

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta



**Izolace a chromosomální lokalizace genů pro  
acetylcholinesterázu u obaleče jablečného  
(*Cydia pomonella*)**

Diplomová práce

**Bc. Miroslava Sýkorová**

Školitel: **Prof. RNDr. František Marec, CSc.**

Školitel specialista: **RNDr. Petr Nguyen**

České Budějovice

2011

Sýkorová, M., 2011: Izolace a chromosomální lokalizace genů pro acetylcholinesterázu u obaleče jablečného (*Cydia pomonella*). [Isolation and chromosomal localization of acetylcholinesterase genes in the codling moth, *Cydia pomonella*. Mgr. Thesis, in Czech] – 34 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

The codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera; Tortricoidea) is a major pest of pome fruit and walnut orchards in the world. Due to the intensive chemical control *C. pomonella* has developed a high resistance to various insecticides. One of the mechanisms of the resistance is acetylcholinesterase insensitivity to carbamates and organophosphates. The insensitivity is based on mutations in one of two genes for acetylcholinesterase. This study deals with testing a hypothesis suggesting that one gene coding for acetylcholinesterase in the codling moth was translocated to the Z sex chromosome. The hypothesis has been later supported by sex-linked inheritance of insecticide resistance in a related species, *Grapholita molesta*, and also by a large size of sex chromosomes in the codling moth.

**Finanční podpora:**

Tato práce byla financována z grantů GAČR č. 523/09/2106 a GAAV č. IAA600960925 při Entomologickém ústavu BC AV ČR a z projektu GA JU č. 137/2010/P.

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

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

V Českých Budějovicích, dne 3. 1. 2011

.....  
Miroslava Sýkorová

## **Poděkování**

Dovoluji si touto cestou poděkovat své rodině, která mě po celou dobu studia nezištně podporovala finančně, ale také za jejich lásku, pochopení a poskytnutí zázemí, bez kterého by se jen těžko dalo studovat. Dále svým nejbližším kamarádům Mary, Míše, Davidovi, Štěpánce a Lukášovi, kteří mě uměli ve slabých chvílích rozptýlit a potěšit, také Petrovi, že to se mnou po celou dobu vydržel. Velký dík patří Frantovi, který mě vzal pod svá ochranná křídla a naučil mě mnohému. A především mé poděkování patří Peťanovi za jeho trpělivost, optimismus, který mně leckdy chyběl, za jeho výborné kuchařské umění. Dále Radce za obrovskou pomoc a vstřícnost a vůbec za hezkou atmosféru, která v laboratoři panovala i díky Martině, která zná odpovědi asi na všechno (a to je fajn!) Jindře, Páje, Magdě a samozřejmě dalším členům naší laboratoře. Všem Vám ještě jednou děkuji!

## Obsah

1. 1. Historie vývoje rezistence .....	1
1. 2. Mechanismy způsobující rezistenci.....	1
1. 3. Cílová místa chemických insekticidů a rezistence .....	2
1. 4. Acetylcholinesteráza .....	2
1. 4. 1. Funkce acetylcholinesterázy.....	3
1. 4. 2. Geny kódující acetylcholinesterázu.....	3
1. 4. 3. Studium genů acetylcholinesterázové rezistence u motýlů (Lepidoptera) .....	4
1. 4. 4. Dědičnost acetylcholinesterázové necitlivosti u motýlů (Lepidoptera) .....	5
1. 5. Mapování genů a konzervovaná syntenie v rámci motýlů (Lepidoptera) .....	6
1. 6. Obaleč jablečný, <i>Cydia pomonella</i> .....	7
2. Cíle práce.....	9
3. Materiál a metody.....	10
3. 1. Obaleč jablečný .....	10
3. 2. Izolace ortologních sekvencí hledaných genů .....	10
3. 2. 1. Extrakce nukleových kyselin .....	10
3. 2. 2. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	10
3. 2. 3. Klonování a sekvenace .....	11
3. 3. Identifikace BAC klonů z BAC knihovny obaleče jablečného.....	12
3. 3. 1. Příprava sond.....	12
3. 3. 2. Prohledávání BAC knihovny .....	12
3. 4. Southernova hybridizace.....	14
3. 4. 1. Extrakce genomové DNA.....	14
3. 4. 2. Southernova hybridizace genových sond s genomovou DNA obaleče.....	15
3. 5. Kvantitativní PCR .....	16
4. Výsledky.....	17
4. 1. Izolace ortologů obaleče jablečného, <i>C. pomonella</i> .....	17
4. 2. Selektce klonů z genomové knihovny obaleče jablečného .....	17
4. 3. Ověření vazby genů na chromosom Z metodou Southernovy hybridizace.....	19
5. Diskuse .....	22
6. Souhrn .....	28
7. Literatura .....	29

## 1. Úvod

Aplikace chemických a biologických insekticidů se stala součástí moderního zemědělství již v polovině minulého století. Právě jejich masovým a kontinuálním používáním se záhy objevil nový fenomén - rezistence k insekticidům. V současné době představuje rezistence hmyzu globální problém, jelikož snižuje efektivitu aplikace insekticidů. Na druhou stranu však tento jev představuje vhodný model pro studium adaptací k toxickému prostředí. Porozumění principům vzniku rezistence, její dědičnosti a analýza cílových genů hrajících v tomto mechanismu zásadní úlohu jsou tedy klíčové pro budoucí efektivní kontrolu populací škůdců a tudíž účinnou ochranu kulturních plodin.

### 1. 1. Historie vývoje rezistence

Motýli zahrnují velké množství ekonomicky významných škůdců způsobujících rozsáhlé škody nejen na hospodářských plodinách, ale i v lesních porostech. Nejvýznamnějšími jsou z tohoto pohledu druhy z nadčeledí Noctuoidea, Pyraloidea a Tortricoidea (Roe a kol., 2010). První chemickou látkou používanou k ochraně proti motýlím škůdcům byl dichlordifenyltrichlormethylmethan (DDT). Již po prvních dvou letech však byly zaznamenány případy rezistence u záplavníka polního (*Plutella xylostella*) (Ankersmit, 1953) a později také u obaleče jablečného (*Cydia pomonella*) (Smith, 1955) a černopásky bavlníkové (*Helicoverpa armigera*) (Wilson, 1974; Goodyer a kol., 1975; Goodyer a Greenup, 1980). Vývoj a následné zavedení dalších účinných látek, organofosfátů, karbamátů, pyrethroidů, neonikotinoidů apod., působících v metabolických a detoxikačních drahách nervové soustavy hmyzu, s sebou přinesly nové případy odolnosti a některé druhy si vyvinuly až několikanásobnou "křížovou rezistenci", tj. toleranci k toxickým substancím jako následek vystavení podobně působícím látkám (Kanga a kol., 1997, 1999; Pree a kol., 1998; Gunning, 1994). Počty rezistentních druhů hmyzu vzrostly ze 7 v roce 1938 až na 447 v roce 1984 (Georghiou, 1986). Recentně byla zaznamenána u více než 450 druhů rezistence alespoň vůči jednomu insekticidu (Mota-Sanchez a kol., 2002) a tento počet se neustále zvyšuje (Whalon a kol., 2008). Takto rapidní nárůst rezistentních druhů škůdců vzbudil pozornost nejen v oblasti zemědělství, ale i u vědecké komunity, která se záhy začala mechanismy těchto rezistencí zabývat.

