

Van Dagpauwoog en Atalanta naar 452 chromosomen

Chromosomen : een inleiding

Kurt Jonckheere
VVE Werkgroep Dagvlinders
25 februari 2023

1) Morfologische kenmerken

- Dagpauwoog + Atalanta
 - => 2 soorten



Boswitjes uit Zuid-Frankrijk

- 42 : L. ??? (Provence)
- 63 : L. ??? (Isère)



2) Genitaliën

- Leptidea spec
 - *L. sinapis*
 - *L. reali/juvernica* ?

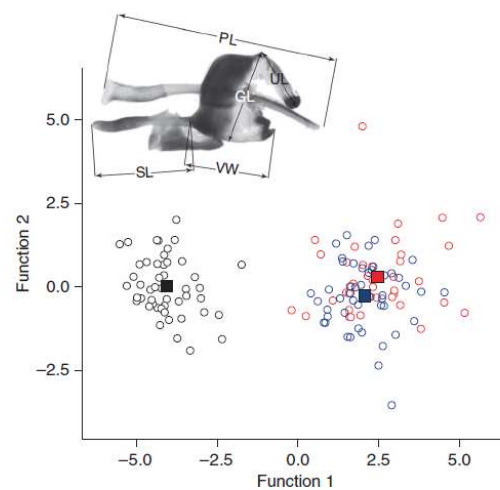


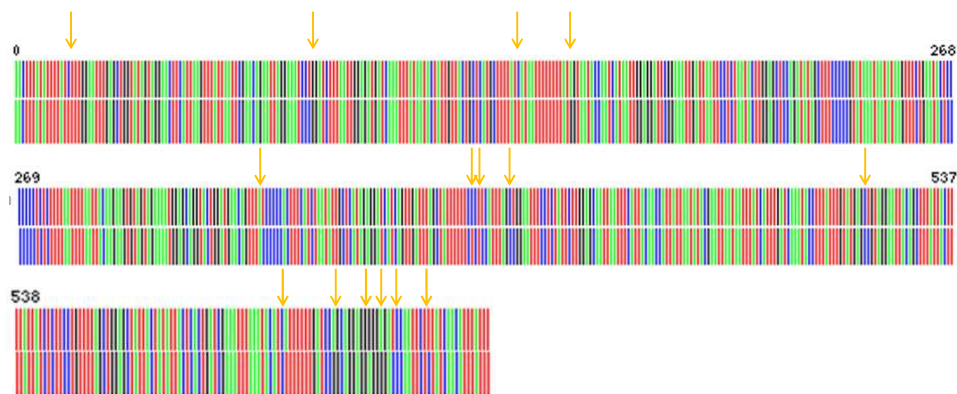
Figure 4 | Discriminant analysis based on male genitalia morphometry. *L. sinapis* (black) is identifiable based on male genitalia, but there is broad overlap between *L. reali* (red) and *L. juvernica* stat. nov. (blue). Circles represent individuals and squares represent centroids for each species. Elements of the male genitalia measured were PL, SL, VW, GL and UL. The discriminant variables were PL and SL for function 1 and SL and VW for function 2. The upper left corner image indicates the variables measured for *Leptidea* male genitalia.

Boswitjes uit Zuid-Frankrijk

- 42 : L. ??? (Provence)
- 63 : L. ??? (Isère)



Vergelijk 42 – 63 (via het gekende mtDNA barcoding)
(reali – juvernica)
 (Provence - Isère)



- 15 verschillen (op 658 bp) ~ 2,3 %

Boswitjes uit Zuid-Frankrijk

• 42 : L. *reali* (Provence)

63 : L. *juvernica* (Isère)



3) mt-DNA barcoding

- Per soort ook nog variatie van mt DNA binnen de soort
 - haplotypes
- => Interspecifiek (tussen soorten) ?
- => Intraspecifiek (binnen soorten) ?
- IGV (zie vorige presentatie Vlad + Sylvain :)
 - “Atlas of mitochondrial diversity of Western Palearctic butterflies”
- => mt DNA bezorgt ons informatie over de evolutie van en binnen soorten en soortvorming.

4) UV licht + kleurmeting lichtreflectie

- Reflectie of absorptie van UV licht
 - *Colias spec* (Kudrna, Phegea 48, 2020)
- Verse exemplaren



Fig. 17. *Colias myrmidonae* [Evers, [1781]] – Czechia: S.E. Moravia (conventional lighting).



Fig. 1. *Colias afacarensis* Rott., 1805 – Germany: N.W. Bavaria (conventional lighting).

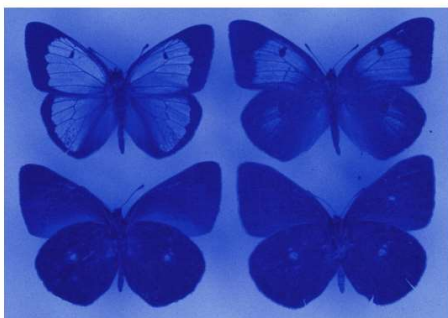


Fig. 18. *Colias myrmidonae* [Evers, [1781]] – Czechia: S.E. Moravia (UV lighting).

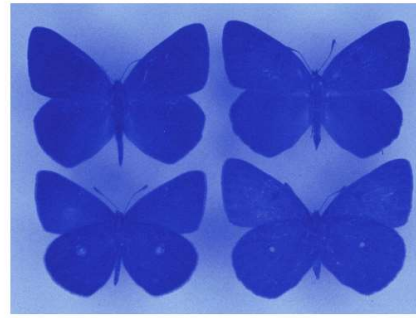
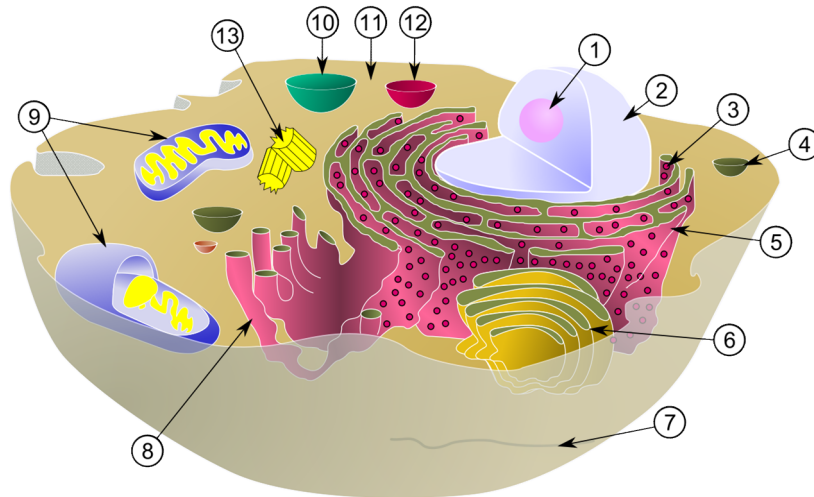


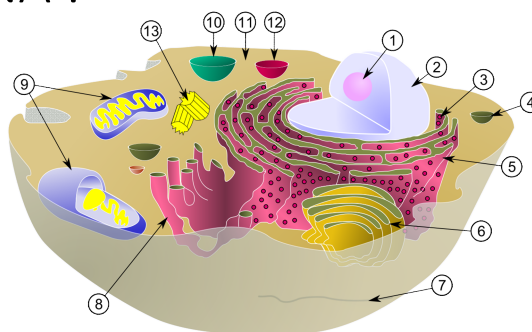
Fig. 2. *Colias afacarensis* Rott., 1805 – Germany: N.W. Bavaria (UV lighting).

