na sklíčko do kapky 60% kyseliny octové, ve které byl následně homogenizován. Na histologické plotýnce vyhřáté na 45°C se pomocí wolframových jehel tento materiál rovnoměrně rozprostřel až do vypaření kapky. Preparát byl odvodněn vzestupnou alkoholovou řadou v 70%, 80% a 100% etanolu (30 sekund v každém) a skladován při -20°C.

3.3 Izolace DNA metodou CTAB

DNA byla izolována jak z vypitvaných larev, tak i z dospělých jedinců pomocí CTAB (Cetyl trimetylamonium bromid) dle Winnerpennickx et al. (1993).

Nejdříve byl připraven extrakční pufr, jehož výsledná koncentrace byla: 100mM Tris HCl o pH = 8,0, 40mM EDTA o pH = 8,0, 2% CTAB, 0,2% merkaptoetanol, 0,1 mg/ml Proteinázy K a 1,4M NaCl. Extrahovaný materiál byl pomocí plastových tyčinek homogenizován ve zkumavce s 0,8 ml extrakčního pufru a inkubován při 60°C přes noc. Poté byl k suspenzi přidán chloroform o objemu 0,8 ml a směs byla centrifugována 10 minut při 4°C a 14 000 rpm. Vodná fáze byla přepipetována do nové zkumavky. Celý postup s chloroformem byl ještě jednou zopakován. K přečištěnému vzorku bylo přidáno 5 µl RNázy A (Sigma-Aldrich, USA) o koncentraci 10 mg/ml a směs byla inkubována 60 minut při 37°C. Dále byl přidán isopropanol o 2/3 objemu směsi a minimálně dvě hodiny při pokojové teplotě byla DNA precipitována, dokud nebyla viditelná sraženina. Precipitát byl centrifugován 15 minut při 4°C (14 000 rpm) a po odstranění supernatantu byl zbylý pelet dvakrát promyt 70% etanolem. Po odpaření zbytkového etanolu byl získaný pelet rozpuštěn ve sterilní vodě o objemu mezi 20 µl až 100 µl, v závislosti na velikosti peletu. Koncentrace získané DNA byla změřena na fluorometru Qubit 3.0 (ThermoFisher Scientific, USA) a také pomocí

spektrofotometru Nanodrop 2000 (ThermoFisher Scientific, USA). Takto izolovaná DNA byla skladována při teplotě -20°C.

3.4 Značení izolované DNA metodou Nick translace

Principem metody zvané Nick translace je značení izolované DNA způsobem, kdy enzym DNáza I vytvoří jednořetězcové zlomy v templátu a DNA polymeráza od těchto míst začne nahrazovat původní vlákno novým vláknem za použití značených nukleotidů. Takto naznačená sonda o výsledné velikosti okolo 200-500 pb byla použita pro metodu CGH, viz kapitola níže.

Výsledná značící reakce o objemu 20 µl sestávala z 10x NT pufr (0,05M Tris-HCl o pH 7,5, 5mM MgCl₂, 0,005% BSA), 0,1M β-merkaptioetanol, směs nukleotidů (0,05mM dATP, dCTP a dGTP; 0,01mM dTTP), 0,1mM nukleotidy značené fluorochromy: červeným Cy3-dUTP nebo zeleným fluoresceinem-12-dUTP (obojí Jena Bioscience, Německo), 0,01 U/µl DNázy I (ThermoFisher Scientific, USA), 10 U/µl DNA polymerázy I, 1 µg DNA a vodu (Milli-Q, sterilizováno) na doplnění výsledného objemu reakce 20 µl.

Reakce probíhala v termocykleru 60 minut při 15°C a závěrem 10 minut při 70°C, kontrola výsledné velikosti naznačené sondy (optimálně 500 pb) proběhla pomocí elektroforézy. Takto připravená sonda byla skladována při teplotě -20°C.

3.5 Komparativní genomová hybridizace (CGH)

CGH byla v této práci použita pro zobrazení rozdílů mezi samčím a samičím karyotypem. Při CGH byly použity celogenomové sondy připravené nick translací, značené zeleným fluorochromem (fluorescein-12- dUTP pro samičí DNA) a červeným fluorochromem (Cy3-dUTP pro samčí DNA) (viz kap. 3.4).

Hybridizační směs obsahovala 300 ng z každé sondy. Ke smíchané samčí a samičí sondě bylo přidáno 25 µg DNA z lososích spermií. Následně bylo přidáno 1/10 objemu octanu sodného (3 M, pH = 8,0) a 2,5 násobek objemu 100% studeného etanolu (-20°C) a zkumavka se směsí byla vložena do -20°C na 15-20 minut. Poté byla centrifugována 15 minut při 4°C a 14 000 rpm, odpipetoval se supernatant a zbylý pelet byl promyt 500 µl 70% etanolu. Směs byla znovu centrifugována 5 minut při 4°C a 14 000 rpm, supernatant byl odpipetován a k peletu bylo přidáno 5 µl 100% deionizovaného formamidu o teplotě 37°C. Nakonec bylo přidáno 5 µl 20% dextran sulfátu v 4xSSC a sonda byla denaturována 5 minut při 90°C. Ihned poté byla směs schlazena prudkým ochlazením na ledu a sonda byla poté na 90 minut umístěna

do 37°C. Po tomto procesu byla sonda připravena na aplikaci. Sklíčka s preparáty byla odvodněna vzestupnou řadou alkoholů. Na každé sklíčko bylo aplikováno 100 µl RNázy A (200 µg/ml) v 2x SSC, překryto krycím sklíčkem a inkubováno 60 minut v 37°C. Po inkubaci byly preparáty promyty v 2x SSC po dobu 5 minut při pokojové teplotě, a po nanesení 100 µl 70% formamidu v 2x SSC byly 3,5 minuty při 68°C denaturovány. Poté byly odvodněny vzestupnou řadou alkoholu - 70% (vychlazený), 80% a 100% etanol. Na preparát byla aplikována hybridizační směs a přikryta krycím sklem inkubována ve vlhké komůrce tři dny při 37°C.

Po této době byly preparáty nejprve promývány 5 minut v 1% Triton X v 0,1xSSC (Sigma-Aldrich, USA) při 62°C, poté vloženy do 1% Kodak Photo Flo (Kodak, USA) v MiliQ sterilizované vodě. Na závěr bylo nanесeno 25 µl DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol dihydrochlorid) v DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]oktan), (obojí Sigma-Aldrich, USA) o koncentraci DAPI 500 ng/ml a preparát byl přikryt krycím sklíčkem a přelakován. Takto připravený preparát byl skladován při teplotě 4°C.

3.6 Telomerická FISH

Neznačená telomerická sonda byla připravena jinými členy laboratoře pomocí beztemplátové PCR podle protokolu uvedeného v Sahara et al. (1999). Značení bylo provedeno pomocí kitu Cy3 NT Labelling kit (Jena Bioscience, Německo) podle návodu výrobce.

Hybridizační mix obsahoval 300 ng připravené sondy, 25 µg sonikované DNA z lososích spermií, následně bylo přidáno 1/10 objemu octanu sodného (3 M, pH = 8,0) a 2,5 násobek objemu 100% studeného etanolu (-20°C). Následný postup byl obdobný jako u CGH (předchozí kapitola), rozdílem bylo vynechání prehybridizačního kroku a to, že posthybridizační promývání bylo provedeno v 1% Triton X v 0,1xSSC při 42°C.

3.7 Prohlížení preparátů

Preparáty sex chromatinu z malpighických trubic i preparáty po CGH byly prohlíženy pomocí mikroskopu Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss Jena, Německo). Preparáty pro fluorescenční mikroskopii byly prohlíženy za použití barevného filtru (červený, zelený nebo modrý). Černobílé snímky byly pořízeny CCD kamerou Olympus XM10 s použitím programu cellSens (verze 1.9), a upraveny v programu Adobe Photoshop CS6 (verze 13.0).

3.8 Identifikace druhů pomocí metody barcoding

Pro identifikaci potenciálních kryptických druhů v nalezených rodinách skvrnopásníka byla použita metoda DNA barcodingu. Jedná se o identifikaci druhů na základě variability v mitochondriálním genu pro cytochrom *c* oxidázu I (zkráceně COI).

Za použití oligonukleotidových primerů specifických pro Lepidoptera (forward: 5'-ATTCAACCAATCATAAAGATAT-3', reverse: 5'-TAAACTTCTGGATGTCCA-3') byla pomocí PCR reakce amplifikována příslušná část genu pro COI. Protokol pro tuto reakci byl převzat z Hebert a kol. (2004).