### 1. 2. Mechanismy způsobující rezistenci

Bylo popsáno několik mechanismů zodpovědných za rezistenci k chemickým insekticidům. Patří mezi ně např. změna chování, kdy se škůdci záměrně vyhýbají ošetřeným rostlinám či snížení pronikání látek přes kutikulu. Avšak zásadní jsou jiné dva

mechanismy. Prvním je zvýšení metabolické aktivity enzymů v detoxikačních drahách např. při mikrosomální oxidaci (cytochrom P450 monooxygenáza) (Little a kol., 1989; Bergé a kol., 1998), esterázové hydrolýze (karboxylesteráza) (Sun a kol., 1978; Noppun a kol., 1987) a glutathionové konjugaci (glutathion-S-transferáza) (Cheng a kol., 1983) obvykle v důsledku mutace nebo deregulace jednoho nebo více členů genových rodin těchto enzymů. Vznikají tak rezistence vůči širokému spektru toxických látek, protože dané enzymy odbourávají insekticidy patřící do různých chemických tříd. Druhým mechanismem vzniku rezistence je cílově specifická necitlivost, tedy snížení citlivosti enzymu, na který je insekticid zaměřen, v důsledku bodových mutací v jeho cílovém místě. Necitlivost plynoucí z místně specifických mutací je obvykle spojována s insekticidy jedné chemické třídy působícími na stejné cílové místo. Oba mechanismy se přitom vzájemně nevylučují. Naopak. Bylo prokázáno, že se oba typy rezistencí podílí na odbourávání stejného insekticidu. Jejich působení může přitom vykazovat aditivní či multiplikativní účinky (Raymond a kol., 1989). Příkladem může být odpověď na organofosfáty zvýšením karboxylesterázové aktivity společně s necitlivostí acetylcholinesterázy.

### **1. 3. Cílová místa chemických insekticidů a rezistence**

V porovnání s herbicidy a fungicidy jsou účinky používaných insekticidů zaměřené na relativně malý počet odlišných cílových proteinů hrajících klíčovou roli především v nervové soustavě. Jsou jimi acetylcholinesteráza, receptor kyseliny gamma-aminomáselné (GABA), napětím řízený sodíkový kanál a nikotinový acetylcholinový receptor. Tyto cílové molekuly produkují velmi rychlou reakční odezvu, což v případě vysoké afinity k toxinu způsobuje rychlou smrt. Proto může být účinnost toxinu v organismu vysoká už při jeho nízké koncentraci. Funkce těchto cílových proteinů v nervové soustavě je často evolučně i strukturně značně konzervovaná, což zaručuje citlivost organismu k toxinu i u fylogeneticky značně vzdálených skupin hmyzu (Heckel, 2010). Bodové mutace v cílovém místě popsané např. u octomilky *Drosophila melanogaster* (Mutero a kol., 1994) v genu pro acetylcholinesterázu, GABA receptoru (French-Constant a kol., 1993a,b) nebo napětím řízeným sodíkovým kanálem (Williamson a kol., 1996; Brun-Barale a kol., 2005) vedou k záměně aminokyselin v blízkosti okraje aktivního centra nebo přímo v něm. To zřejmě pozmění katalytické vlastnosti enzymu (Fournier a kol., 1992).

### **1. 4. Acetylcholinesteráza**

Nervová soustava představuje velmi citlivý systém a jakékoli její poškození má zpravidla smrtelné následky. Acetylcholinesteráza (AChE), klíčový enzym nervové soustavy

zprostředkovávající přenos nervového vzruchu, se stala jedním z hlavních terčů insekticidů (Matsumura, 1985). Přímá souvislost s rezistencí k insekticidům a AChE byla poprvé potvrzena u roztoče svilušky chmelové (*Tetranychus urticae*) (Smitsaert a kol., 1964; Voss a kol., 1964). AChE se tak stala atraktivním objektem studia mechanismů působení insekticidů na bázi inhibitorů, jakými jsou především organofosfáty a karbamáty.

#### 1. 4. 1. Funkce acetylcholinesterázy

Místem působení acetylcholinesterázy jsou cholinergní synapse centrální nervové soustavy, kde se spolu s acetylcholinovým receptorem účastní přenosu akčního potenciálu (Rossenberry, 1975). Zde hydrolyzuje neurotransmitter acetylcholin, zodpovědný za šíření nervových vzruchů přes synaptickou štěrbinu. Hydrolyza acetylcholinu probíhá ve dvou krocích, přičemž insekticidy blokuje reakci po prvním kroku vytvořením kovalentní vazby mezi hydroxylovou skupinou serinu katalytického centra enzymu a fosfátovou nebo karbonylovou skupinou daného insekticidu (Aldridge, 1950). V důsledku inhibice hydrolyzy se acetylcholin hromadí v synapsích. Dochází tak k trvalému dráždění acetylcholinových receptorů a narušení cholinergních přenosů, což vede ke křečím a zástavě dýchání. Pokud má však organismus pozměněnou AChE, je znemožněna vazba insekticidu a organismus se tak stává necitlivým k dané látce. To poskytuje škůdcům značnou selekční výhodu v chemicky ošetřovaných kulturách.

#### 1. 4. 2. Geny kódující acetylcholinesterázu

Ze srovnání dat získaných při studiu mechanismů necitlivosti k insekticidům vyplývá, že genom hmyzu obsahuje dva geny, označované jako *Ace-1* a *Ace-2*, jejichž produkty vykazují AChE aktivitu (Weill a kol., 2002). Geny *Ace-1* i *Ace-2* vznikly patrně duplikací, ke které došlo ještě před divergencí hmyzích řádů. Přítomnost těchto paralogů v genomu je tedy synapomorfií celé třídy Insecta. Zdá se, že u většiny hmyzu protein *Ace-1* působí na cholinergních synapsích a mutace v tomto genu přímo ovlivňuje necitlivost AChE. Výjimku tvoří vyšší dvoukřídlí (Diptera). Zde byla u čeledi Drosophilidae a mouchy domácí, *Musca domestica* (Muscidae), prokázána druhotná ztráta genu *Ace-1* (Huchard a kol., 2006). Funkci *Ace-1* na cholinergních synapsích tak musel u těchto taxonů převzít protein genu *Ace-2* (Fournier a kol., 1989; Weill a kol., 2002). To naznačuje i fakt, že byla nalezena minimálně jedna mutace, podmiňující rezistenci ve stejné pozici genu *Ace-2* jak u *D. melanogaster* (Mutero a kol., 1994) a u *M. domestica* (Huang a kol., 1997; Kozaki a kol., 2001), tak i u genu *Ace-1* jiných hmyzích druhů (Fournier, 2005). Funkce genu *Ace-2* u ostatních hmyzích taxonů není známa.