Cel :



Mithochondriaal DNA :

• Mitochondrion :



- Energie-machines : maken energie aan voor de cel
- Zijn met velen (+- honderden per cel)
- Bevatten een deel van het DNA (bij dieren)
- (bron Wiki :)

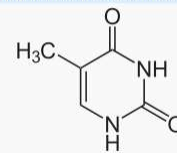
DNA ?? Wat ?

- Een groot molecuul
- Bevat genen => eiwitten
- Bevat erfelijke informatie : hoe zie je eruit, welke soort ben je, ...
- Bestaat uit "blokjes" (nucleotiden) verbonden door "basen"
- Slechts 4 soorten "blokjes"
 - Adenine (A)
 - Thymine (T) (bron : Wiki :)
 - Guanine (G)
 - Cytosine (C)

Basenpaar



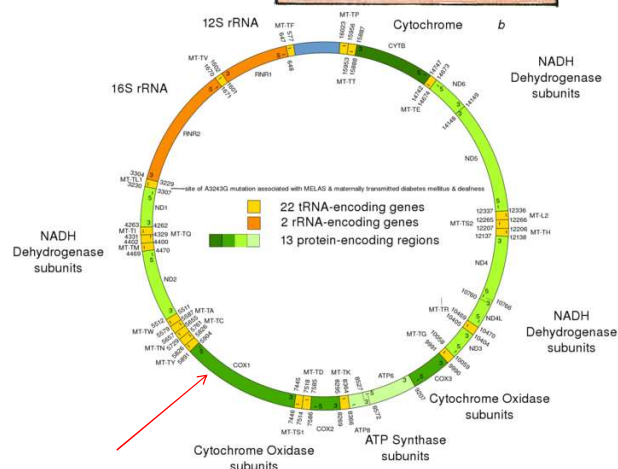
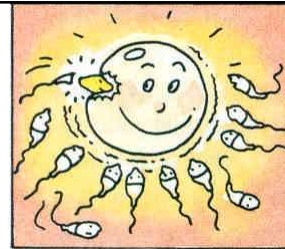
Structuurformule en molecuulmodel



Structuurformule van thymine

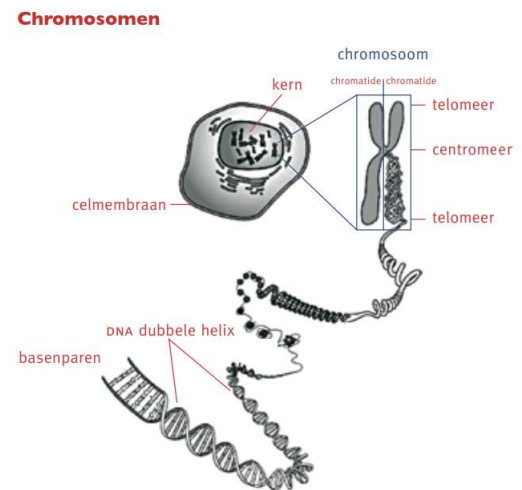
Mitochondriaal DNA :

- Gebruikt om eiwitten te maken.
- Komt enkel van de moeder
 - Weinig evolutie in dit DNA (niet zoals kernDNA)
- DNA-barcoding !!



5) Kern DNA / Chromosomen

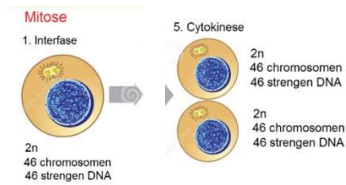
- Bevatten het grootste deel van het erfelijk materiaal : “genen”
- Opgelet ! : “X” enkel te zien tijdens celdeling ! (zie verder)



En dan nu wat details :

A) De “Normale” celdeling : Mitose

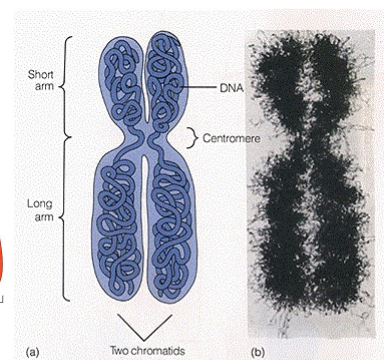
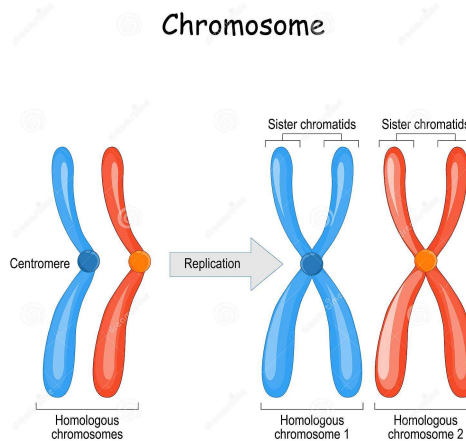
- Na deze eerste cel...



- 1 cel => 2 cellen
 - (een copietje maken met exact dezelfde info: verdubbelen en splitsen)
- 2 cellen => 4 cellen
- Enzovoorts...
- => Groeien, groeien,... en cellen vernieuwen

Celdeling :

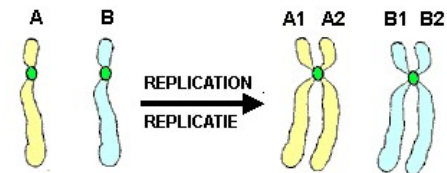
- Chromosoom
 - Deel 1)
copiëren/verdubbelen :
 - Bivalent chromosoom
 - Bestaan uit 2 dezelfde (zuster) chromatiden



Een chromosoom, maximaal gecondenseerd DNA, bestaat uit twee exacte kopieën van een DNA-streng. Deze kopieën worden chromatide genoemd. Een chromosoom bevat dus twee strengen DNA.

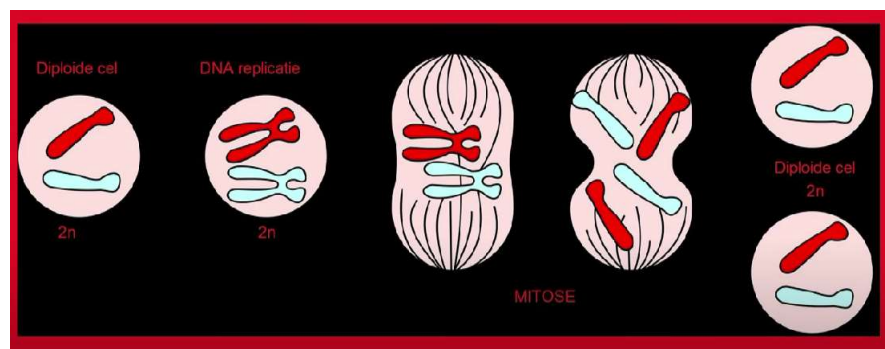
Celdeling : vermenigvuldiging van de chromosomen

- **Zusterchromatiden** (met de uitgang *tiden*), zijn de **twee identieke (= precies gelijk)** delen (**Chromatiden**), die door middel van replicatie uit een chromosoom ontstaan. (In de figuur hiernaast zijn dus de zusterchromatiden A1 en A2, maar ook het setje B1 en B2, precies gelijk aan elkaar, **terwijl homologen (homologe chromosomen) A's en B's kleine verschillen vertonen**). Die twee delen blijven chromatiden heten zolang ze via het centromeer met elkaar verbonden zijn; dat is dus het geval gedurende de hele S fase volgend op duplicatie van het DNA (replicatie). Die bindingsplaats is gedurende de mitose of meiose zichtbaar in de vorm van een insnoering. Gedurende de anafase in mitose en anafase II in meiose worden de twee zusterchromatiden bij het centromeer uit elkaar getrokken. Volgens gangbare definities wordt elke losse chromatide na scheiding van de chromatiden gedurende celdeling als een apart chromosoom beschouwd.