PCR reakce o objemu 50 µl obsahovala 10 až 50 ng genomové DNA, 2.5 mM MgCl₂, 5 pmol F a R primeru, 50 mM KCl, 20 µM dNTPs, 10 mM Tris HCl (pH 8,3), 1U ExTaq DNA polymerázy (TaKaRa, Japonsko) a vody (Milli-Q, sterilizováno) na doplnění do výsledného objemu. Reakce probíhající v termocykleru se skládala z počáteční denaturace 1 min při 94°C, 6 cyklů 1 min při 94°C, 1,5 min při 45°C a 1 min a 15 sekund při 72°C, dále 36 cyklů po 1 min při 94°C, 1,5 min při 51°C, a 1 min 15 sekund při 72°C, a finální elongace 5 min při 72°C. Produkty reakce byly zkontrolovány pomocí elektroforézy a přečištěny pomocí směsi enzymů Exosap (Thermo Fisher Scientific, USA) dle manuálu výrobce. Poté byly odeslány na sekvenování (SeqMe, Česká republika). Sekvence byla provedena z obou stran pomocí primeru F (forward) i R (reverse).

Pro analýzu sekvencí COI (barcoding) bylo použito celkem 15 vzorků, tedy z každé zkoumané rodiny DNA z jednoho jedince, až na rodinu F20-01, ze které již nebyl dostupný materiál. Jako vnější skupina (outgroup) byla použita sekvence ze skvrnopásníka březového (*Lomaspilis opis*) z databáze GenBank (přístupový kód: HM873701.1). V programu Geneious (Biomatters, verze 2022.1) byly získané sekvence oříznuty na jednotnou délku, která odpovídala délce sekvence *L. opis* (634 bp), byl sestaven alignment (seřazení sekvencí pod sebe dle odpovídajících nukleotidových bází) pomocí nástroje MUSCLE (Edgar et al., 2004) implementovaného v programu Geneious a spočítány podobnosti sekvencí (příloha 2).

V programu IQ-tree (verze 1.6.12) byl naším kolegou RNDr. Zdeňkem Faltýnkem Fricem, Ph.D. metodou maximum likelihood vytvořen fylogenetický strom (ultrafast bootstrap pro 1000 opakování) (Hoang et al. 2018; Nguyen et al. 2014). Tento strom je uveden v příloze 1 a jeho topologie posloužila jako podklad pro obrázek 6 (viz výsledky níže).

4. Výsledky

4.1 Sex chromatin u zkoumaných rodin

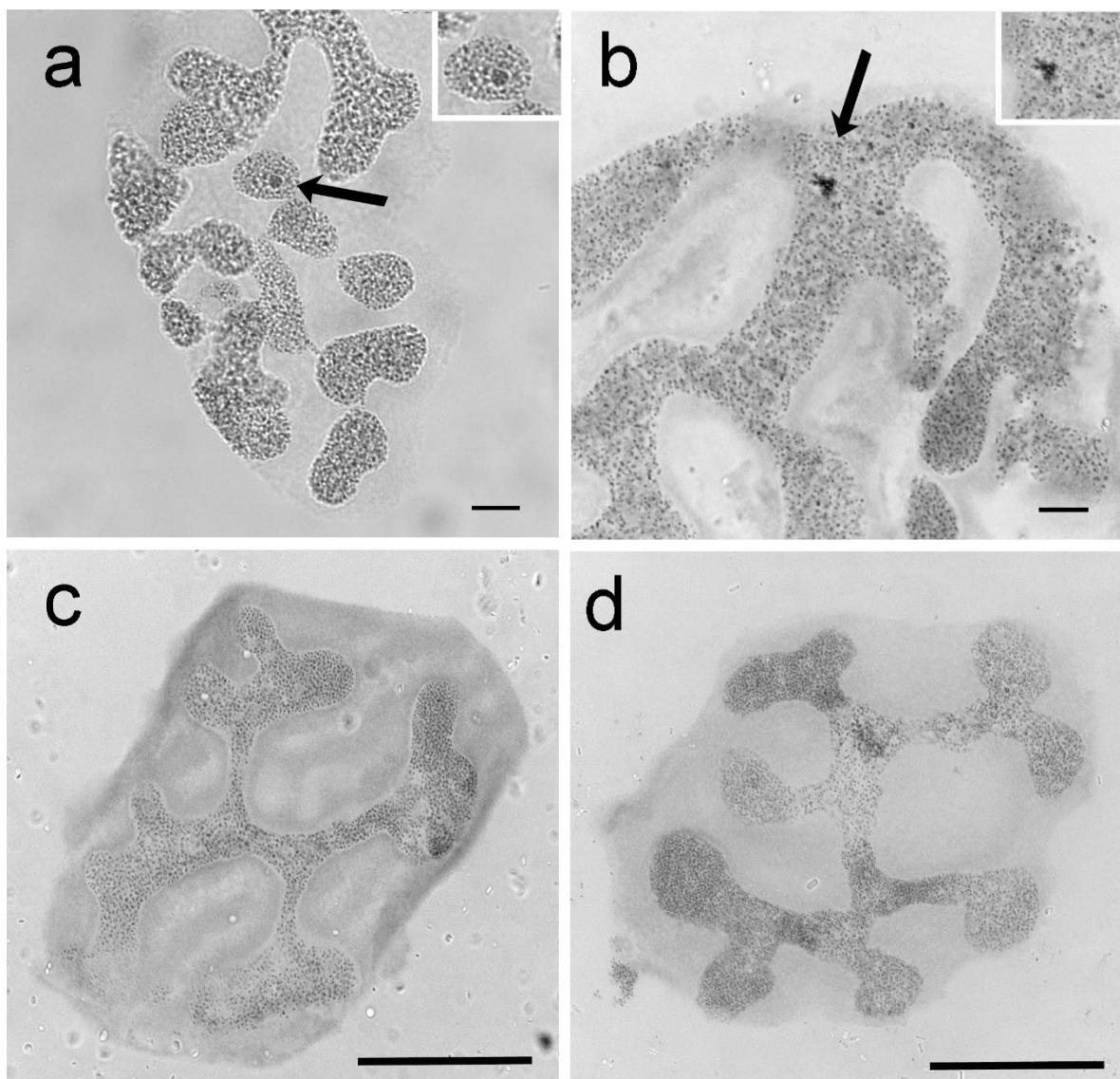
Celkem bylo zkoumáno 16 rodin skvrnopásníka lískového (*L.marginata*) z pěti různých lokalit. Lokality nálezů zkoumaných samic jsou zaznamenány do mapy (viz obrázek 1 níže). Autorka zkoumala převážně rodiny F18-07 až F19-11. U všech zkoumaných rodin skvrnopásníka byl zaznamenán stav sex chromatinu (zkr. SC) v interfázních jádrech polyploidních buněk malpighických trubic. U samic byla zjištěna velká variabilita v přítomnosti a vzhledu sex chromatinu, přítomen byl kulovitý nebo v různé míře fragmentovaný sex chromatin a některé samice sex chromatin úplně postrádaly (obrázek 2). Žádný ze samců sex chromatin neměl. V jistých případech byly nalezeny velké rozdíly ve vzhledu sex chromatinu i v rámci jedné rodiny. V tabulce 1 (viz níže) jsou zaznamenány zkoumané rodiny a zjištěný stav sex chromatinu, přičemž z každé rodiny byl analyzován pro sex chromatin alespoň jeden samec a většina nebo všechny samice.



Obr. 1: Lokality nálezů jedinců *Lomaspilis marginata*. 1 - České Budějovice; 2 – Benešov nad Černou - ves Kuří; 3 - území Pohoří na Šumavě; 4 - oblast Moravský kras; 5 – Velká nad Veličkou - obec Javorník. Převzato z mapy.cz.

Rok nálezu	Název rodiny	Lokalita nálezu	Sex chromatin přítomnost/vzhled
2018	F18-09	České Budějovice	SC+ /kulatý až fragmentovaný
	F18-10	České Budějovice	SC+ /fragmentovaný
	F18-11	Moravský kras	SC+ /fragmentovaný
	F18-12	Moravský kras	SC+ /fragmentovaný
2019	F19-01	Pohoří na Šumavě	SC-
	F19-02	České Budějovice	SC+ /kulatý, neostře okraje
	F19-04	České Budějovice	SC+
	F19-05	Kuří	SC+
	F19-06	Kuří	SC+
	F19-07	Kuří	SC+
	F19-08	Kuří	SC+
	F19-11	Pohoří na Šumavě	SC+
2020	F20-01	České Budějovice	SC+/ fragmentovaný až SC-
	F20-02	Pohoří na Šumavě	SC+/ neostře okraje/fragmentovaný
	F20-03	Javorník	SC+ /kulatý a SC-
	F20-04	Pohoří na Šumavě	SC+/ kulatý, často fragmentovaný

Tab. 1: Informace o lokalitách a stavu sex chromatinu u zkoumaných rodin *Lomaspilis marginata*. SC; SC+ = přítomen typický kulatý SC, fragmentovaný = SC je přítomen v podobě více částí, SC- = SC není přítomen.