### 1. 4. 3. Studium genů acetylcholinesterázové rezistence u motýlů (Lepidoptera)

Základní poznatky o genech kódujících acetylcholinesterázu, získané zejména u dvoukřídlého hmyzu, se staly výchozím bodem pro další studium rezistencí u řádu motýlů, Lepidoptera. U motýlích škůdců byl vliv jednotlivých insekticidů na metabolické dráhy testován prostřednictvím analýzy enzymatické aktivity (Sun a kol., 1986). U testovaných rezistentních kmenů byla hladina acetylcholinesterázové aktivity snížena oproti kmenům vnímavým, což vedlo k několikanásobnému zvýšení rezistence (Cassanelli a kol., 2006; Gunning a kol., 1996; Fuentes-Contreras a kol., 2007). Některé studie se podrobněji zaměřily i na mutace genů kódujících AChE, při kterých byly studovány rozdíly v sekvencích AChE vnímavých a rezistentních kmenů nejvýznamnějších motýlích škůdců. Prvním zaklonovaným genem pro AChE u motýlů byl ortholog *Ace-2* *D. melanogaster* získaný u záplavníka polního (*P. xylostella*) (Ni a kol., 2003). V jeho sekvenci však nebyly odhaleny žádné mutace. V práci Ren a kol. (2002) autoři porovnali sekvence genu *Ace-2* pěti jedinců čínského rezistentního kmene a šesti jedinců vnímavého kmene černopásky bavlníkové, *H. armigera*. Výsledky však ukázaly výrazný polymorfismus nejen mezi oběma kmeny, ale i v rámci těchto kmenů. Tato data tudíž neprokázala souvislost *Ace-2* s rezistencí. Výjimku představuje substituce v pozici A575T nalezená jak u *C. pomonella* (Cassanelli a kol., 2006), tak u všech pěti studovaných rezistentních jedinců *H. armigera*, která je spojována s redukcí citlivosti AChE k organofosfátům. U dalších motýlích druhů však nebyly objeveny další nové mutace v genu *Ace-2* (Lee a kol., 2007).

Následně byla pozornost zaměřena na charakterizaci genu pro AChE, který by mohl být spojen s rezistencí motýlů k insekticidům. Díky sekvencím tohoto genu dostupným u jiných druhů hmyzu, např. mšic *Aphis gossypii* (Li a kol., 2002) a *Schizaphis graminum* (Gao a kol., 2002), byla ortologní sekvence *Ace-1* úspěšně izolována u několika druhů motýlů. Analýza sekvence genu *Ace-1* odhalila řadu bodových mutací v několika odlišných místech. Substituce G227A u *P. xylostella*, která je zodpovědná za organofosfátovou rezistenci, byla lokalizována ve stejné pozici jako mutace v genu *Ace-2* zodpovědná za stejný typ rezistence u *D. melanogaster* a *M. domestica* (Baek a kol., 2005). Další tři mutace (D229G, A298S, G324A) pak byly identifikovány u prothiofosfát-rezistentního kmene *P. xylostella*, z toho dvě (A298S, G324A) zřejmě ovlivňují prothiofosfátovou rezistenci (Lee a kol., 2007). Unikátní substituce byla zaznamenána u *C. pomonella* v pozici F399V, velmi konzervované u ostatních druhů hmyzu, která mění kinetiku interakce enzymu s různými organofosfáty a karbamáty (Cassanelli a kol., 2006).

Dále bylo zjištěno, že ačkoli je relativní počet kopií genů *Ace-1* a *Ace-2* v genomu *P. xylostella* stejný, je exprese *Ace-1* v porovnání s *Ace-2* mnohem vyšší u vnímavého i rezistentního kmene (Baek a kol., 2005). *Ace-1* je rovnoměrně exprimován v tělech jedinců



obou kmenů s výjimkou hlavové části, kde je míra transkripce u larev rezistentního kmene až dvakrát vyšší. Vyšší transkripce v těchto částech těla naznačuje, že AChE kódovaná genem *Ace-1* pravděpodobně ovlivňuje synaptický přenos v cholinergních synapsích (Baek a kol., 2005; Lee a kol., 2007). Celková úroveň exprese *Ace-2* byla nižší než *Ace-1* nehledě na části těla a vývojové stádium. Úloha genu *Ace-2* v případě rezistence tedy zůstává i nadále nejasná. Také data získaná u dalšího motýlího druhu, můry *Helicoverpa assulta* jsou v souladu s výše uvedenými závěry (Lee a kol., 2006). Výsledek fylogenetických analýz, provedených s 31 druhy dalších bezobratlých živočichů, potvrdil rozdělení genů *Ace* u *P. xylostella* a *H. assulta* do dvou různých skupin, *ace1* a *ace2* (Baek a kol., 2005; Lee a kol., 2007), přičemž skupina *ace1* byla tvořena nezávislou linií zahrnující hmyz a mnohem starobylejší kmeny bezobratlých jako např. měkkýše, hlísty a pavouky, zatímco skupina *ace2* obsahovala pouze zástupce hmyzu. To potvrzuje, že skupina *ace1* je původní formou genu *Ace* a že k jeho duplikaci došlo ještě před tím, než se od společného fylogenetického stromu oddělil hmyz.

#### 1. 4. 4. Dědičnost acetylcholinesterázové necitlivosti u motýlů (Lepidoptera)

Součástí zkoumání vlivu insekticidů na acetylcholinesterázovou aktivitu u některých motýlích druhů byla zpětná křížení vnímavých a rezistentních kmenů (Gilbert a kol., 1996; Kanga a kol., 2001; Cassanelli a kol., 2006). Tímto způsobem bylo u můry *Heliothis virescens* zjištěno, že je acetylcholinesterázová inhibice řízena jedním autosomálním genem se dvěma alelami označovacími *Ace1<sup>S</sup>* (vnímavá) a *Ace1<sup>R</sup>* (rezistentní) (Brown, 1991; Brown a Bryson, 1992). Vazebný test ukázal, že *Ace1* je ve vazbě s genem *ldh-2* (Heckel a kol., 1998). Ten byl metodou RFLP zařazen u *H. virescens* do vazebné skupiny 2 (Zraket, 1990). Příslušnost k vazebné skupině se však u jiných motýlích taxonů liší. Existuje nepřímý důkaz pro vazbu genu *ldh-2* na pohlavní chromosom obaleče jablečného (Pashley, nepublikováno; citováno v Heckel a kol., 1998).

Motýli mají chromosomální určení pohlaví typu WZ/ZZ (samice/samec), kdy je samice heterogametická a samec homogametický (Traut a kol., 2007). Obecně je genom motýlů tvořen velkým počtem (zpravidla  $n=31$ ) malých holokinetických chromosomů, které nemají primární konstrikci (centromeru) a kinetochor pokrývá většinu jejich povrchu (Suomalainen, 1969; Murakami a Imai, 1974; Wolf a kol., 1997). Ty se od sebe tvarově ani velikostně výrazně neliší. U čeledi Tortricidae, do které obaleč jablečný patří, jsou však pohlavní chromosomy Z a W nápadně větší než všechny ostatní autosomy (Emelianov a kol., 2004; Fuková, 2005). Na základě těchto nepřímých důkazů byla formulována hypotéza o translokaci *Ace-1* na pohlavní chromosom Z u čeledi Tortricidae (Heckel a kol., 1998), která by mohla nápadně odlišnou velikost chromosomu Z vysvětlit.

U hmyzu je většina známých genů zodpovědných za rezistence k insekticidům autosomálních a jen vzácně jsou vázané na pohlavní chromosom (Heater, 1986; Argentine a kol., 1989). Translokace genu souvisejícího s detoxifikačními mechanismy na pohlavní chromosom Z by měla za následek poměrně rychlý rozvoj rezistence u škůdců, kteří jsou dlouhodobě vystaveni účinkům insekticidů. Tato hypotéza byla později podpořena zpětným křížením citlivých linií u *G. molesta*, (Tortricidae) (Kanga a kol., 2001). To odhalilo, že rezistenci vůči karbofuranu ovlivňují dva geny. První, který zprostředkovává cílově specifickou necitlivost, vykazoval vazbu na pohlavní chromosom Z. Druhý zvyšoval esterázově zprostředkovanou rezistenci a segregoval v kříženích jako autosomální lokus.