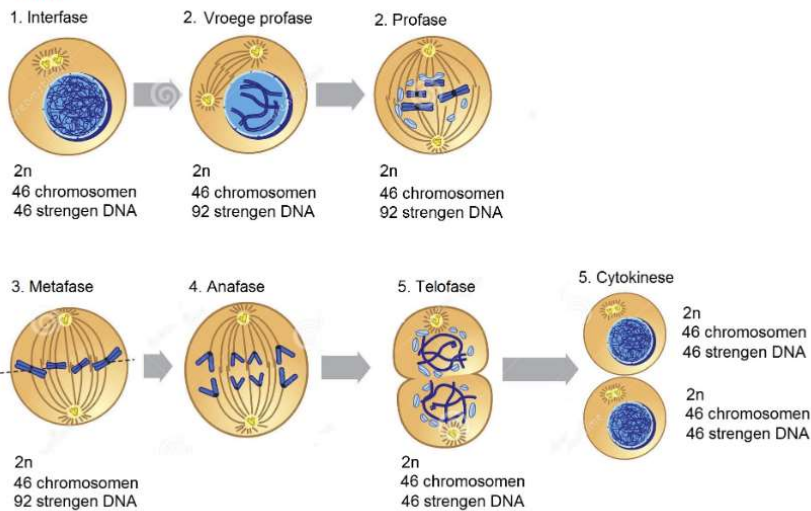
A) De “Normale” celdeling : Mitose

- Deel 1) copietje maken / dupliceren / replicatie
- Deel 2) splitsen => 2 exacte copietjes
- Van diploide cellen (met 2 sets van chromosomen, eentje van papa, eentje van mama)
- naar 2 identieke diploide cellen (met 2 sets van chromosomen)



A) De “Normale” celdeling : Mitose

Mitose

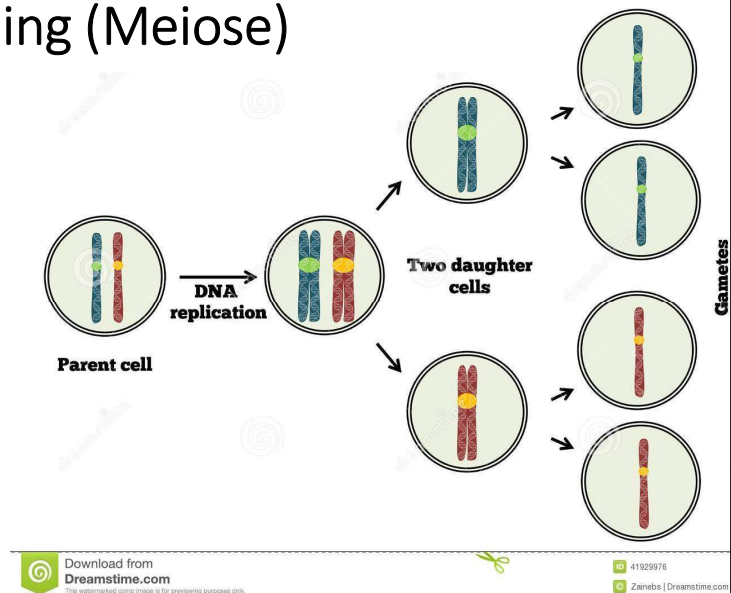


B) Celdeling in de geslachtsklieren : geslachtsdeling (Meiose)

- Aanmaken zaadcellen / eicellen
- Van 2n naar 4 cellen met n
- Met crossover !!

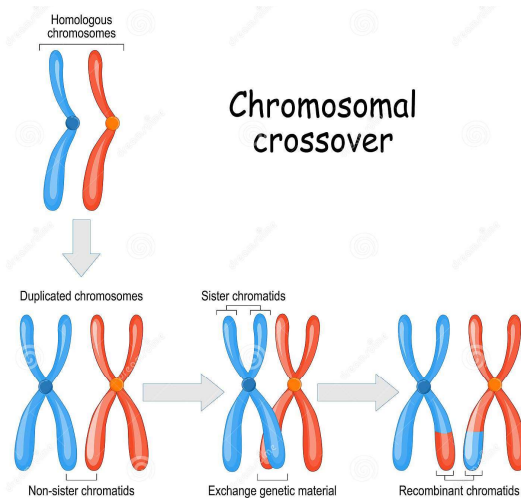
B) Celdeling in de geslachtsklieren : geslachtsdeling (Meiose)

- Van 1 cel met $2n$ naar 4 cellen met n chromosomen
- Van diploide cel (met 2 sets van chromosomen)
- Naar haploide cellen (met een enkele set chromosomen), niet identiek (zie volgende slide)



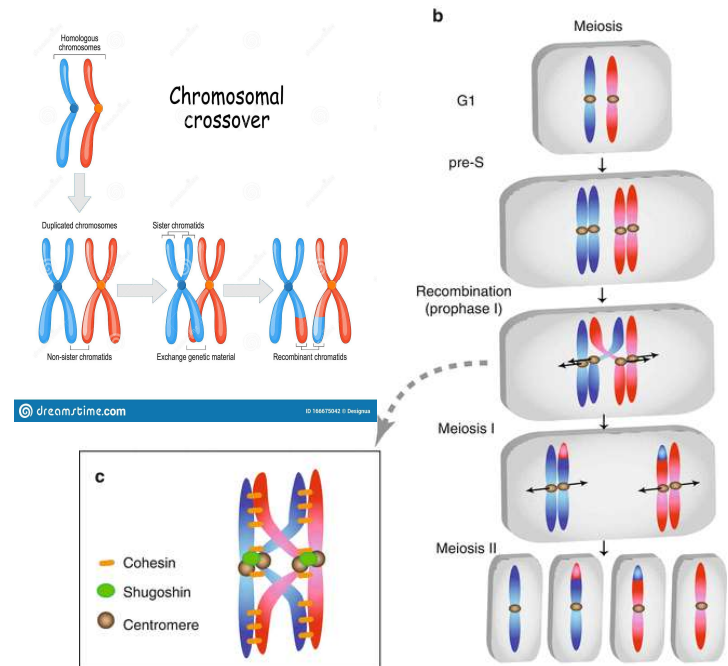
B) Celdeling in de geslachtsklieren : geslachtsdeling (Meiose)

- Pa en ma chromosoom :



- Crossover/recombinatie :