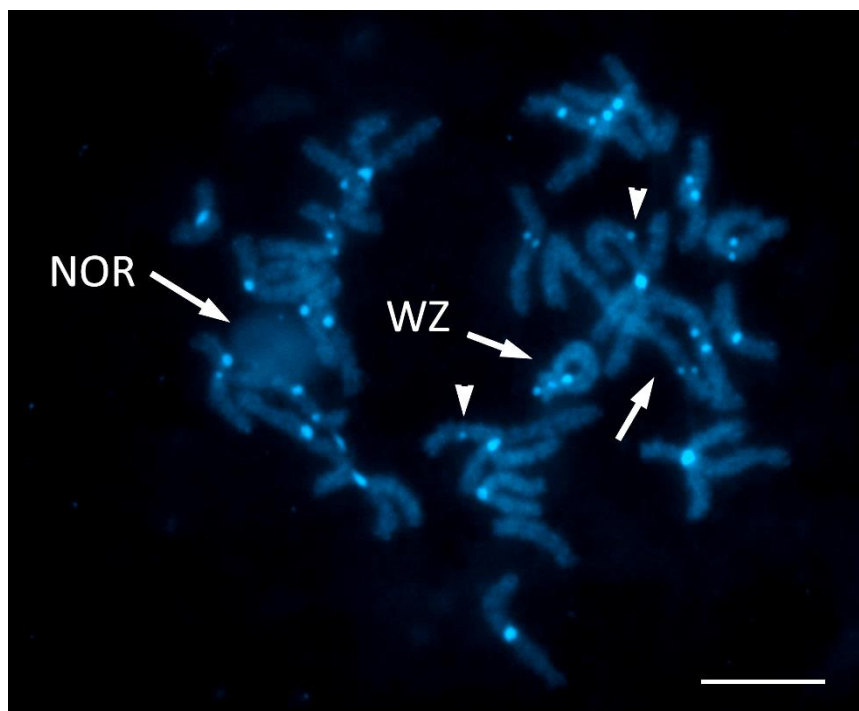
Obr. 2: Polyploidní interfázní jádra z malpighických trubic. Barveno lakto-aceto-orceinem. Jádro samice z rodiny F18-01 s přítomným typickým SC (a), jádro rodiny F19-04 s SC fragmentovaným do vícero tělísek (b), jádro samce bez SC (c), jádro samice bez SC z rodiny F19-01 (d). Šipky ukazují na SC. V rámečcích jsou detaily SC zvětšené 1,5 x. Měřítka = 10 μm (a, b). Měřítka = 50 μm (c, d).

4.2 Charakteristika karyotypu

Počet chromosomů byl zjišťován na mitotických preparátech z křídelních disků samic, a také pomocí počítání pachytenních bivalentů na preparátech z ovárií samic, přičemž počítání bivalentů v pachytenních jádrech samic se ukázalo jako nejlepší. Jedním ze záměrů bylo také porovnání počtu chromosomů mezi samicemi se sex chromatinem a bez sex chromatinu. Na pachytenním preparátu u rodiny F20-04 s normálním SC a typem chromosomu W-1 (charakteristika v další kapitole) se podařilo určit výsledný počet chromosomů na $n = 30$. Dále byla vyhodnocena rodina F20-03 (SC+ i SC-), kde výsledný počet odpovídal $n = 29 +$ neidentifikovaný chromosom/bivalent.

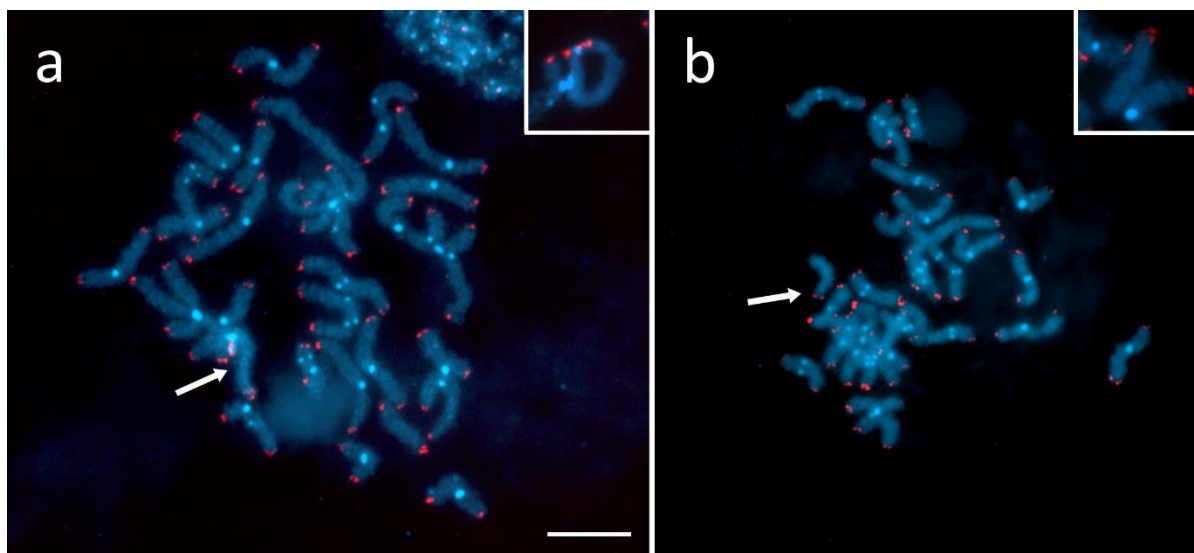
Mimořádnou vlastností chromosomů skvrnopásníka lískového bylo velké množství heterochromatinu na chromosomech, které je u motýlů velice neobvyklé (viz obrázek 3). Karyotyp vynikal pod podbarvením DAPI značným množstvím heterochromatinových bloků, které se mimo pohlavní chromosomy nacházely také na téměř všech autosomech. Většina autosomů obsahovala jeden až dva intersticiální bloky heterochromatinu. Některé bloky byly velmi nápadné, jiné naopak slabě rozlišitelné. Zároveň bylo často pozorováno, že pouze jeden homologní chromosom v bivalentu obsahoval heterochromatinový blok, tudíž se jednalo v tomto případě o jedince heterozygotního pro daný blok.

Karyotyp skvrnopásníka se skládal z chromosomů podobných velikostí (přesné měření nebylo provedeno, protože nebylo cílem práce). Jedinou výjimkou byl jeden konkrétní bivalent, jehož velikost byla přibližně dvojnásobná než velikost ostatních chromosomů. Tento bivalent obsahoval menší heterochromatinový blok lokalizovaný blízko jednomu konci. Dále bylo možné jednoznačně identifikovat jediný bivalent nesoucí aktivní NOR podle přítomnosti jadérka. Posledním párem chromosomů, které bylo možné většinou dobře rozpoznat, byl pár pohlavních chromosomů W a Z, protože celý pár byl po celé délce, tedy i mimo případné heterochromatinové bloky, obarven DAPI intenzivněji než euchromatinové oblasti autosomů. Bivalent WZ navíc často vynikal svým stočeným tvarem, a tímto byl v karyotypu většinou dobře identifikovatelný. Konkrétní podoba chromosomu W se lišila mezi rodinami (viz následující kapitola).



Obr. 3: Pachytenní jádro samice skvrnopásníka pod DAPI podbarvením. Šipkou je označen organizátor jadérka (NOR) a bivalent WZ. Šipkou bez popisky je označen mimořádně velký bivalent. Hlavičky šipek ukazují na bloky heterochromatinu vyskytující se pouze u jednoho z homologů. Měřítko = 10 μm .

Kvůli usnadnění počítání chromosomů byla na několika meiotických preparátech provedena FISH s telomerickou sondou (viz obrázek 4). U všech chromosomů byly standardně označeny oba konce bivalentu, a to včetně dlouhého bivalentu, kde se potenciálně mohly nacházet intersticiální telomerické sekvence jako pozůstatek po fúzi chromosomů. Zajímavým nálezem byl telomerický signál v jádrech samice z rodiny F20-03, kde se ukázalo, že na neidentifikovaný chromosom/bivalent v karyotypu, hybridizuje telomerická sonda pouze na jeden konec.



Obr. 4: FISH s telomerickou sondou na pachytenních jádrech samic z rodiny F20-04 s chromosomem W typu W-1 (a) a F20-03 s pohlavními chromosomy typu W-3 (b). U typu W-1 jsou telometrické sekvence na obou koncích bivalentu, u typu W-3 jen na jednom konci. Šipky označují WZ bivalent v případě rodiny F20-04 a neidentifikovaný bivalent/univalent u rodiny F20-03. V rámečcích jsou umístěny tyto chromosomy z jiného jádra (1,5x zvětšeno). Červená = hybridizační signály telomerické sondy, modrá = DAPI podbarvení. Měřítka = 10 μm .