## 1. 5. Mapování genů a konzervovaná syntenie v rámci motýlů (Lepidoptera)

Přímé fyzické mapování genů u motýlů bylo možné až díky osekvenování celého genomu bource morušového, *Bombyx. mori* (Mita a kol., 2004; Xia a kol. 2004). Pomocí fluorescenční *in situ* hybridizace umělých bakteriálních chromosomů ("*Bacterial Artificial Chromosome*", BAC), tzv. metodou BAC-FISH, byl sestaven karyotyp bource morušového, ve kterém byly všechny chromosomy jednoznačně identifikovány podle specifických hybridizačních signálů vybraných BAC klonů. (Yoshido a kol., 2005). Tím byla fyzická mapa genomu bource morušového integrována s již existující mapou genetickou (Yasukochi, 1998), což umožnilo přiřazení vazebných skupin k jednotlivým chromosomům. Tato mapa byla následně použita k ukotvení 523 BAC kontigů nesoucích 342 známých genů a 85 EST ("*Expressed Sequence Tag*") sekvencí (Yasukochi a kol., 2006). Tato práce byla velmi přínosná také z hlediska studia možné syntenie genů (tj. jejich výskytu na ortologním chromosomu) u jiných, nemodelových či geneticky neprobádaných druhů motýlů.

První vazená mapa jiného druhu motýla byla sestavena pomocí anonymních molekulárních markerů a 19 jaderných genů u babočky *Heliconius melpomene* (Nymphalidae) (Jiggins a kol., 2005). Tato vazebná mapa, zahrnující 21 vazebných skupin, byla následně porovnána s 28 vazebnými skupinami bource morušového, což vedlo k odhalení syntenie genů čtyř vazebných skupin (Yasukochi a kol., 2006). Pringle a kol. (2007) následně obohatili genetickou mapu *H. melpomene* o dalších 64 konzervovaných genů, čímž získali celkem 72 ortologních markerů zamapovaných u *H. melpomene* i *B. mori*. Porovnání jejich map ukázalo zachovalou syntentii genů na chromosomech obou druhů. Beldade a kol. (2009) provedli vazebnou analýzu EST sekvencí okáče *Bicyclus anynana* (Nymphalidae). I zde byla patrná značná míra syntenie mezi vazebnými skupinami *B. anynana* a *B. mori*. Podrobnější studie syntenie provedli Sahara a kol. (2007) mezi chromosomy 15 příbuzného druhu *B. mori* a lišaje tabákového *Manduca sexta* (Saturniidae). Autoři prokázali zachování pořadí genů jak mezi oběma druhy, tak i při porovnání

s vazebnou skupinou 11 *H. melpomene*. Vysoká konzervovanost pořadí genů u většiny chromosomů těchto dvou druhů byla později potvrzena v rozsáhlejší studii, v níž bylo identifikováno všech 28 chromosomálních bivalentů *M. sexta* pomocí 124 genů. Tato studie odhalila pouze tři inverze, tři translokace a dvě fúze či rozpady chromosomů v rámci obou genomů. Sondy z BAC knihovny ze třech chromosomů *M. sexta* poskytly jasný signál na odpovídajících chromosomech lišaje svlačcového, *Agrius convolvuli*. Také tyto pokusy prokázaly vysoce konzervovanou syntenie genů u těchto třech chromosomů mezi *B. mori*, *M. sexta* a *A. convolvuli*. Tyto výsledky přispěli k formulování hypotézy o značné evoluční stabilitě motýlích genomů, což je překvapující vzhledem k holokinetické struktuře jejich chromosomů, která naopak usnadňuje chromosomální přestavby.

Potvrzení, že je motýlí genom značně konzervován, má velký význam nejen pro pochopení evoluce genomů motýlů, ale zejména pro studium zájmových genů u nemodelových druhů motýlů. Díky konzervované syntentii genů mezi chromosomy bource morušového a jiných druhů motýlů můžeme předpokládat polohu ortologních genů u studovaného druhu motýla a snadněji jej lokalizovat a charakterizovat.

Geny *Ace-1* a *Ace-2*, jež jsou předmětem této diplomové práce, již byly charakterizovány u bource morušového. Avšak u tohoto domestikovaného druhu nebyl zaznamenán žádný případ organofosfátové a karbamátové rezistence (Seino a kol., 2007; Shang a kol., 2007). Přestože bylo dokázáno, že insekticidy používané k ošetřování jeho potravy, listů moruše, negativně ovlivňují produkci hedvábí (Radhakrishna a Devi, 1992) a byl dokázán i toxický dopad právě na aktivitu AChE (Nath a Kumar, 1999), nebyly odhaleny žádné mutace genu *Ace-1*. Ve volně přístupné internetové databázi osekvenovaného genomu bource Kaikobase (<http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/>) je gen *Ace-1* zařazen do vazebné skupiny 15 a gen *Ace-2* je součástí vazebné skupiny 9. Z tohoto předpokladu vazby obou genů na autosomy 15 a 9 jsem vycházela i ve své diplomové práci při studiu obou genů u motýlího škůdce obaleče jablečného, *C. pomonella* (Tortricidae).

## 1. 6. Obaleč jablečný, *Cydia pomonella*

Obaleč jablečný, *C. pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) je považován za celosvětově významného škůdce. Larvy páchají rozsáhlé škody na plodech jabloní, hrušní, kdoulí a vlašských ořechů (Barnes, 1991). Původně se vyskytoval pouze v Eurasii, avšak během posledních 200 let se úspěšně rozšířil po celém světě. Vysoká míra jeho škodlivosti tkví zejména v úspěšné adaptaci na nové prostředí (Timm a kol., 2006), dynamice jeho populací, reprodukční kapacitě a rezistenci k insekticidům (Sauphanor a kol., 1998).

Stejně jako většina motýlů, má i obaleč jablečný způsob určení pohlaví typu *Abraxas* WZ/ZZ (samice/samec) a haploidní počet chromosomů stejný jako bourec morušový, tj.

n=28. Avšak na rozdíl od bource a většiny ostatních motýlů lze rozpoznat jeho pohlavní chromosomy již po jednoduchém cytologickém barvení, jelikož jsou největšími chromosomy v karyotypu (Fuková a kol., 2005). Podobně jako u většiny motýlů je chromosom W tvořen heterochromatinem a pravděpodobně neobsahuje žádné geny. Naopak chromosom Z je tvořen euchromatinem a měl by tudíž být na geny bohatý. Díky aplikaci technik molekulární genetiky bylo v posledních letech dosaženo výrazného pokroku v poznání pohlavních chromosomů obaleče. Pomocí genomové in situ hybridizace (GISH) a komparativní genomové hybridizace (CGH) byl prokázán vysoký stupeň molekulární diference chromosomů W a Z (Fuková a kol., 2005). Izolace DNA chromosomu W pomocí laserové mikrodisekce umožnila vývoj specifické malovací sondy, která značně usnadňuje nejen jeho identifikaci na preparátech mitotických chromosomů, ale i identifikaci bivalentu WZ na preparátech pachytenních oocytů. Zaklonováním a osekvenováním sekvencí z takto získané DNA chromosomu W bylo potvrzeno, že je tvořen převážně repetitivními sekvencemi (Fuková a kol., 2007); navíc byly získány i molekulární markery chromosomu W, z nichž jeden byl využit k vývoji jednoduché PCR techniky, umožňující identifikaci pohlaví obaleče již ve stádiu embrya (Fuková a kol. 2009).