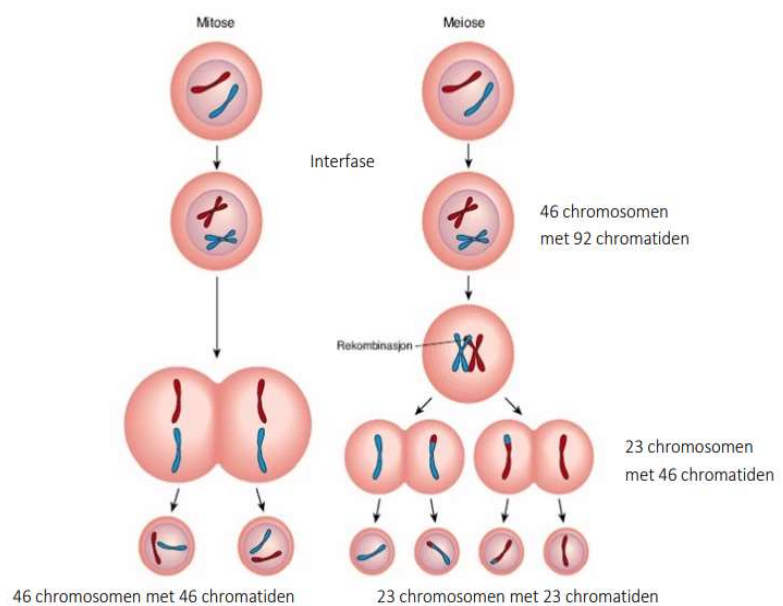
B) Celdeling in de geslachtsklieren : geslachtsdeling (Meiose)



Vergelijkende samenvatting:

Celdeling : Samenvattend :

- A) Mitose (normale)
- B) Meiose (geslachts)

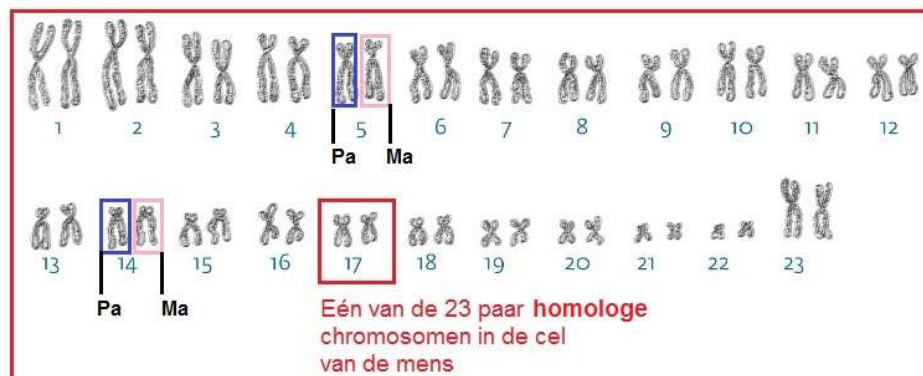


Chromosomen : de mens

- 23 paar chromosomen ($n = 23$, $2n = 46$)
 - Mensapen 24 paar, chromosoom 2 van de mensen is een fusie van 2 chromosomen van de mensapen.
- Elke “soort” heeft “normaal gezien” een vast aantal chromosomen

Homologe chromosomen

- Homologe chromosomen : 2 “overeenkomstige” chromosomen, 1 van de pa en 1 van de ma
- Vb : mens : 23 paar chromosomen
- Karyogram/chromosomenkaart : chromosomen gerangschikt van groot naar klein (behalve X en “X of Y” op het einde)



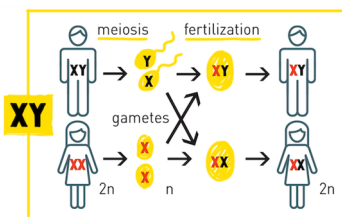
Chromosomen : vlinders

- n paar (dus $2n$) chromosomen
 - Afhankelijk van de soort
- Elke “soort” heeft “normaal gezien” een vast aantal chromosomen
- W en Z (zoals X en Y bij de mens)

Mens :

- Eicel : 1 X-chromosoom
- **Zaadcel : 1 X of 1 Y** – chromosoom

- => na de bevruchting :
 - XX => meisje
 - XY => jongen



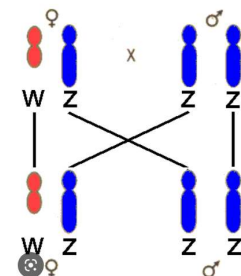
x x
female

x y
male

Vlinder

- **Eicel : 1 W of 1 Z**-chromosoom
- **Zaadcel : 1 Z** – chromosoom

- => na de bevruchting :
 - WZ => meisje
 - ZZ => jongen



Als het fout loopt ...

- trisomie-21 ofwel het **syndroom van Down**
- **Eerste quizvraag :**
- **Down the road**
 - Vlinders in de buik...

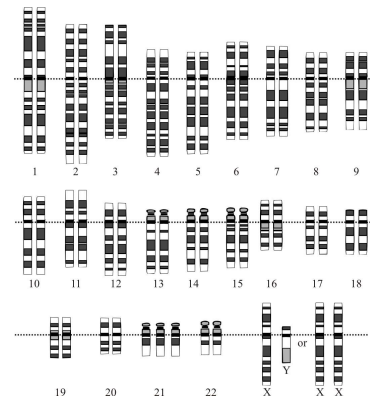
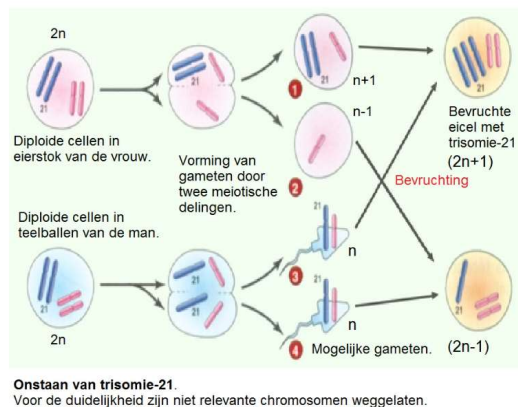


Trisomie-21

- Tweede quizvraag : wat was/is “Trisomie-21” nog ?
- Tip : jaren ‘80
- <https://youtu.be/A3ZVZVMIG7g?t=144>
- Franse New wave / Darkwave / Gothic band

Trisomie-21 : Foutje bij de geslachtelijke celdeling /Meiose

Trisomie-21



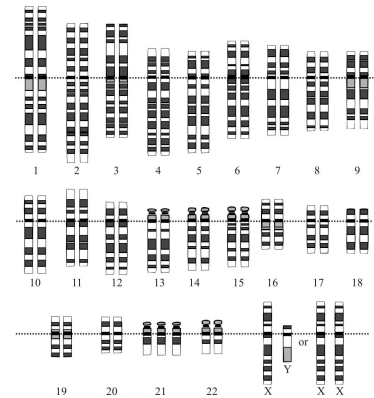
Algemeen : foutjes ...

Wijzigingen in chromosomen en chromosomenaantal :

- Fission (fragmentation) : **Splitsen**
 - Splitsen van een "groot" chromosoom in "1 of meerdere" kleine chromosomen
- Fusion/Translocatie :
 - **Samenvoegen/ invoegen/verplaatsen** van een stukje chromosoom in een ander chromosoom
- Duplication :
 - **Kopie** van een (stukje) chromosoom
- Deletion (disappearance) :
 - **Verdwijnen** van een (stukje) chromosoom
- ...