4.3 CGH analýza chromosomu W

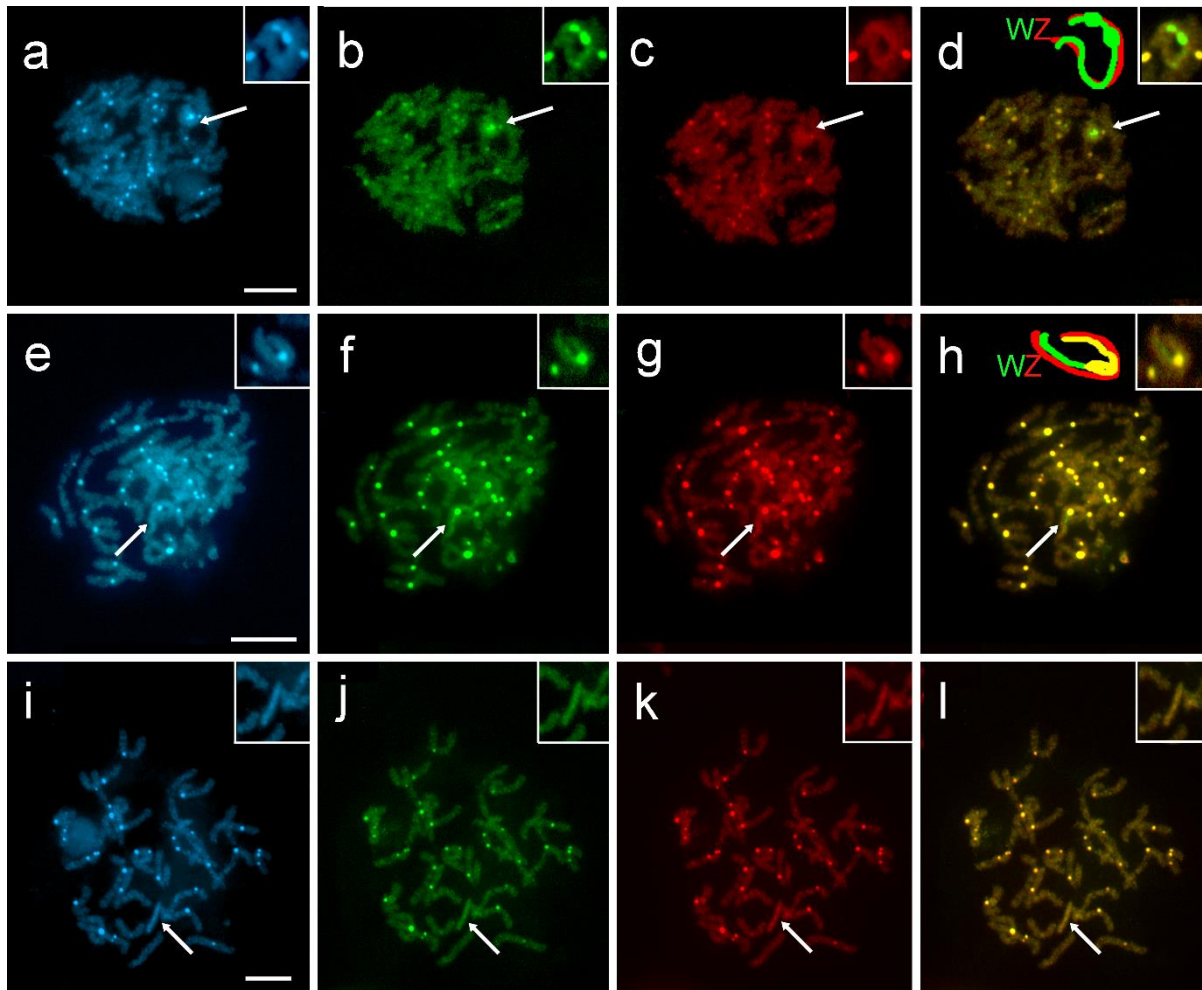
Pomocí CGH byl analyzován stav a přítomnost chromosomu W v pachytenních oocytech samic pomocí zeleně (samice) a červeně (samec) značené sondy. Ve zkoumaných rodinách byly nalezeny tři různé typy chromosomu W (viz obrázek 5). Rodiny jsou zařazeny do skupin dle analyzovaného bivalentu WZ v pachytenním stadiu, zároveň byl u všech určen stav sex chromatinu.

První typ (W-1), nejpočetnější, kam patřilo celkem osm rodin (Lmar: F18-09, F19-02, F19-04, F19-05, F19-06, F19-11, F20-02, F20-04) měl v pachytenních jádrech obvykle normální kulatý tvar sex chromatinu, ale u některých rodin s náznaky fragmentace či s neostrými okraji. U rodiny 20-02 byl nalezen i poměrně velmi fragmentovaný sex chromatin. Při CGH analýze pachytenních jader se ukázalo, že DAPI pozitivní chromosom W v bivalentu je značený přibližně z 1/3 až ze 2/3 výrazněji samičí sondou (tj. zeleně), zbytek chromosomu

je značen oběma sondami rovnoměrně, což značí, že se zde nacházejí sekvence společné pro obě pohlaví. Tato struktura je tvořena výrazně zeleně značenými terminálními heterochromatinovými bloky, v počtu 1 až 3, se kterými samčí sonda nehybridizovala. Různý počet těchto heterochromatinových bloků mohl být dán rozdílným stupně kondenzace chromosomu W během probíhající pachytene.

Druhý typ (W-2), kam patřilo šest rodin (Lmar: F18-10, F18-11, F18-12, F19-07, F19-08, F20-01) obsahoval v polyploidních jádrech kulatý, ale v některých jádrech i v různé míře fragmentovaný sex chromatin. Některé samice z rodiny F20-01 měly sex chromatin ve velké míře fragmentovaný anebo dokonce nebyl sex chromatin vůbec přítomen. Při CGH analýze se na DAPI pozitivním chromosomu W v různých oblastech (intersticiálně) nacházely výrazné bloky heterochromatinu, v počtu 1 až 2, značené rovnoměrně oběma sondami (žlutá barva), obsahující zřejmě repetitivní sekvence společné pro obě pohlaví. Dále byl chromosom přibližně z jedné třetiny až z jedné poloviny značen výrazněji samičí (zelenou) sondou, zbytek chromosomu byl opět značen oběma sondami rovnoměrně.

Třetí typ (W-3), do kterého spadají samice, které postrádaly diferencovaný WZ bivalent v karyotypu (samice Lmar: F19-01 a F20-03). U rodiny F19-01 nebyl nalezen žádný sex chromatin. U rodiny F20-03 dvě samice sex chromatin zcela postrádaly, u ostatních samic z téže rodiny byl nalezen velmi fragmentovaný, ale i normální sex chromatin. V karyotypu u žádné z těchto zmíněných rodin nebyl viditelný WZ bivalent, ani po CGH analýze nebylo jasné, kde a zda se v karyotypu bivalent nachází. V některých jádrech byl patrný DAPI pozitivní útvar (možný univalent či bivalent), na který hybridizovaly rovnoměrně obě sondy (samčí i samičí).