Velkou výhodou pro další genetická studia u obaleče jablečného je existence knihovny umělých bakteriálních chromosomů (BAC). Knihovna byla konstruována v laboratoři H.B. Zhanga (GENEfinder Genomic Resources Laboratory, Texas A&M University, College Station, TX, USA). Pro její tvorbu byl použit vektor pECBAC1 (Frijters a kol. 1997). Knihovna sestává z 18 432 klonů o průměrné velikosti 140 kbp. To odpovídá zhruba čtyřnásobku genomu obaleče jablečného *C. pomonella* (Dalíková, 2009). Dostupnost BAC knihovny umožňuje srovnávací mapování genomu obaleče jablečného. Příkladem může být práce Nguyen (2009), ve které byly u obaleče jablečného identifikovány ortologní sekvence několika genů, lokalizovaných na chromosomu Z u bource morušového. Z knihovny obaleče byly izolovány BAC klony obsahující tyto sekvence a lokalizovány na chromosomech obaleče metodou BAC-FISH. Výsledky této práce prokázaly zachovanou syntenii včetně pořadí genů mezi chromosomy Z bource a obaleče.

## 2. Cíle práce

Jak již bylo zmíněno v úvodu, dosud nebyl předložen žádný přímý důkaz, potvrzující přesun genu *Ace-1* z autosomu na pohlavní chromosom Z u žádného zástupce skupiny Tortricidae.

Cílem této práce bylo testovat hypotézu možné translokace genu *Ace-1* na pohlavní chromosom Z u obaleče jablečného *C. pomonella* (Tortricoidea) a zároveň ověřit předpokládanou vazbu na autosom u genu *Ace-2*. To lze provést dvěma metodickými přístupy. Prvním je porovnání počtu kopií genu v genomu samčího a samičího pohlaví, který můžeme ověřit pomocí Southernovy hybridizace, kdy porovnáváme intenzitu hybridizačních signálů mezi samčí a samičí DNA. Alternativní metodou, která může poskytnout informace o relativním počtu kopií genu je kvantitativní PCR. Druhý metodický přístup je fyzické mapování genu. Díky dostupnosti BAC knihovny obaleče jablečného lze vyselektovat BAC klony obsahující zájmový gen a použít je pro mapování pomocí BAC-FISH. Hlavním úkolem této práce bylo izolovat a zaklonovat ortologní sekvence obou genů, *Ace-1* a *Ace-2*, u obaleče jablečného spolu s vhodným referenčním autosomálním genem a provést analýzu jejich případné vazby na pohlavní chromosom Z či příslušnosti k autosomální vazebné skupině pomocí výše uvedených metod prvního metodického přístupu. Dalšími úkoly bylo (i) izolovat a zaklonovat vybrané genetické markery ležící na chromosomu 15 bource morušového *B. mori* a (ii) prohledat BAC knihovnu obaleče jablečného a najít jejich klony spolu s klony pro geny *Ace-1* a *Ace-2*, aby byly připraveny pro přímé mapování genů metodou BAC-FISH.

### **3. Materiál a metody**

#### **3. 1. Obaleč jablečný**

V této práci byl použit laboratorní kmen obaleče jablečného, *Cydia pomonella* (L.), Krym-61. Veškeré informace o původu tohoto kmene a jeho laboratorním chovu včetně umělé potravy jsou podrobně zpracovány v práci Fuková a kol. (2005).

#### **3. 2. Izolace ortologních sekvencí hledaných genů**

##### **3. 2. 1. Extrakce nukleových kyselin**

Jako templát pro RT-PCR byla použita cDNA připravená následujícím způsobem. Nejprve byla provedena extrakce RNA obaleče jablečného z hlaviček uchovaných v roztoku RNAlater (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) při -20°C do vlastní extrakce. RNA byla extrahována pomocí RNA blue (Top-Bio, Praha, ČR) dle doporučení výrobce. Následovala 15-ti minutová inkubace RNA při 37°C s DNázou I (USB Corporation, Cleveland, OH, USA) (10 µl reakce obsahovala 1x pufr, 2 U DNázy I, 10 U SUPERase In RNase Inhibitor od firmy Applied Biosystems). RNA byla dále přečištěna fenol-chloroformovou extrakcí (fenol pro purifikaci RNA, pH 4,7; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Syntéza prvního vlákna cDNA byla provedena pomocí SuperScript III reverzní transkriptázy (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) dle protokolu výrobce. Po tepelné inaktivaci reverzní transkriptázy bylo k reakci přidáno 5 U RNázy H (USB Corporation) a reakce byla inkubována 20 minut při 37°C. Poté byla RNáza H tepelně inaktivována 20 minut při 65°C.

##### **3. 2. 2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

K navržení specifických primerů byly použity sekvence genů *Ace-1* a *Ace-2* obaleče jablečného, dostupné ve veřejné databázi GenBank. Pro získání orthologů vybraných genů byly na základě srovnání aminokyselinových sekvencí dostupných v databázi GenBank navrženy degenerované primery (Tab. 1). Standardní PCR o objemu 20 µl obsahovala 1x Ex *Taq* pufr, 0,2 mM dNTP mix, 2 µl cDNA, 0,25 U Takara Ex *Taq* Hot Start polymerázy (Takara, Otsu, Japonsko). Při použití specifických primerů byla jejich finální koncentrace 0,5 µM, avšak při PCR s degenerovanými primery (DOP-PCR) byla doporučena koncentrace primerů desetkrát vyšší, tedy 5 µM (Nguyen, 2009). Teplotní profil PCR sestával z počáteční denaturace při 94°C po dobu 2 minut a 30 cyklů zahrnujících denaturaci po 30s při 94°C, nasednutí primerů po 30s a syntézy trvajících 60s při 72°C. Teplota nasednutí ( $T_A$ ) specifických primerů se pohybovala v rozmezí 55-59°C. PCR s degenerovanými primery byla

optimalizována na gradientovém termocyklu. Syntéza DNA se v závislosti na předpokládané délce produktu pohybovalo od 30s do 1,75 minuty. Posledním krokem bylo závěrečná syntéza při 72°C trvající 2 minuty.

**Tab.1.** Seznam genů obaleče jablečného *C. pomonella*, jejichž částečné sekvence byly získány v rámci této práce. Dále jsou uvedeny sekvence primerů použité pro amplifikaci jednotlivých genů, délka získaných produktů a empiricky zjištěná teplota nasedání  $T_A$ .

Gen	Název primeru*	Sekvence	Délka	$T_A(^{\circ}C)$	Typ**
<i>Ace-1</i>	AChE1_F01 AChE1_R01	5'- CGATACAAGGCATTCTGCCA -3' 5'- AAGTTTTGGTGCCTAAGG -3'	1373 bp	57	S
<i>Ace-2</i>	AChE2_F01 AChE2_R01	5'- AAGACAATGCGCGGGTATTTG -3' 5'- AGGAACATCGTGTGCCTACC -3'	1468 bp	56	S
<i>ldh2</i>	IDH2_F01 IDH2_R01	5'- GARATGGAYGGNGAYGARATG -3' 5'- RTGYTCRTACCADATYTTNGC -3'	663 bp	57	Deg
<i>RpP0</i>	RpP0_F01 RpP0_R01	5'- ATGGGTAGGGAGGACAARGC -3' 5'- AGACCRAAGCCCATGTGCGTC -3'	904 bp	67	Deg
<i>RpS23</i>	RpS23_F01 RpS23_R01	5'- TGAAGGCYAAACCTTYG -3' 5'- GGAATRTCACCGACGGCRT -3'	204 bp	62	Deg
<i>RpS5</i>	Rp S5_F01 Rp S5_R01	5'- GRTGGAGYTGATYATGATGT -3' 5'- GAGTTWGATGAR CCTTRGC -3'	457 bp	60	Deg
<i>RpL7A</i>	RpL7A_F01 RpL7A_R01	5'- CAGAAGAAGCCYAAGAAGAAG -3' 5'- CGTTGGACTTGTGCGGAG -3'	721 bp	60	Deg
<i>EF1<math>\alpha</math></i>	EF1dF01 EF1dR02	5'- AARGARGCNCARGARATGGG -3' 5'- GCNACNGTYTGCTCATRTC -3'	1172 bp	59	Deg