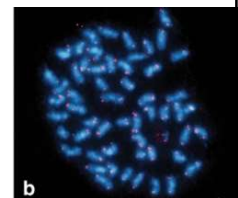
Tellen van chromosomen : (Karyotype/Karyogram : chromosomenkaart) werkwijze (**algemeen**)

- Best te tellen tijdens de celdeling
- Kweken van cellen
- Stof toevoegen die de cellen doet opzwellen en openbarsten en de chromosomen uiteendrijft (zodat ze gemakkelijker te bekijken zijn)
- Kleuren met markers om ze gemakkelijker te tellen / kunnen bekijken met de microscoop



Tellen van chromosomen : (Karyotype/Karyogram : chromosomenkaart) werkwijze (**vlinders**)

- Verwijderen (mannelijke) geslachtsorganen in het veld (+fixeren bij 4°C)
- Nadien bij 20°C in een druppel melkzuur de geslachtsklieren eruithalen
- Spermatocysten met chromosomen bekijken
- Of/en Kleuren met FISH (Flourescence in situ hybridization)
- bekijken met de microscoop



Kijken naar chromosomen bij vlinders :

- Meeste soorten hebben een vast aantal chromosomen
 - Normaal gezien verdwijnen foutjes
- Sommige soorten niet...
 - “foutjes” bij splitsen/samenvoegen/... kunnen behouden blijven binnen de soort of zorgen voor nieuwe soorten

Chromosomen bij vlinders : enkele voorbeelden :

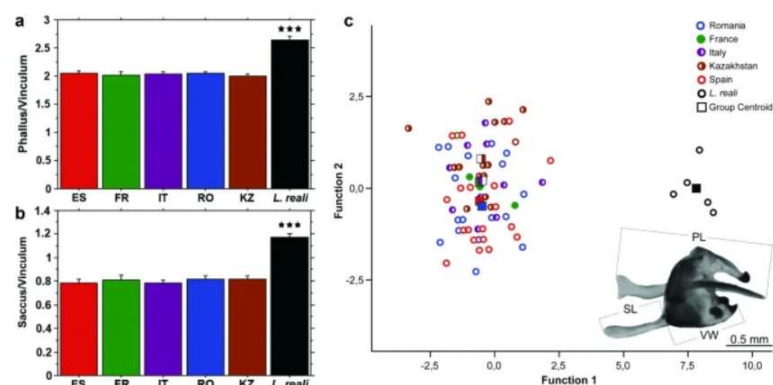
- Leptidea ...
 - L. sinapis / reali / juvernica
- Polyommatus ...
 - Algemeen
 - Een recente ontdekking ...
 - Veel chromosomen...
- Meer in detail :
 - Colias : een voorbeeld
 - ...

Leptidea

- Lukhtanov, V.A., Dincă, V., Talavera, G. *et al.* Unprecedented within-species chromosome number cline in the Wood White butterfly *Leptidea sinapis* and its significance for karyotype evolution and speciation. *BMC Evol Biol* **11**, 109 (2011).
<https://doi.org/10.1186/1471-2148-11-109>
 - *Leptidea sinapis*
- Šíchová, J., Voleníková, A., Dincă, V. *et al.* Dynamic karyotype evolution and unique sex determination systems in *Leptidea* wood white butterflies. *BMC Evol Biol* **15**, 89 (2015).
<https://doi.org/10.1186/s12862-015-0375-4>
 - *Leptidea sinapis/reali/juvernica*

Leptidea sinapis (Boswitje)

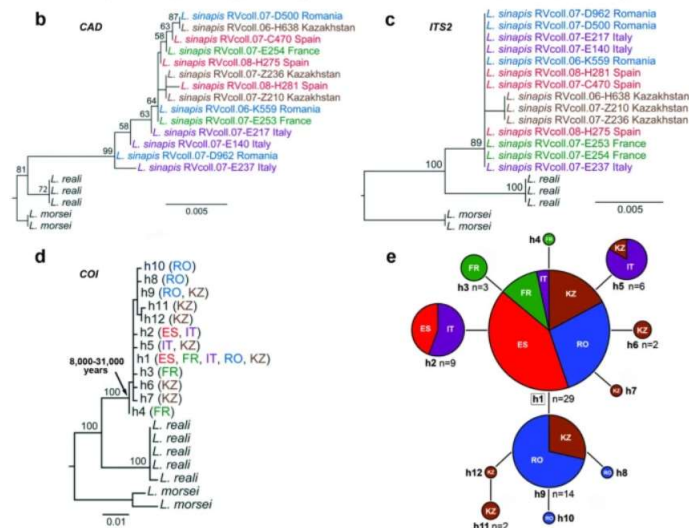
Figure 2



Male genitalia morphology of *Leptidea sinapis* reveals no significant intraspecific differences. One-way ANOVA for **a.** phallus length/vinculum width and **b.** saccus length/vinculum width. The sibling species *L. reali* is included as positive control. Only *L. reali* versus all *L. sinapis*

Leptidea sinapis (Boswitje)

- DNA barcoding (mtDNA)
- ITS2/CAD

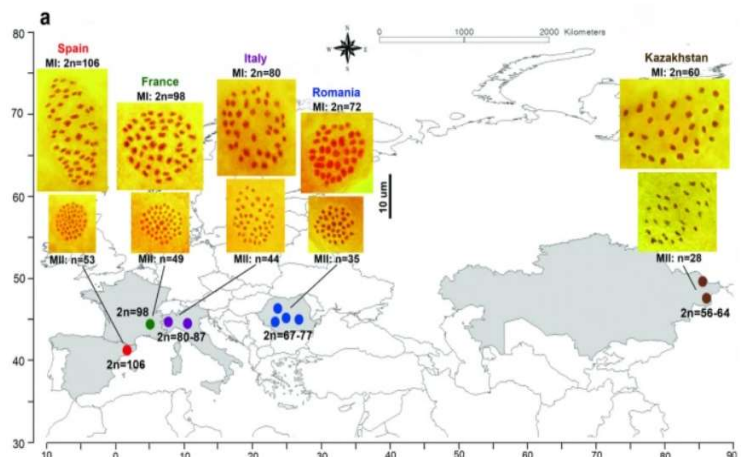


Chromosomal cline in *Leptidea sinapis* across the Palearctic region. a. Sampling sites and

Leptidea sinapis (Boswitje)

- Getelde diploide chromosomenaantal ($2n$) (metaphase I van meiose (MI))
- Van Spanje tot Kazachstan
- 6000 km
- **$2n$ van 106 tot 60**

Figure 1

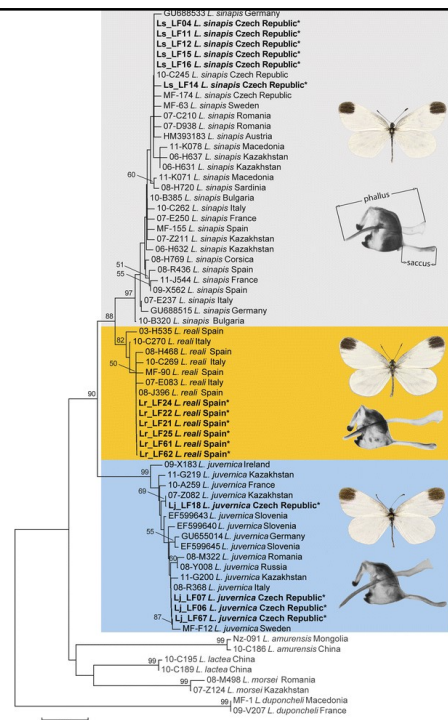


Leptidea sinapis (Boswitje)

- Maar morfologische en genitatieën geen variatie over deze grote afstand
- => grootste gekende intraspecifieke variatie in chromosomenaantallen !