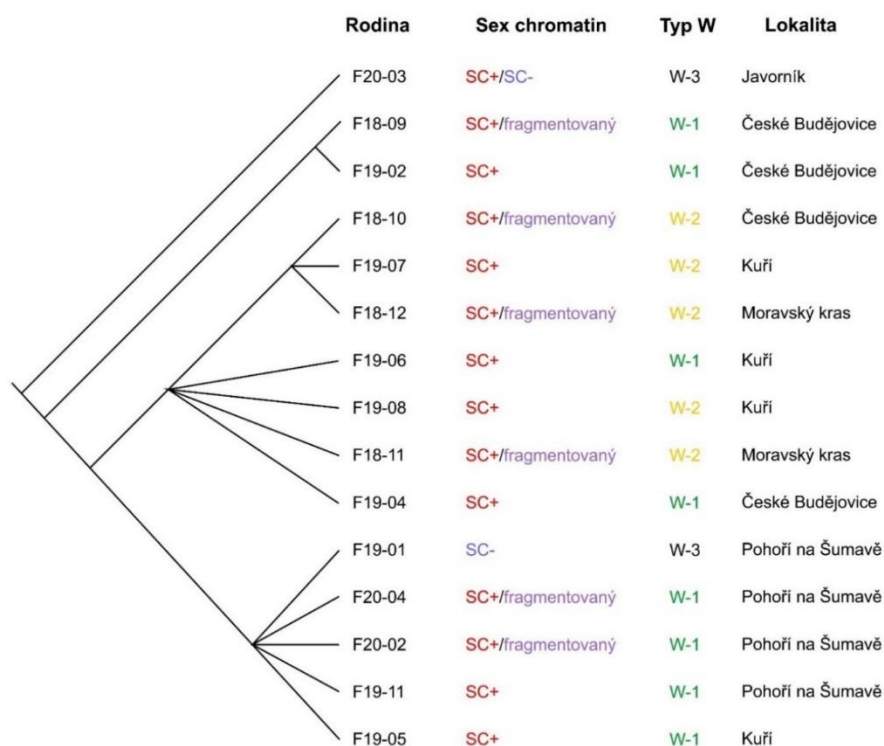


Obr. 5: Komparativní genomová hybridizace samic. DAPI podbarvení (a, e, i), zeleně značená samičí sonda (b, f, j), červeně značená samčí sonda (c, g, k), překryv samčí a samičí sondy (d, h, l). Typ chromosomu W-1 (a-d), typ chromosomu W-2 (e-h); typ chromosomu W-3 (i-l). V rámečcích jsou umístěny detaily jednotlivých bivalentů z jiného jádra. Ve schématickém znázornění jednotlivých typů W-1 a W-2 je chromosom W značen zeleně a chromosom Z červeně, jejich překryv žlutě. Šipky ukazují na bivalent WZ, v případě typu W-3 ukazují na neidentifikovaný chromosom/bivalent. Měřítko = 10 um.

4.4 Analýza sekvencí COI (barcoding)

Analýza sekvencí COI 15 rodin skvrnopásníka ukázala, že mezi většinou rodin jsou v tomto úseku vzájemné rozdíly menší než jedno procento. Jedinou výjimkou je rodina F20-03, která se od ostatních rodin výrazně odlišuje (o 2,5-3 %), což je více, než odlišnost těchto rodin od *L. opis* (2-2,5 %). Rozdíly mezi F20-03 a *L. opis* je 2,5 % (viz příloha 2).

Rodiny skvrnopásníka spadají dle fylogenetického stromu do stejného druhu, tedy *L. marginata*. Výjimkou může být rodina F20-03, která má s ostatními rodinami společný kořen, ale její fylogenetická vzdálenost od ostatních rodin je srovnatelná se vzdáleností od příbuzného *L. opis* a může se tak jednat o jiný druh. Ostatní rodiny mimo F20-03 byly zařazeny do čtyřech skupin, nicméně výsledný fylogenetický strom nepodpořil hypotézu o tom, že rodiny s různými typy chromosomu W budou tvořit odlišné skupiny (obrázek 6).



Obr. 6: Přehled získaných informací o jednotlivých zkoumaných rodinách. Fylogenetické vztahy byly získány na základě sekvencí COI (barcode) a byly převzaty z obrázku 1 v příloze. U každé rodiny je uveden stav SC (SC+ = přítomen typický kulatý SC, fragmentovaný = SC je přítomen v podobě více tělísek, SC- = SC není přítomen), typ chromosomu W (W-1 = diferencovaný chromosom W s vysokým zastoupením sekvencí výrazně obohacených na W; W-2 = diferencovaný chromosom W s vysokým zastoupením sekvencí přítomných v samčím i samičím genomu; W-3 = patrně nediferencovaný chromosom W) a lokalita, kde byla odchycena samice, ze které rodina pochází. V obrázku chybí rodina F20-01, ke které není k dispozici sekvence COI.

5. Diskuze

Skvrnopásník lískový (*Lomaspilis marginata*) je doposud po cytogenetické stránce neprostudovaný druh motýla. V čeledi Geometridae, kam tento druh patří, byla nalezena velká mezidruhovú i vnitrodruhovú variabilita pohlavních chromosomů, a z toho důvodu byl skvrnopásník jako modelový druh vybrán pro tuto práci k dalšímu zkoumání. Cílem této magisterské diplomové práce byla analýza sex chromatinu a pohlavního chromosomu W u samic z několika rodin skvrnopásníka, a tím i vytvoření představy o karyotypu tohoto druhu.

5.1 Vnitrodruhovú variabilita chromosomu W

Ze studií zabývajících se chromosomem W u motýlů vyplývá, že tyto pohlavní chromosomy můžou obsahovat různé kombinace jak samičích specifických sekvencí, tak v různé míře i sekvence společné pro pohlavní chromosom a autosomy (Traut, Sahara a Marec, 2007; Vítková, 2007).

Pomocí analýzy sex chromatinu a metody CGH byla v této práci odhalena značná vnitrodruhovú variabilita u samic skvrnopásníka lískového. U zkoumaných rodin se podařilo identifikovat zatím tři nejvíce charakteristické skupiny chromosomu W s různorodou kompozicí. Chromosomy W se v těchto skupinách liší jak množstvím heterochromatinu, tak i zastoupením W obohacených či unikátních sekvencí. Rodiny se také liší stavem sex chromatinu, od normálního po fragmentovaný, nebo až jeho úplnou absenci. Výsledky však nepotvrdily náš předpoklad, že stav sex chromatinu bude odpovídat i jednotlivým typům chromosomu W, neboť jak první, tak i druhý typ chromosomu W obsahují různé formy sex chromatinu, lišící se dokonce i v rámci jedné rodiny a různých jader jedné samice. To naznačuje, že stav sex chromatinu nemusí jen odrážet konkrétní podobu chromosomu W, ale zřejmě na něj může mít vliv i vývojová fáze, ve které se jedinec momentálně nachází. K ověření této hypotézy by bylo potřeba připravovat preparáty z jedinců z téže rodiny v různých vývojových stádiích.

Na chromosomu W typu W-1 u skvrnopásníka lískového jsou jasně výrazné heterochromatinové oblasti, kde převládá hybridizace samičí sondy (zelená barva). Podobné složení chromosomu W, kde ve větším poměru hybridizovala samičí sonda na heterochromatinových blocích, bylo pozorované například u skvrnopásníka jilmového (*Abraxas sylvata*). Nález naznačuje, že tyto oblasti na chromosomu jsou více obohacené o repetitivní sekvence, jako jsou satelitní DNA nebo mobilní elementy (Zrzavá et al., 2018),

kteře se jinde v genomu buď nenacházejí nebo jsou tam výrazně méně zastoupené než na chromosomu W. Části chromosomu W typu W-2, na kterou hybridizují obě sondy současně (žlutá barva), obsahují univerzální repetice společné pro samce i samice.

U třetího typu pohlavních chromosomů (W-3) nebylo možné pár pohlavních chromosomů identifikovat pomocí CGH, takže je možné, že sekvence repetitivní DNA, které expandovaly a odlišily typy W-1 a W-2, se na tomto třetím typu chromosomu W nenacházejí, a tudíž chromosom W nelze od chromosomu Z v tomto případě odlišit. Alternativní možnost je, že se u těchto rodin chromosom W vůbec nenachází a je tam přítomen jen chromosom Z. U některých samic z rodin s chromosomem W-3 se v pachytenních jádrech pravidelně nachází chromosom nebo bivalent, který je více DAPI pozitivní než autosomy (podobně jako bivalenty WZ u ostatních rodin) a mohl by být buď bivalentem WZ bez bloků heterochromatinu nebo univalentem chromosomu Z, což z důvodu absence samčích preparátů nelze potvrdit. Zvláštností je, že se po aplikaci telomerické FISH na preparáty rodiny F20-03 ukázalo, že tento útvar má telomerické sekvence (TTAGG)_n umístěné jen na jednom konci, což nemají ani ostatní chromosomy ani pohlavní chromosomy WZ u jiných testovaných rodin. Může se teoreticky jednat o to, že použitá metoda telomerické FISH nebyla k zobrazení telomer dostatečná, anebo došlo ke zlomu na chromosomu a tato sekvence zde opravdu zcela chybí. U této rodiny (F20-03) je rovněž zvláštní, že se sestry mezi sebou liší v přítomnosti sex chromatinu, což by nasvědčovalo tomu, že heterochromatinový útvar v polyploidních buňkách samic ve skutečnosti není sex chromatin, ale tělísko tvořené nadbytečným chromosomem B. Jelikož výskyt chromosomů B může být variabilní i mezi členy rodiny, vysvětlovalo by to přítomnost tělíska u některých samic a jeho absenci u jiných samic z téže rodiny. Nicméně, pro ověření této teorie chyběly preparáty samců, kde by možná přítomnost tělísek potvrdila možný výskyt B chromosomu. Podobný fenomén byl popsán u zavíječe moučného (*Ephestia kuehniella*, Pyralidae), kde B chromosom utvářel v polyploidních jádrech heterochromatinová tělíska, podobná sex chromatinu (Voleníková, 2012). Na druhou stranu, neidentifikovaný chromosom/bivalent byl nalezen u samic s i bez sex chromatinu, takže se zdá, že absence sex chromatinu musí být způsobena něčím jiným, např. již výše zmíněným vlivem vývojového stádia jedince. Navíc byl počet objektů v pachytenním jádře v rodině F20-03 stejný, jako v rodině F20-04 (normální sex chromatin a chromosom W typu W-1), takže pokud by se v rodině F20-03 nacházel chromosom B, musel by být základní počet chromosomů $2n = 58$, což by vyžadovalo jednu chromosomální fúzi. Je rovněž nutno podotknout, že počty chromosomů pocházely jen z jednoho jedince v rodině.