\* F – forward, R – reverse; \*\* Typ: Deg, degenerovaný; S, specifický

### 3. 2. 3. Klonování a sekvenace

PCR produkty odpovídající očekávané délce byly extrahovány z 1% agaróзовého gelu v 1xTAE pufru pomocí Wizard SV Gel and PCR Clean Up System (Promega, Madison, WI, USA) dle protokolu výrobce. Dále byly zaligovány do plasmidu Promega pGEM T Easy Vector (Promega). Ten byl následně použit k transformaci chemicky kompetentních buněk DH5 $\alpha$ . Izolace plasmidové DNA byla provedena pomocí Quiaprep Spin Miniprep Kit (Quigen, Düsseldorf, SRN) dle protokolu výrobce. Samotné sekvenování bylo provedeno v Laboratoři genomiky BC AVČR pomocí BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) s použitím univerzálních sekvenační primerů M13 forward (5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3') a M13 reverse (5'-GGAAACAGCTATGA-CCATG-3'). Editace sekvencí byla provedena ve volně dostupném programu MEGA4 (Tamura et al., 2007) nebo BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/>). Sekvence byly následně ověřeny v databázích NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pomocí nástroje blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Takto ověřená rekombinantní plasmidová DNA byla

dále používána jako templát pro přípravu sond pro Southernovu hybridizaci a pro prohledání knihovny bakteriálních umělých chromosomů (BAC) obaleče jablečného (viz níže).

### **3. 3. Identifikace BAC klonů z BAC knihovny obaleče jablečného**

Fyzické mapování jednotlivých genů standardní FISH je velmi obtížné. U obaleče jablečného je však dostupná BAC ("**Bacterial Artificial Chromosome**") knihovna. BAC klony jsou již dostatečně velké (140kbp) na to, aby poskytly stabilní hybridizační signál.

#### **3. 3. 1. Příprava sond**

Sondy pro prohledávání BAC knihovny a Southernovu hybridizaci byly připraveny metodou PCR a naznačeny alkali-labilním digoxigeninem (Roche Diagnostics). Značící 30  $\mu$ l reakce obsahovala 1x Ex Taq pufr, směs nukleotidů (0,08 mM dGTP, dCTP, dATP, 0,052 mM dTTP a 0,028 mM DIG-11-dUTP), 0,5  $\mu$ M primery, přibližně 4 ng plasmidové DNA a 1,25 U Takara Ex Taq Hot Start polymerázy (Takara). Teplotní profil odpovídal klasické PCR (viz kap. 3. 2. 2.) s výjimkou doby syntézy primerů. Ta byla prodloužena na 60 s a počet cyklů byl zvýšen na 35. Sondy byly přečištěny gelovou filtrací na kolonce ProbeQuant G-50 Micro Columns (illustra Ltd., Sussex, UK). Poté byla stanovena jejich koncentrace. Na hybridizaci bylo použito přibližně 100 ng sondy. Primery použité k amplifikaci sond spolu s dalšími podrobnostmi jsou uvedeny v Tab. 2.

#### **3. 3. 2. Prohledávání BAC knihovny**

BAC klony byly selektovány pomocí hybridizace sondy značené alkali-labilním digoxigeninem (viz kapitola 3. 3. 1.) se speciální, Hybond-N+ nylonovou membránou (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA), na které byly nanесeny dvě kopie od každého klonu knihovny (tzv. "high-density BAC colony filter"). Membránu byla promývána 1 hodinu v hybridizačním roztoku (1 M NaCl, 5x Denhardt, 0,5 % SDS, 40% formamid, 10 mM Tris-HCl o pH 7,6, 1 mM EDTA) při teplotě 42°C. Samotná hybridizace pak probíhala přes noc při 42°C v hybridizačním roztoku s 200-400 ng denaturované sondy. Po hybridizaci byl filtr promyt 2x 5 minut v odmyvacím pufru I (2x SSC, 0,1% SDS) při pokojové teplotě a poté 2x po 15 minutách v odmyvacím pufru II (0,2x SSC, 0,1% SDS) při 68°C. Následovalo opláchnutí v mycím roztoku (0,3% Tween 20, 25 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl, pH 7,5) a hodinová inkubace při pokojové teplotě v blokovacím roztoku (5% odtučněné sušené mléko, 25 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl, pH 7,5). Poté byl filtr inkubován s protilátkou proti digoxigeninu konjugovanou s alkalickou fosfatázou (Roche Diagnostics), která byla ředěna v blokovacím



roztoku v poměru 1: 10 000. Nadbytečná protilátka byla odstraněna promytím filtru v mycím roztoku 2x 5 minut při pokojové teplotě. Po krátkém opláchnutí v detekčním pufru (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5) a 5 minutové inkubaci se substrátem alkalické fosfatázy CDP-Star byla chemiluminiscence zaznamenána CCD kamerou systému Lumi-Imager LAS-3000 (Fujifilm Life Science, Stamford, CT, USA).

**Tab. 2.** Primery použité ke konstrukci sond pro prohledávání BAC knihovny a Southernovu hybridizaci.

Gen	Název primeru	Sekvence	Délka hybridizující sekvence	T <sub>A</sub> (°C)	Metoda*
<i>Ace-1</i>	AChE1_F01_RT AChE1_R01	5'- CTGCCACATTCATGCGTTCA -3' 5'- AAGTTTTGGTGCGTAAGG -3'	710 bp	58	SH/BAC
<i>Ace-2</i>	AChE2_F01 AChE2_R01_BAC	5'- AAGACAATGCGCGGGTATTTG -3' 5'- TCCTTCATCTTGATTACTTCCG -3'	406 bp	56	SH
<i>EF1</i>	M13 F M13 R	5'- GTTTTCCCAGTCACGAC -3' 5'- GGAAACAGCTATGACCATG -3'	1172 bp	58	SH
<i>Ace-1</i>	AChE1_F01 AChE1_R01	5'- CGATACAAGGCATTCTGCCA -3' 5'- AAGTTTTGGTGCGTAAGG -3'	1373 bp	57	BAC
<i>Ace-1</i>	M13 F M13 R	5'- GTTTTCCCAGTCACGAC -3' 5'- GGAAACAGCTATGACCATG -3'	1373 bp	58	BAC
<i>Ace-2</i>	M13 F M13 R	5'- GTTTTCCCAGTCACGAC -3' 5'- GGAAACAGCTATGACCATG -3'	1468 bp	58	BAC
<i>ldh2</i>	M13 F M13 R	5'- GTTTTCCCAGTCACGAC -3' 5'- GGAAACAGCTATGACCATG -3'	663 bp	58	BAC
<i>RpP0</i>	M13 F M13 R	5'- GTTTTCCCAGTCACGAC -3' 5'- GGAAACAGCTATGACCATG -3'	904 bp	58	BAC
<i>RpS23</i>	M13 F M13 R	5'- GTTTTCCCAGTCACGAC -3' 5'- GGAAACAGCTATGACCATG -3'	204 bp	58	BAC
<i>RpS5</i>	M13 F M13 R	5'- GTTTTCCCAGTCACGAC -3' 5'- GGAAACAGCTATGACCATG -3'	457 bp	58	BAC
<i>RpL7A</i>	M13 F M13 R	5'- GTTTTCCCAGTCACGAC -3' 5'- GGAAACAGCTATGACCATG -3'	721 bp	58	BAC

\*SH-Southernova hybridizace, BAC-prohledávání BAC knihovny

Po vizualizaci byla membrána opláchnuta v deionizované vodě a následně byla inkubována ve „stripovacím“ roztoku (0,2 M NaOH/0,1% SDS) 2x 20 minut při 37°C. Poté byla krátce promyta v 2x SSC pufru (pH 6,8). Vlhká membrána byla po zatevení do plastového sáčku byla do dalšího použití uchovávána ve 4°C v lednici.