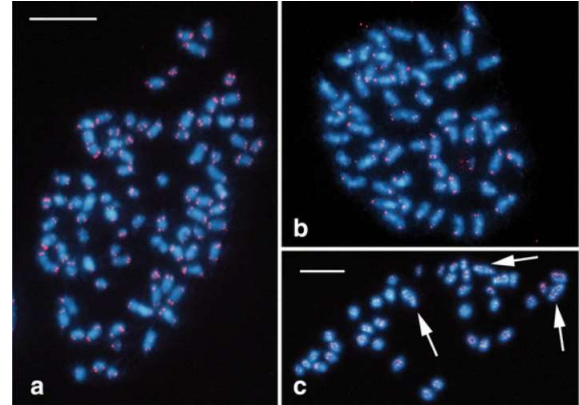
Leptidea spec. (Europa)

- Even heropfrissen :
 - mt DNA



Leptidea spec. (Europa) : chromosomendiagram

- *L. juvernica* : $2n = 85$ to 91
- *L. sinapis* : $2n = 69$ to 73
- *L. reali* : $2n = 51$ to 55
- Ook zelfs variatie bij kinderen van eenzelfde moeder



Karyotype analysis of mitotic and meiotic chromosomes of *Leptidea* species by FISH with the $(TTAGG)_n$ telomeric probe. Hybridization signals of the Cy3-dUTP-labelled telomeric probe (red) indicate chromosome ends in (a–c). Chromosomes were counterstained with DAPI (blue). White arrows indicate chromosome multivalents and asterisks show heterochromatic blocks. **a** Mitotic metaphase of *L. juvernica* female with numerous middle- or small-sized chromosomes ($2n = 85$). **b** Mitotic metaphase of *L. reali* female with large chromosomes of a similar size ($2n = 55$). **c** Meiotic metaphase I of *L. juvernica* male showing several chromosome multivalents. **d** Meiotic pachytene complement of *L. juvernica* female showing several chromosome multivalents and

Leptidea spec. (Europa)

- Aantal chromosomen
 - *L. juvernica* : $2n = 85$ tot 91 (Czech population)
 - *L. sinapis* : $2n = 69$ tot 73 (Czech population)
 - *L. reali* : $2n = 51$ tot 55 (Spanish population)
- Zeer dynamische wijzigingen van chromosomen gevonden :
 - splitsing / samenvoeging/ copies/ verplaatsingen
 - Kan bijdragen tot isolatie van soorten

Leptidea spec. (Europa)

• Vrouwelijke geslachtschromosomen

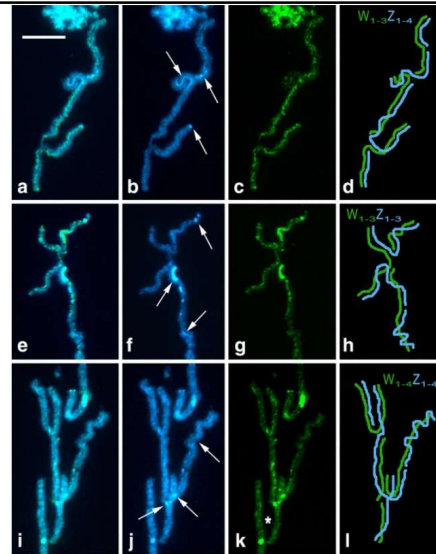
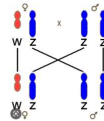
- *L. juvernica* :
- *L. sinapis* :
- *L. reali* :

Vlinder

- Eicel : 1 W of 1 Z -chromosoom
- Zaadcel : 1 Z -chromosoom

• => na de bevruchting :

- WZ => meisje
- ZZ => jongen

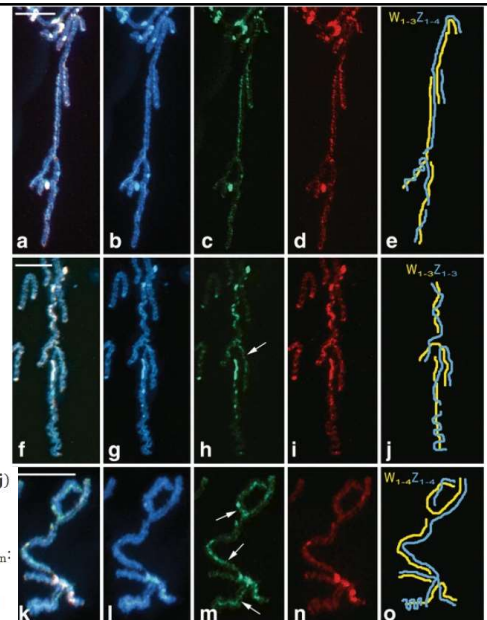


Genomic *in situ* hybridization (GISH) in pachytene oocytes of *Leptidea juvernica* (a–d), *L. sinapis* (e–h) and *L. reali* (i–l). Female-derived genomic probes were labelled with fluorescein-12-dUTP (green) and chromosomes were counterstained with DAPI (blue). Figures (a–d), (e–h) and (i–l) show detailed analyses of sex chromosome multivalents $W_{1-n}Z_{1-n}$: (a, e, i) merged images of female genomic probes and DAPI staining; (b, f, j) DAPI images; arrows indicate DAPI-positive W-chromosome segments and heterochromatic blocks at the end of the W chromosomes; (c, g, k) hybridization pattern of the female genomic probes; the asterisk indicates an undifferentiated segment of one of the W chromosomes; (d, h, l) schematic drawings of the sex chromosome multivalents. Scale bar = 10 μ m

Leptidea spec. (Europa)

• Vrouwelijke geslachtschromosomen

- *L. juvernica* : $W_1W_2W_3Z_1Z_2Z_3Z_4$
- *L. sinapis* : $W_1W_2W_3Z_1Z_2Z_3$
- *L. reali* : $W_1W_2W_3W_4Z_1Z_2Z_3Z_4$



Comparative genomic hybridization (CGH) in pachytene oocytes of *Leptidea juvernica* (a–e), *L. sinapis* (f–j) and *L. reali* (k–o). Female-derived genomic probes were labelled with fluorescein-12-dUTP (green), male-derived genomic probes were labelled with Cy3-dUTP (red) and chromosomes were counterstained with DAPI (blue). Figures (a–e), (f–j) and (k–o) show detailed analyses of sex chromosome multivalents $W_{1-n}Z_{1-n}$: (a, f, k) merged images of both genomic probes and DAPI staining; (b, g, l) DAPI images; (c, h, m) female genomic probes; arrows indicate W-chromosome segments with female-specific hybridization pattern; (d, i, n) male genomic probes; (e, j, o) schematic drawings of the sex chromosome multivalents. Scale bars = 10 μ m

Leptidea spec. (Europa)

- Vrouwelijke geslachtschromosomen
- Uniek patroon van W en Z :

- *L. juvernica* : $W_1W_2W_3Z_1Z_2Z_3Z_4$
- *L. sinapis* : $W_1W_2W_3Z_1Z_2Z_3$
- *L. reali* : $W_1W_2W_3W_4Z_1Z_2Z_3Z_4$