Variabilita v podobě různého složení pohlavních chromosomů daná expanzí různých repetitiv na chromosomu W byla pozorována u jiné píďalky, zejména hluchavkového (*Pseudopanthera macularia*), s dvěma typy chromosomu W; nediferencovaný chromosom W a chromosom W, na kterém výrazně hybridizovala samičí sonda (Hejníčková et al., 2021). Dynamická expanze repetitiv a související vnitrodruhový polymorfismus je zřejmě i příčina variability chromosomu W u skvrnopásníka. K tomuto předpokladu nás vede skutečnost, že jednotlivé typy chromosomů W se mezi sebou liší přítomností nebo absencí heterochromatinových bloků, v případě přítomnosti jejich různou pozicí a obsahem sekvencí (dle CGH).

Variabilitu pohlavních chromosomů lze nalézt i u jiných skupin hmyzu. Například u poměrně hojně se vyskytující bzučivky zelené (*Lucilia sericata*, řád Diptera), s určením pohlaví typu XX/XY, bylo identifikováno několik různých typů pohlavních chromosomů X a Y, odlišující se morfologicky i množstvím a umístěním heterochromatinu (Chirino et al., 2020). V tomto případě však nebyla provedena analýza kompozice chromosomů pomocí CGH, jako v případě skvrnopásníka.

V případě další navazující studie by bylo vhodné zaměřit se na analýzu heterochromatinových bloků obsahujících repetice na chromosomu W, případně i bloky na autosomech. V úvahu připadá analýza sekvencí DNA pomocí jednoho z programů pro hledání repetitiv a následné vytvoření značených satelitních i mikrosatelitních sond pro FISH.

5.2 Karyotyp skvrnopásníka

V karyotypu skvrnopásníka bylo pod DAPI podbarvením viditelné na autosomech velké množství heterochromatinových bloků, rozmístěných intersticiálně. Tyto bloky měly různou velikost, ale i zastoupení v bivalentu. O rychlé expanzi těchto repetitiv svědčí i skutečnost, že pro mnoho heterochromatinových bloků jsou jedinci heterozygotní, takže patrně vznikly nedávno a nestačily se v populaci skvrnopásníka zafixovat.

Takový karyotyp, bohatý na DAPI pozitivní heterochromatinové bloky na autosomech, byl pozorován například u skvrnopásníka angreštového (*Abraxas grossulariata*) (Zrzavá et al. 2018). Na chromosomech u *A. grossulariata* se výrazné bloky heterochromatinu vyskytovaly jak terminálně, tak i intersticiálně. Často se také objevovaly v bivalentu pouze heterozygotně. Zajímavé je, že u příbuzného druhu, skvrnopásníka jilmového (*Abraxas sylvata*), se na autosomech vyskytovaly pouze malé, až nepatrné bloky heterochromatinu, s výjimkou chromosomu W, kde byly viditelné DAPI pozitivní bloky. Tyto velké rozdíly u příbuzných

druhů svědčí o velké dynamice repetice v genomu. Značné množství heterochromatinových bloků, povětšinou terminálních, bylo nalezeno také u běláška zelného (*Pieris brassicae*). Analýza heterochromatinových bloků u běláška ukázala přítomnost několika satelitních sekvencí v heterochromatinu, a tím potvrdila hypotézu o tom, že repetice jsou jeho hlavní komponentou (Pinkrová, 2020). Expanze těchto repetice, tvořících heterochromatinové bloky na autosomech i na chromosomu W, je možná také u zkoumaného skvrnopásníka lískového v této práci.

Počet chromosomů u tohoto druhu se podařilo spolehlivě určit u rodiny F20-04 s normálním sex chromatinem a chromosomem W typu W-1 na $n = 30$ chromosomů a stejný počet chromosomů vycházel také u rodiny F20-03. Tento výsledek by mohl teoreticky znamenat, že dlouhý bivalent v karyotypu je ve skutečnosti následek fúze chromosomů, a tím mohlo dojít k redukci ancestrálního počtu chromosomů $n = 31$.

5.3 Analýza sekvencí COI (barcoding)

Analýza rodin skvrnopásníka pomocí metody barcodingu byla provedena za účelem ověření, zda se nejedná v případě variability chromosomu W o kryptické druhy. Ukázalo se, že ve všech případech se jedná o stejný druh, tj. *L. marginata*. Jedinou výjimkou je rodina F20-03, která má stejnou odlišnost sekvence COI od ostatních rodin jako má příbuzný druh *L. opis*, který byl použit jako outgroup. Neznamená to ale, že jedinec z rodiny F20-03 patří do druhu *L. opis*, protože podobně vzdálená je jeho sekvence COI od sekvence *L. opis* a je tedy možné, že se jedná o další druh.

Fylogenetická analýza sekvencí COI použitých pro barcoding rozdělila zbývající rodiny (tj. rodiny bez F20-03) do čtyř skupin. V první skupině se nacházejí dvě rodiny s chromosomem typu W-1 (F18-09 a F19-2), v druhé skupině tři rodiny s typem W-2 (F18-10, F19-07 a F18-12), ve třetí skupině se nacházely čtyři rodiny, dvě s typem W-1 (F19-06 a F19-04) a dvě s typem W-2 (F19-08 a F18-11). V poslední skupině se nacházelo pět rodin, jedna s typem W-3 (F19-01) a čtyři s typem W-1 (F20-04, F20-02, F19-11 a F19-05). Proč se rodiny se stejným typem chromosomu W nezařadily do stejných skupin, zůstává předmětem dalšího zkoumání. Teoreticky může být důvodem těchto výsledků to, že se přednostně během PCR amplifikují rychle mutující jaderné kopie mtDNA (tzv. NUMT, nuclear mitochondrial DNA), čímž může docházet k formování více fylogenetických skupin, než ve skutečnosti existuje (Song et al., 2008). To by ale nevysvětlovalo existenci čtvrté skupiny, ve které se vyskytují typy W-1 a W-3 a mezi sekvencemi COI daných rodin není žádný rozdíl. Další možností

variability v typu W v rámci skupiny může být důvod, že se ve skutečnosti jedná o více typů chromosomů W, než bylo nalezeno v této práci. Variabilita v rámci skupiny by pak odrážela skutečnost, že nové varianty chromosomu W vznikají opakovaně a poměrně často.

Pro ověření těchto hypotéz by bylo potřeba vyvinout markery pro jednotlivé typy chromosomů W (ideálně přímo repetitivní sekvence DNA), zodpovědné za rozdílný hybridizační signál na W různých rodin při CGH analýze. Aplikace těchto markerů na chromosomy různých rodin se zdánlivě stejným typem W (např. W-1) by pak mohla ukázat, že jde zdánlivě o podobnost vnější, zatímco ve skutečnosti na těchto chromosomech W expandovaly různé sekvence repetitivní DNA. Dalším možným krokem by bylo najít a použít k fylogenetické analýze jaderný marker, který by byl dostatečně rychle mutující na to, aby nejen odlišil jednotlivé druhy skvrnopásníka, ale fungoval by i na populační vnitrodruhové studii. Takovým vhodným jaderným markerem pro identifikaci druhů by mohl být například marker ITS2, který byl úspěšně otestován u masařek (Sarcophagidae) v bakalářské práci Jánová (2021).

6. Závěr

L. marginata je druh s variabilním sex chromatinem, tělískem, které je v polyploidních interfázních jádrech samic tvořeno mnohočetnými kopiemi chromosomu W. Cílem této práce bylo analyzovat variabilitu tohoto sex chromatinu a spolu s tím i ověřit variabilitu chromosomu W.