Podrobnosti o odečítání výsledků z membrány jsou uvedeny v práci Dalíková (2009). Vyselektované BAC klony byly ověřeny pomocí klasické PCR reakce s použitím specifických primerů (Tab. 3.) (podmínky reakce viz kapitola 3. 2. 2.). Z BAC klonů byla DNA izolována ze 100 ml bakteriální kultury v LB mediu s 12,5 µg/ml chloramfenikolu pomocí Quiagen Plasmid Midi Kit (QUIAGEN) dle protokolu dostupného na internetových stránkách výrobce (“Isolation of BAC DNA using the QUIAGEN Plasmid Midi Kit”). Takto získaná DNA rozpuštěna v deionizované vodě a byla skladována do dalšího použití v -20°C.

**Tab. 3.** Specifické primery použité pro ověření BAC klonů selektovaných z genomové knihovny.

Gen	Název primeru	Sekvence	Délka	T <sub>A</sub> (°C)
<i>Ace-1</i>	AChE1_F01_BAC	5'- CTGCGACAGGAAAGAAAGTTG -3'	~ 800 bp	57
	AChE1_R01_BAC	5'- AGGAACCGTCGATAATGGGA -3'		
<i>Ace-2</i>	AChE2_F01_BAC	5'- TGATTACACTGTTTGGGGAGTC -3'	~ 370 bp	56
	AChE2_R01_BAC	5'- TCCTTCATCTTGATTACTTCCG -3'		
<i>ldh2</i>	IDH2_F01	5'- CGCCTGATGAACAGAGAGTT -3'	~ 660 bp	57
	IDH2_R01	5'- ATTTCCACCTTTCCAGGTTT -3'		
<i>RpP0</i>	RpP0_F01_BAC	5'- ATGGGTAGGGAGGACAAAGC -3'	~ 900 bp	67
	RpP0_R01_BAC	5'- CCTTGATGAATTCCTTGATAG -3'		
<i>RpS23</i>	RpS23_F01	5'- TGGAAGGCYAAAYCCTTYG -3'	~ 200 bp	62
	RpS23_R01	5'- GGAATRTCACCGACGGCRT -3'		

### 3. 4. Southernova hybridizace

Tato metoda byla použita pro srovnání počtu kopií genů *Ace-1* a *Ace-2* v genomu samce a samice obaleče jablečného. Jako kontrola byl použit autosomální gen elongační faktor1 $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ). Ten je v samčím i samičím genomu zastoupen stejným počtem kopií. Zvolená metoda by měla odhalit případnou lokalizaci těchto genů na chromosomu Z podle přibližně 2x silnějšího hybridizačního signálu samce ve srovnání se samicí, jelikož samec má dva pohlavní chromosomy Z, zatímco samice pouze jeden.

#### 3. 4. 1. Extrakce genomové DNA

DNA pro přípravu hybridizační membrány byla získána standardní fenol-chloroformovou extrakcí (Fuková a kol., 2005). Samčí a samičí tkáň byla homogenizována odděleně v tekutém dusíku a inkubována s extrakčním pufrem (0,1 g tkáň na 3 ml extrakčního pufru obsahujícího 100 mM NaCl, 50 mM EDTA, 100  $\mu$ g/ml proteinázy K, 0,5% Sarkosyl, 10 mM Tris-HCl, pH 8) přes noc za mírného třepání při 37°C. Následující den byla přidána RNáza A (Sigma-Aldrich; výsledná koncentrace 10  $\mu$ g/ml) a po hodinové inkubaci byla provedena fenol-chloroformová extrakce. DNA byla precipitována přidáním 1/10 objemu 3 M octanu sodného a 7/10 objemu isopropanolu, promyta 70% etanolem a rozpuštěna v příslušném množství vody. Kvalita izolované DNA byla ověřena štěpením restrikcími enzymy. Koncentrace DNA byla stanovena na fluorometru DyNA Quant 200 (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

### 3. 4. 2. Southernova hybridizace genových sond s genomovou DNA obaleče

Samčí a samičí genomová DNA byla naštěpena dvěma restričními enzymy, *DraI* a *XbaI* (Fermentas, Glen Burnie, MD). Štěpící reakce o objemu 50  $\mu$ l obsahovala 15  $\mu$ g genomové DNA, 1x Tango pufr (Fermentas) a 30 U každého enzymu. Enzymy byly přidány ve dvou krocích, nejdříve 10 U a po hodinové inkubaci ve 37°C bylo přidáno zbylých 20 U. Reakce byla za mírného třepání inkubována ve 37°C přes noc a poté zastavena přidáním nanášecího pufru (1% SDS, 50% Glycerol, 0,05% Bromphenol blue). Na 1% agarózový gel v 1x TBE pufru bylo nanášeno po 6  $\mu$ g samčí a samičí naštěpené DNA a digoxigeninem (DIG) značený velikostní DNA marker ("DNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled"; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, SRN). Naštěpená DNA byla elektroforeticky separována napětím 5 V/cm agarózového gelu. Poté byl gel krátce obarven ethidium bromidem (5  $\mu$ l/100ml) a správná separace a nanáška zkontrolována na transiluminátoru.

Přenesení DNA na membránu, její hybridizace se sondou a následná chemiluminiscenční detekce probíhala s drobnými změnami podle práce Fuková a kol. (2007). DNA byla přenesena na nylonovou membránu Hybond N<sup>+</sup> (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) kapilárním přenosem a fixována přístrojem Stralinker UV Crosslinker (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Poté byla membrána 1h promývána hybridizačním roztokem DIG Easy Hyb (Roche Diagnostics) při 42°C a nakonec inkubována přes noc při stejné teplotě v 10 ml roztoku DIG Easy Hyb s denaturovanou, digoxigeninem značenou alkali-labilní sondou. Po skončení hybridizace byla membrána promývána 2x 5 minut v 0,1% SDS v 2x SSC pufru při pokojové teplotě a 15 minut v 0,1% SDS v 0,2x SSC pufru při teplotě 68°C. Poté byla membrána promyta v 0,3% detergentu Tween 20 v 1x TBS pufru (25 mM Tris-HCl, 0,2 M NaCl, pH 7,5) a 1 hodinu blokována v 5% odtučněném sušeném mléce ("Difco Skim Milk", Becton, Dickinson and Company, Francie) v 1x TBS pufru a další hodinu inkubována v novém blokovacím roztoku s protilátkou proti digoxigeninu konjugovanou s alkalickou fosfatázou (Anti-Digoxigenin-AP ředěný 1:10000) (Roche Diagnostics). Po několikanásobném promytí v 0,3% roztoku Tween 20 v 1x TBS pufru byla membrána opláchnuta v detekčním pufru (0,1 M Tris-HCl, 0,1 M NaCl, pH 9,5) a inkubována s chemiluminiscenčním substrátem CDP-*Star*, ready-to-use (Roche Diagnostics). Vizualitace membrány byla provedena stejně jako v kapitole (3. 3. 2.) Intenzita signálů zájmových genů, v samčích a samičích drahách, byla změřena v programu Adobe Photoshop, verze 7.0 CE a byla provedeno srovnání intenzit s referenčním genem. Membrána byla odmyta (viz kapitola 3. 3. 2.) a připravena k další hybridizaci s referenčním genem *EF-1 $\alpha$* .