=> Wellicht bijgedragen tot ontstaan van deze drie soorten

Polyommatus spec

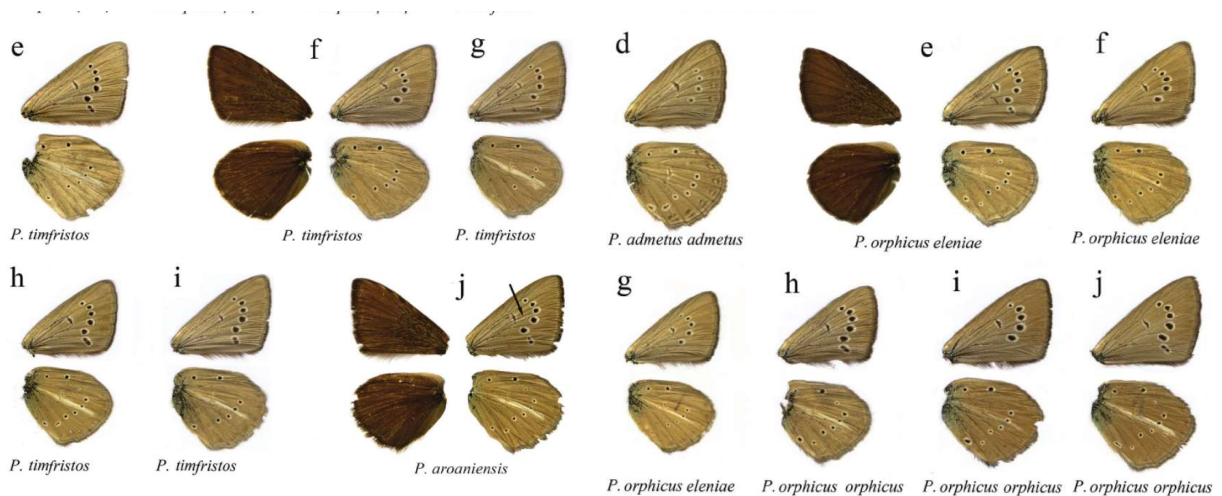
- <https://academic.oup.com/biolinnean/article/130/4/683/5868449>
- <https://academic.oup.com/sysbio/article/53/2/278/1691215?login=false>
- https://www.researchgate.net/publication/311773388_Karyosystematics_and_molecular_taxonomy_of_the_anomalous_blue_butterflies_Lepidoptera_Lycaenidae_from_the_Balkan_Peninsula

Polyommatus spec

- genus *Polyommatus*
 - Grootste gekende variatie van chromosomenaantallen binnen een genus
 - $2n$: 20 tot 452 chromosomen
 - Variatie voor een soort tussen populaties
 - Variatie voor een soort binnen populaties

Polyommatus spec in de Balkan

- Heel wat op elkaar gelijkende soorten in de Balkan...



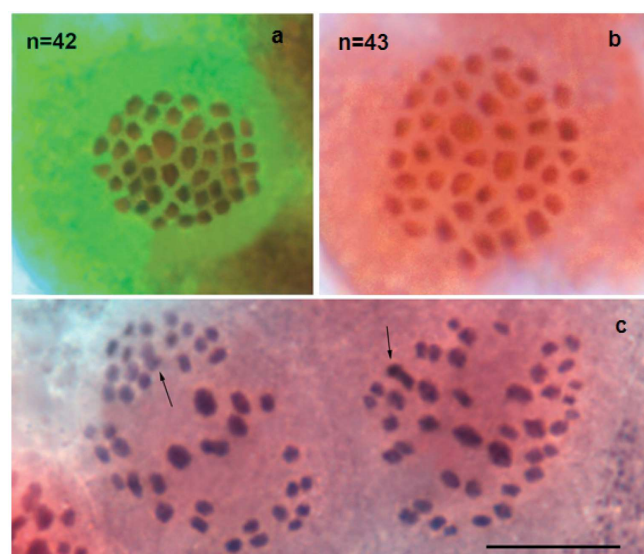
P. lurae :

Polyommatus lurae Parmentier, Vila et Lukhtanov, sp. nov

- Zie <https://compcytogen.pensoft.net/article/90558/>
 - Heel wat op elkaar gelijkende soorten in de Balkan
 - *P. orphicus*, *P. trimfristos*, *P. aroaniensis* + *P. lurae* complex (*Agrodiaetus* “bruine blauwtjes”)
 - Bij subgenus *Agrodiaetus* gaan verschillen in chromosomen aantal niet altijd samen met “reproductieve isolatie”.
 - Subspecies or species ?
- Zie volgende vergadering (Laurian Parmentier)
 - Ook chromosomenaantal gebruikt voor soortbepaling.

P. lurae

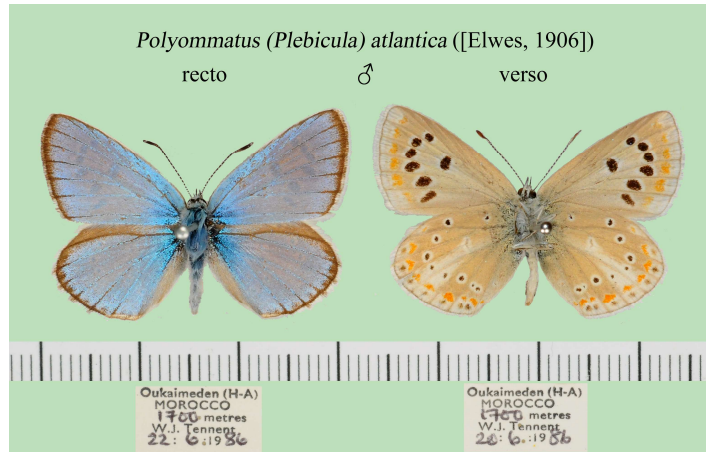
- Gekende *Polyommatus* in de Balkan :
 - *P. aroaniensis* : $n = 47-48$
 - *P. trimfristos* : $n = 38$
 - *P. orphicus* : $n = 41-42$
- Karyotypes of ***Polyommatus lurae*** sp. nov from Albania
 - a sample K73, MII, **$n=42$** ($2n = 84$)
 - b sample K82, MII, **$n=43$** ($2n = 86$)
 - c sample K71, two MI cells, each cell displays 41 bivalents and one possible trivalent (arrow) (**$2n = 85$**)
- Scale bar: 10 μ m.



Polyommatus atlanticus



Polyommatus atlanticus (Elwes, 1905)
observed in Morocco
by Guido Band (licensed under <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)



- By Accasidy - Own work, CC BY 3.0,
<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=31036707>



Polyommatus atlanticus

- The blue butterfly **Polyommatus (Plebicula) atlanticus** (Lepidoptera, Lycaenidae) holds the record of the highest number of chromosomes in the non-polyploid eukaryotic organisms. (Vladimir A. Lukhtanov, 2015)
 - Meiose (n) chromosomen aantal :
 - ten minste 224-226 "telbare" chromosomen
 - Dus : totale (2n) aantal chromosomen
 - 2n=ca 448-452
 - Grootste aantal van alle dieren !

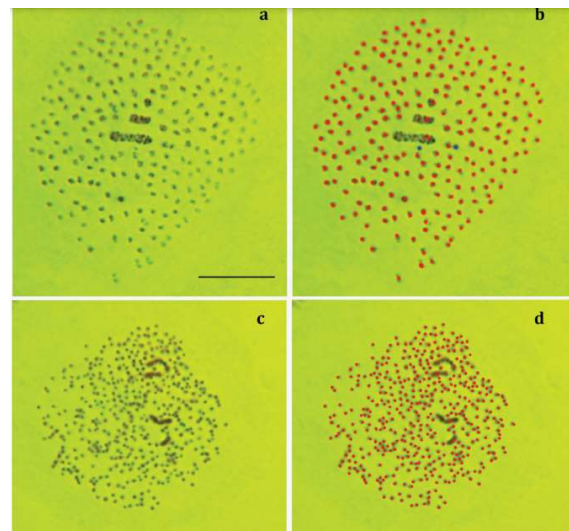
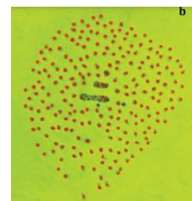
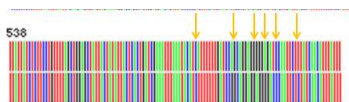


Figure 1. Male karyotype of *Polyommatus (Plebicula) atlanticus*, sample NK02A032. **a** MI plate **b** chromosome count in MI plate: red dots indicate distinct separate entities, blue dots indicate doubtful entities, n=224 red dots + 2 blue dots **c** diploid chromosome set observed in male asynchronous meiosis **d** chromosome number count in diploid chromosome set; at least 434 entities can be distinguished. Bar = 10 μ m.