Je známo několik možných faktorů, které působí na změny kompozice sex chromatinu, včetně chromosomálních přestaveb či ztrát zahrnujících chromosom W. Jedním z dalších cílů bylo zjistit chromosomální podstatu této nalezené variability. Zkoumání 16 rodin skvrnopásníka ukázalo, že sex chromatin se liší i v rámci lokalit a odráží související variabilitu v molekulární kompozici chromosomu W. Ve výsledku byly komparativní genomovou hybridizací identifikované tři typy chromosomu W, lišící se expanzí pravděpodobně repetitivní DNA. U skvrnopásníka se v našem případě nepotvrdila hypotéza, že stav sex chromatinu bude odpovídat i jednotlivým nalezeným typům chromosomu W, jelikož je docela možné, že ve skutečnosti je těchto typů chromosomů mnohem více. Analýza sekvence COI (barcoding) však neukázala, až na jednu výjimku, že by se jednalo o kryptické druhy skvrnopásníka, což bylo také jednou z hypotéz. Naopak, ukázalo se, že i rodiny, jejichž sekvence COI jsou identické, mohou mít různé typy chromosomu W.

Výsledky této práce představily velice zajímavý druh motýla a nasměrovaly další kroky výzkumu, jehož předmětem bude detailní zkoumání zahrnující analýzu sekvencí odlišujících jednotlivé typy chromosomu W. Zároveň tato práce ukázala, jak je velmi důležité u cytogenetického výzkumu analyzovat více nepříbuzných jedinců, protože informace o jednom jedinci nemusejí zdaleka vypovídat o dalších zástupcích stejného druhu.

7. Literatura

- Abe, H., Mita, K., Yasukochi, Y., Ohshiki, T., Shimada, T. (2005). Retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*, *Cytogenet. Genome Res.* 110, 144-151
- Biscotti, M. A., Canapa, A., Forconi, M., Olmo, E., & Barucca, M. (2015). Transcription of tandemly repetitive DNA: functional roles. *Chromosome Research*, 23(3), 463–477
- Blackmon, H., Ross, L., & Bachtrog, D. (2017). Sex determination, Sex chromosomes, and karyotype evolution in insects. *The Journal of heredity*, 108(1), 78–93
- Cabral-de-Mello, D.C., Zrzavá, M., Kubičková, S., Rendón, P., Marec, F. (2021). The role of satellite DNAs in genome architecture and sex chromosome evolution in Crambidae moths. *Front Genet*, 2021;12:661417
- Carvalho, A.B., Clark, A.G. (2005). Y chromosome of *D. pseudoobscura* is not homologous to the ancestral *Drosophila* Y. *Science*. 307:108–110
- Charlesworth, B. (1996). The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Current Biology*, 6(2), 149–162
- Charlesworth, D., Charlesworth, B., & Marais, G. (2005). Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity*, 95(2), 118–128
- Chirino, M.G.; Fourastie, M.F.; Cemteno, N.D.; Bressa, M.J. (2020). Unusual chromosome polymorphism and heterochromatin variation in the Argentinean population of the necrophagous fly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae), comparison with other populations and evolutionary aspects. *Eur. J. Entomol*, 117, 295–301
- Dalíková, M., Zrzavá, M., Hladová, I., Nguyen, P., Šonský, I., Flegrová, M., Kubičková, S., Voleníková, A., Kawahara, A., Y., Peters, R., S., Marec, F. (2017a). New insights

into the evolution of the W chromosome in Lepidoptera. *Journal of Heredity*, 108: 709-719

Dalíková, M., Zrzavá, M., Kubičková, S., Marec, M. (2017b). W-enriched satellite sequence in the Indian meal moth, *Plodia interpunctella* (Lepidoptera, Pyralidae). *Chromosome Research*, 25: 3-4

Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5, 113.

Fuková, I., Traut, W., Vítková, M., Nguyen, P., Kubičková, 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

Hackstein, J. H. P., Hochstenbach, R., Hauschteck-Jungen, E., & Beukeboom, L. W. (1996). Is the Y chromosome of *Drosophila* an evolved supernumerary chromosome? *BioEssays*, 18(4), 317-323

Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., & Hallwachs, W. (2004). Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(41), 14812–14817

Hejníčková, M., Dalíková, M., Potocký, P., Tammaru, T., Trehubenko, M., Kubičková, S., ... & Zrzavá, M. (2021). Degenerated, Undifferentiated, Rearranged, Lost: High Variability of Sex Chromosomes in Geometridae (Lepidoptera) Identified by Sex Chromatin. *Cells*, 10(9), 2230

Hoang, D. T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q., & Vinh, L. S. (2018). UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. *Molecular Biology and Evolution*, 35(2), 518–522

Jánová, N., (2021). Genetické markery pro druhovou identifikaci a studium genetické variability forenzně významných druhů masařek (Sarcophagidae). [Genetic markers

for species identification and study of genetic variability of forensically important Flesh flies (Sarcophagidae). Bc. Thesis, in czech.] – 93p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Kaiser, V. B., & Bachtrog, D. (2010). Evolution of sex chromosomes in insects. *Annual review of genetics*, 44, 91–112

Kiuchi, T., Koga, H., Kawamoto, M. et al. (2014). A single female-specific piRNA is the primary determiner of sex in the silkworm. *Nature*, 509, 633–636

Kristensen, N.P., Skalski, A.W. (1999). In: Handbuch der Zoologie, a Natural History of the Phyla of the Animal Kingdom, Vol. IV, Arthropoda: Insecta, Part 35, Lepidoptera, Moths and Butterflies, Vol. 1: Evolution, Systematics, and Biogeography. pp. 7–25.

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

Mongue, A. J., Nguyen, P., Voleníková, A., & Walters, J. R. (2017). Neo-sex chromosomes in the monarch butterfly, *Danaus plexippus*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 7(10), 3281-3294.

Nguyen, L.T., Schmidt, H. A., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2014). IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1), 268–274.

Nokkala, S., Grozeva, S., Kuznetsova, V., & Maryanska-Nadachowska, A. (2003). The origin of the achiasmatic XY sex chromosome system in *Cacopsylla peregrina* (Frst.) (Psylloidea, Homoptera). *Genetica*, 119(3), 327–332

Pinkrová, K. (2020). “Role repetitivních sekvencí v molekulární diferenciaci pohlavních chromosomů bělásků rodu *Pieris*.” [The role of repetitive sequences in molecular diversifications of sex chromosomes in white butterflies of genus *Pieris*. Bc. Thesis, in

Czech.] – 40 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Rathjens, B., (1974). Zur Funktion des W-Chromatins bei *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). Isolierung und Charakterisierung von W-Chromatin-Mutanten. *Chromosoma*, 47: 21-44

Reichholf-Riehm, Helgard. (2005). Motýli: Průvodce přírodou. 2. ČR: Ikar. ISBN 80-7176-318-7

Robinson, R. (1971). *Lepidoptera Genetics*. Pergamon Press, Oxford

Sahara, K., Marec F., Eickhoff U., Traut W. (2003). Moth sex chromatin probed by comparative genomic .hybridization (CGH). *Genome*, 46:339–342

Sahara, K., Marec, F., a Traut, W. (1999). TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Research*, 7(6), 449–460

Sahara K., Yoshido, A., a Traut, W. (2012). Sex Chromosome Evolution in Moths and Butterflies. *Chromosome Research*, 20 (1): 83–94

Silva, G. S., & Souza, M. M. (2013). Review Genomic in situ hybridization in plants. *Genetics and Molecular Research*, 12(3), 2953–2965

Sobit, R. C., Obe, G., & Athwal, R. S. (Eds.). (2002). Some aspects of Chromosome structure and functions. *Springer Netherlands*

Song, H., Buhay, J. E., Whiting, M. F., & Crandall, K. A. (2008). Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(36), 13486–13491