Van dagpauwoog en Atalanta ...tot 452 chromosomen.

Nu nog een korte nabeschuwing...

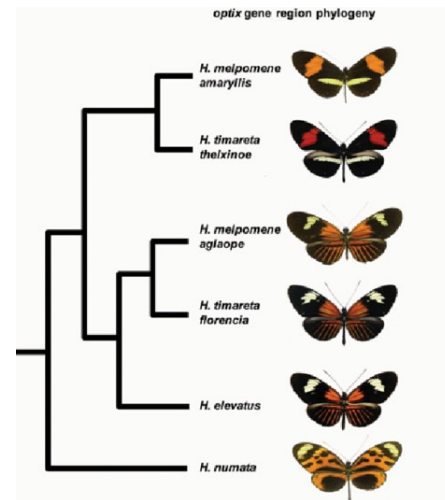
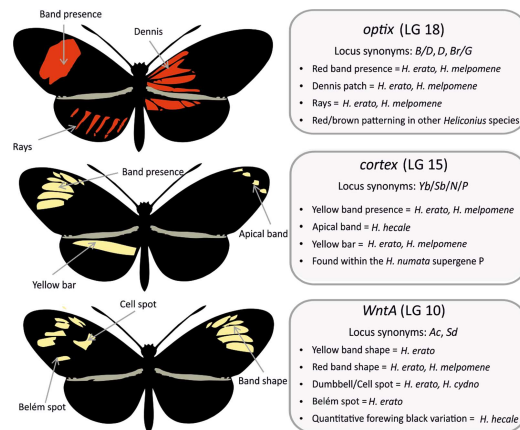
- Na al dit tellen van streepjes en bolletjes ... :



- ?? Wat hebben we nu geleerd over hoe de vlinder er uit ziet ??
 - ?? kleur, vlekken, vorm, grootte, ... ?? (kleurvormen)

Meer in detail naar chromosomen kijken :

- 1) Kijken naar de genen op de chromosomen
 - Welke genen bepalen welke kleurvormen/...
 - Bv *Heliconius* spec.



Meer in detail naar chromosomen kijken :

- 2) Next Level :
 - “prutsen” aan de genen in de chromosomen
 - => Gentherapie (CRISPR)
 - Mens
 - Ook al bij vlinders : een voorbeeldje

Gentherapie : aanpassen gen voor UV reflectie

- *Colias philodice* (Clouded Sulphur)
- *Colias eurytheme* (Orange Sulphur)

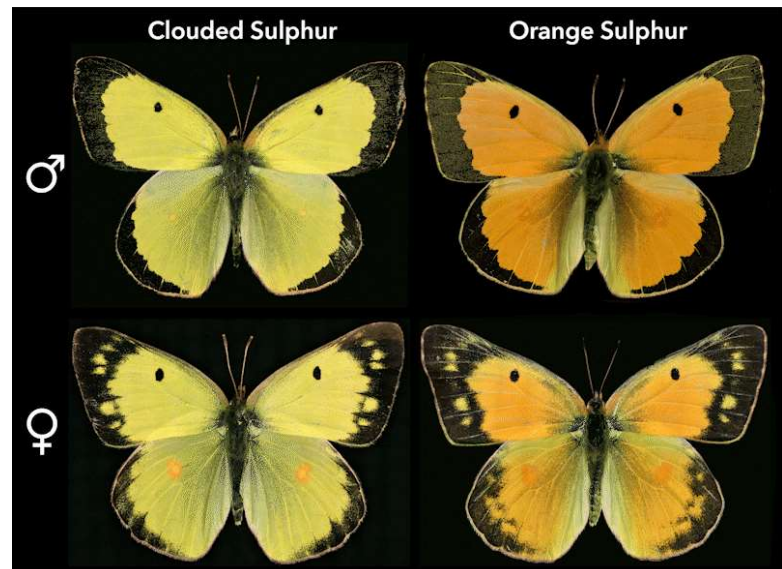
A genetic switch for male UV iridescence in an incipient species pair of sulphur butterflies

[Vincent Ficarrotta, Joseph](#)

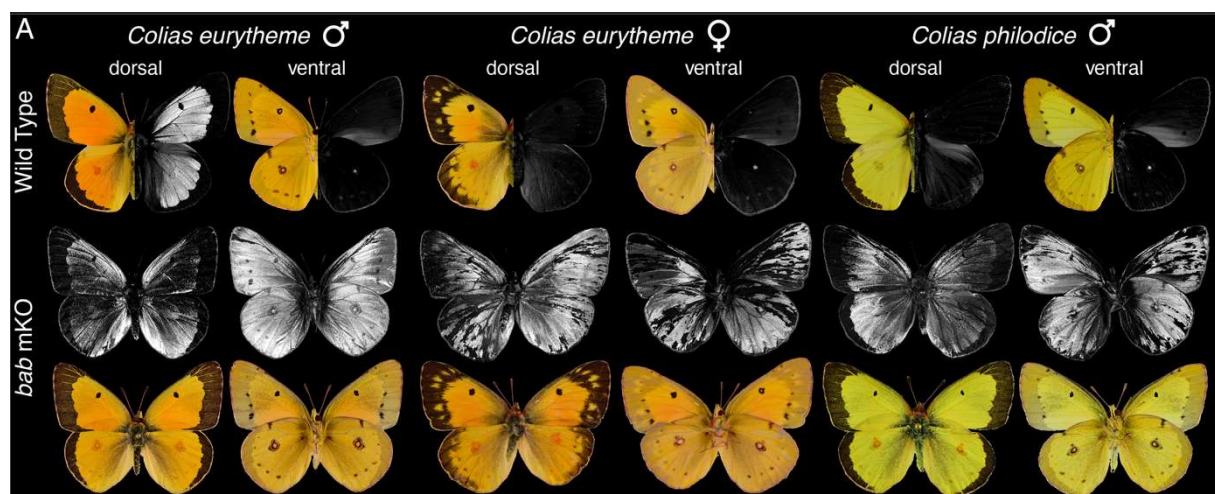
[J. Hanly https://orcid.org/0000-0002-9459-9776](https://orcid.org/0000-0002-9459-9776), [Ling S. Loh](#), +6, and [Amaud Martin](#)

PNAS (January 2022)

- CRISPR op het "bab" (bric a brac) gen van het Z-chromosoom (man : 2 "Z")



Gentherapie : aanpassen gen voor UV reflectie



Besluit :

- Chromosomen ? :
 - Het tellen van chromosomen :
 - Een bijkomend hulpmiddel bij
 - het bepalen van soorten
 - mogelijke variatie binnen een soort
 - Studie evolutie + ontstaan van soorten
 - Gedetailleerd onderzoek van genen/DNA/... van de chromosomen in de kern
 - Bron van huidige en toekomstige ontdekkingen !
 - Link met uiterlijke en andere kenmerken.

Bedankt voor de aandacht !