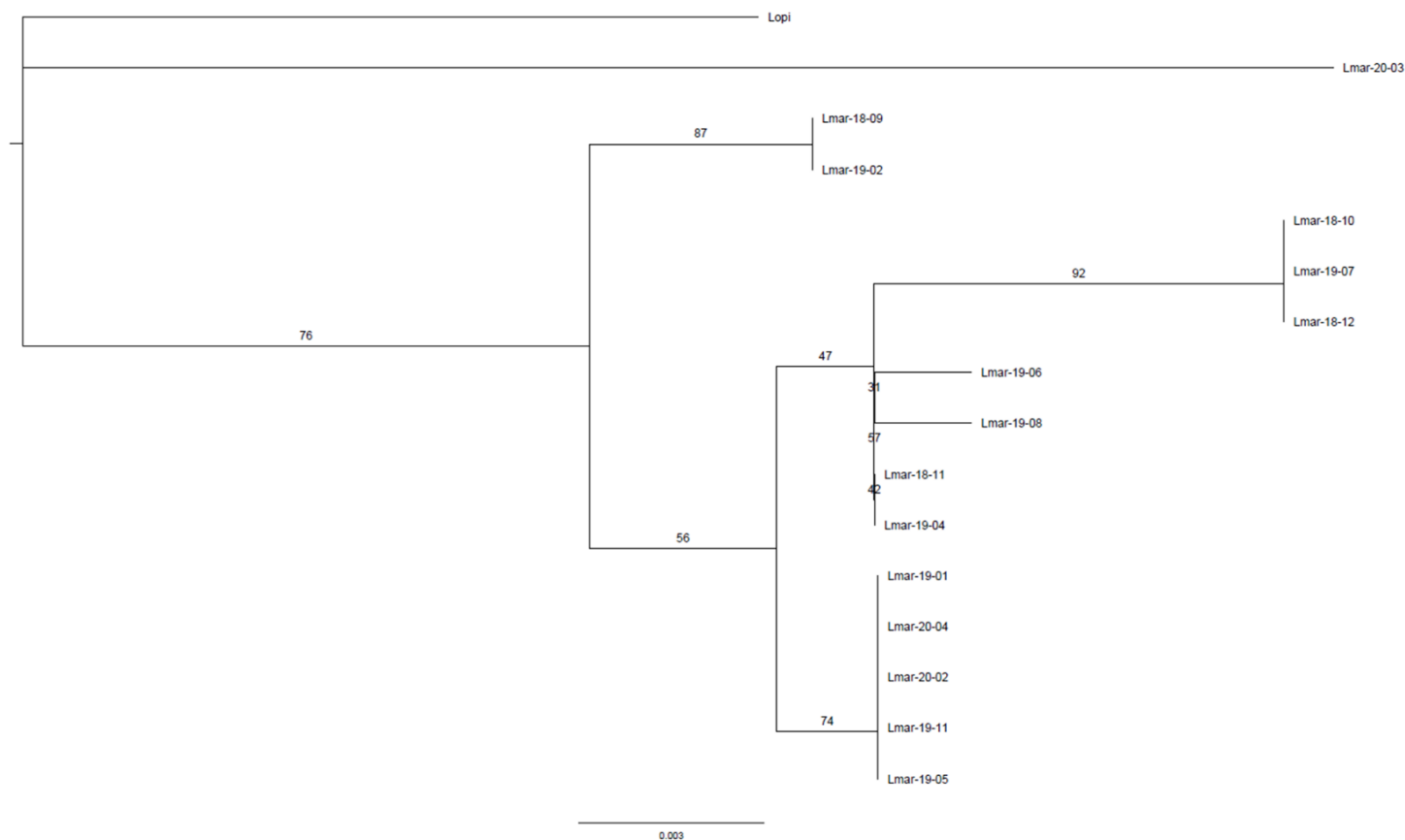
Traut, W., Weith, A., and Traut, G. (1986). Structural mutants of the W chromosome in *Ephestia* (Insecta, Lepidoptera). *Genetica (The Hague)*, 70: 69-79

- Traut W., Marec, F. (1996). Sex Chromatin in Lepidoptera. *Quarterly Review of Biology*, 71 (2): 239–56
- Traut, W., Sahara, K., Otto, T. D., & Marec, F. (1999). Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma*, 108(3), 173–180
- Traut, W., Sahara, K., Marec, F. (2007) Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sexual Development*, 1: 332–346.
- 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
- van Nieukerken, E.J., Kaila, L., Kitching, I.J., Kristensen, N.P., Lees, D.C., et al. (2011). Order Lepidoptera Linnaeus, 1758. In: Zhang Z.Q., editor. Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness. *Zootaxa*, 3148
- Vítková, M., Fuková, I., Kubíčková, S., a Marec, F. (2007). Molecular Divergence of the W Chromosomes in Pyralid Moths (Lepidoptera). *Chromosome Research*, 15 (7): 917–30
- Voleníková, A., (2012): Aberantní výskyt heterochromatinu u zavíječe moučného *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). [The occurrence of an aberrant heterochromatine in the Mediterranean flour moth *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera). Bc. Thesis, in Czech.] – 43 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
- Voleníková, A., (2015). Analýza pohlavních chromosomů vybraných druhů bazálních motýlů z čeledi hrotnokřídlecovití (Lepidoptera: Hepialidae). [Karyotype and sex chromosomes analysis of two species from basal lepidopteran family Hepialidae (Lepidoptera: Hepialidae), Mgr. Thesis, in Czech.] 58 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

- Winnepeninckx, B., Backeljau, T., a Wachter, R. D.. (1993). Extraction of High Molecular Weight DNA from Molluscs. *Technical Tips*. 9 (12): 407
- Yasukochi, Y., Ashakumary, L. A., 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
- Yoshido, A., Yamada, Y., a Sahara, K. (2006). The W chromosome detection in several lepidopteran species by genomic in situ hybridization (GISH). *Journal of Insect Biotechnology and Sericology*, 75: 147–151
- Yoshido, A., Sahara, K., Marec, F. et al. (2011). Step-by-step evolution of neo-sex chromosomes in geographical populations of wild silkmths, *Samia cynthia* ssp.. *Heredity*, 106, 614–624
- Yoshido, A., Marec, F., & Sahara, K. (2016). The fate of W chromosomes in hybrids between wild silkmths, *Samia cynthia* ssp.: no role in sex determination and reproduction. *Heredity*, 116(5), 424–433
- Zrzavá, M., Hladová, I., Dalíková, M., et al. (2018). Sex Chromosomes of the Iconic Moth *Abraxas grossulariata* (Lepidoptera, Geometridae) and Its Congener *A. sylvata*. *Genes* (Basel). 2018;9(6):279

8. Přílohy

Příloha 1: Fylogenetické vztahy rodin skvrnopásníka na základě COI (barcoding).



Fylogenetické vztahy zkoumaných rodin *L. marginata* na základě částečné sekvence mitochondriálního genu pro cytochrom oxidázu I (COI). Bootstrap - 1000 opakování. Délka větví ukazuje rychlost molekulární evoluce (viz úsečka = množství substitucí na jednu pozici). Lopi = *L. opis*, outgroup. Fylogenetický strom byl vytvořen metodou Maximum likelihood v programu IQTree RNDr. Zdeňkem Faltýnkem Fricem, Ph.D.

Příloha 2: Tabulka identit: procenta bází, které jsou mezi jednotlivými sekvencemi identické vytvořené programem Geneious.

	F20-03	L.opis	F18-09	F19-02	F18-10	F18-12	F19-07	F19-01	F19-05	F19-11	F20-02	F20-04	F19-06	F19-08	F18-11	F19-04
F20-03		97.476	97.319	97.319	97.476	97.476	97.476	97.319	97.319	97.319	97.319	97.319	97.003	97.003	97.161	97.161
L.opis	97.476		97.950	97.950	97.476	97.476	97.476	97.950	97.950	97.950	97.950	97.950	97.950	97.634	97.792	97.792
F18-09	97.319	97.950		100.000	98.896	98.896	98.896	99.211	99.211	99.211	99.211	99.211	99.054	99.054	99.211	99.211
F19-02	97.319	97.950	100.000		98.896	98.896	98.896	99.211	99.211	99.211	99.211	99.211	99.054	99.054	99.211	99.211
F18-10	97.476	97.476	98.896	98.896		100.000	100.000	99.054	99.054	99.054	99.054	99.054	99.211	99.211	99.369	99.369
F18-12	97.476	97.476	98.896	98.896	100.000		100.000	99.054	99.054	99.054	99.054	99.054	99.211	99.211	99.369	99.369
F19-07	97.476	97.476	98.896	98.896	100.000	100.000		99.054	99.054	99.054	99.054	99.054	99.211	99.211	99.369	99.369
F19-01	97.319	97.950	99.211	99.211	99.054	99.054	99.054		100.000	100.000	100.000	100.000	99.527	99.527	99.685	99.685
F19-05	97.319	97.950	99.211	99.211	99.054	99.054	99.054	100.000		100.000	100.000	100.000	99.527	99.527	99.685	99.685
F19-11	97.319	97.950	99.211	99.211	99.054	99.054	99.054	100.000	100.000		100.000	100.000	99.527	99.527	99.685	99.685
F20-02	97.319	97.950	99.211	99.211	99.054	99.054	99.054	100.000	100.000	100.000		100.000	99.527	99.527	99.685	99.685
F20-04	97.319	97.950	99.211	99.211	99.054	99.054	99.054	100.000	100.000	100.000	100.000		99.527	99.527	99.685	99.685
F19-06	97.003	97.950	99.054	99.054	99.211	99.211	99.211	99.527	99.527	99.527	99.527	99.527		99.685	99.842	99.842
F19-08	97.003	97.634	99.054	99.054	99.211	99.211	99.211	99.527	99.527	99.527	99.527	99.527	99.685		99.842	99.842
F18-11	97.161	97.792	99.211	99.211	99.369	99.369	99.369	99.685	99.685	99.685	99.685	99.685	99.842	99.842		100.000
F19-04	97.161	97.792	99.211	99.211	99.369	99.369	99.369	99.685	99.685	99.685	99.685	99.685	99.842	99.842	100.000	