### 3. 5. Kvantitativní PCR

Kvantitativní PCR je další metodou, kterou lze ověřit relativní počet kopií cílového genu v genomu na základě hodnot  $C_t$  („threshold cycle“) pro jednotlivé studované geny v samčím a samičím genomu, které jsou porovnané s hodnotami referenčního autosomálního genu u obou pohlaví. Hodnota  $C_t$  je rovna cyklu, kdy amplifikační křivka překročí fluorescenční práh během exponenciální fáze reakce.

DNA pro kvantitativní PCR byla izolována pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen) dle výrobce. Bylo provedeno šest nezávislých izolací samčí a samičí DNA.

Samotná kvantitativní PCR byla provedena pomocí přístroje C1000 Thermal cycler s nástavcem CFX96 Real-Time System (Bio-Rad, Hercules, CA) v 96-ti jamkové mikrodestičce Hard-Shell (Bio-Rad). Každá 25  $\mu$ l reakce obsahovala 20 ng genomové DNA (gDNA) 1x Sybr Green Master Mix (Invitak, Berlín, SRN), 0,4  $\mu$ M forward a reverse primerů (Tab. 4.) a milliQ vodu. Teplotní profil reakce se skládal z počáteční denaturace 3 minuty při 95°C a 45 cyklů sestávajících z 15 sekund dlouhé denaturace při 94°C, nasedání primerů při 58°C 30s, syntézy při 72°C, 30s a závěrečné syntézy, při které se teplota syntézy postupně zvyšovala z 65°C na 95 °C každých 5 sekund o půl stupně.

Geny *Ace-1*, *Ace-2* a referenční gen *EF-1 $\alpha$*  byly amplifikovány samostatně v triplikátech. Experiment byl třikrát opakován. Účinnost primerů pro jednotlivé geny byla odvozena ze standardní křivky získané sérií ředění templátové DNA (neředěná, 10x, 100x, 1000x a 10000x). Získané účinnosti byly zahrnuty do následné analýzy. Odečtená data pro oba studované geny při kvantitativní PCR pro samičí DNA a samičí DNA byla analyzována v programu CFX Manager™ Software Data Analysis Quick Guide, který určil hodnotu  $C_t$  každého vzorku. Získané hodnoty  $C_t$  byly exportovány do programu Microsoft Office Excel 2003 a v něm následně vypočítány relativní počty kopií referenčního genu *EF-1 $\alpha$*  a cílového

genu jak pro samčí, tak pro samičí DNA dle vzorce 
$$\frac{2^{\overline{Ct}_{reference}^{Eff}}}{2^{\overline{Ct}_{cílového\_genu}^{Eff}}}$$
,

kde Eff je účinnost reakce,  $\overline{Ct}$  je průměrná hodnota  $C_t$  hodnot triplikátů. Hodnoty relativního počtu kopií referenčního genu byly porovnány s hodnotami studovaného genu obou pohlaví.

**Tab. 4.** Primery použité při kvantitativní PCR pro geny *Ace-1* a *Ace-2* a referenční *EF-1 $\alpha$* .

Gen	Název primeru	Sekvence	Délka	T <sub>A</sub> (°C)
<i>Ace-1</i>	AChE1_F01_RT	5'- CTGCCACATTCATGCGTTCA -3'	158 bp	58
	AChE1_R01_RT	5'- ACCCAAAGCATAACAGCTGC -3'		
<i>Ace-2</i>	AChE2_F01_RT	5'- TACTACTGTTTGGGGAGTCAGCT -3'	156 bp	58
	AChE2_R01_RT	5'- TTCCCAATATCTTGAGCGCGT -3'		
<i>EF1<math>\alpha</math></i>	EF1_F03_RT	5'- CTGGTTCAAGGGATGGCAGA -3'	154 bp	58
	EF1_R03_RT	5'- ACCAATACCGCCGATTTTGT-3'		

## 4. Výsledky

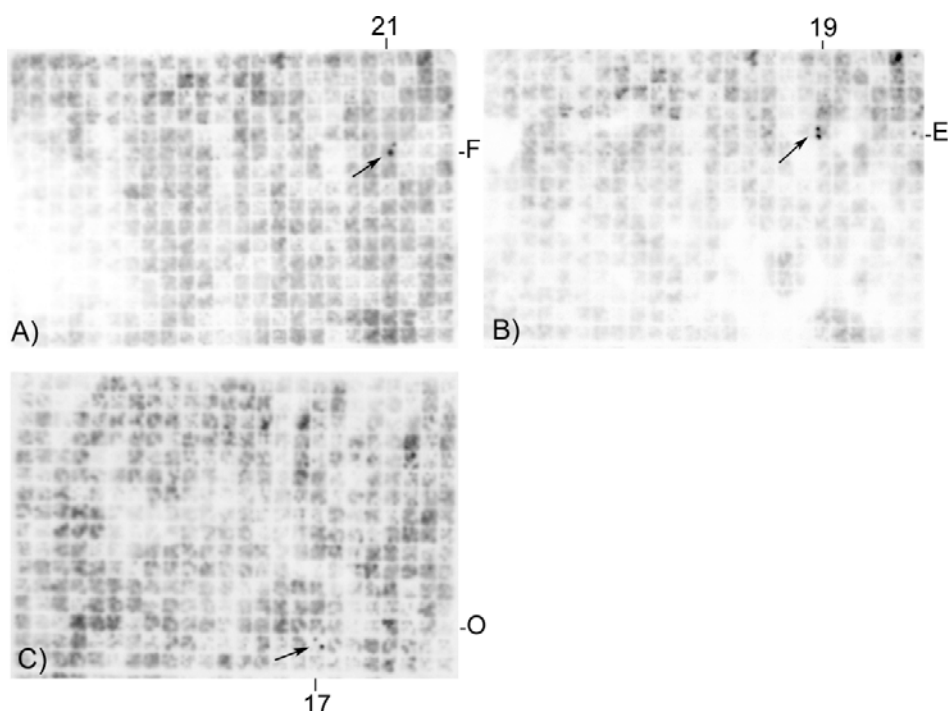
### 4. 1. Izolace ortologů obalače jablečného, *C. pomonella*

Ze zájmových genů byla získána pouze jejich kódující sekvence, a to prostřednictvím PCR amplifikace z cDNA. Využití kódující sekvence, a nikoliv tedy sekvence celého genu s introny, jejichž součástí jsou repetitivní sekvence, snížilo riziko falešně pozitivních klonů při prohledávání BAC knihovny. Dalším důvodem je, že kódující sekvence je mnohem vhodnější pro navrhování specifických primerů, např. pro kvantitativní PCR nebo pro ověřování BAC klonů. V této práci byly získány a zaklonovány ortologní sekvence obou studovaných genů *acetylcholinesteráza 1 (Ace-1)* a *acetylcholinesteráza 2 (Ace-2)* a sekvenci referenčního genu *EF-1 $\alpha$* . Spolu se nimi bylo vyizolováno několik genů, které leží v genomu u bource morušového, *B. mori* na chromosomu 15, podobně jako gen *Ace-1*. Geny byly vytipovány tak, aby rovnoměrně pokryly celou délku chromosomu 15. Jmenovitě se jednalo o tyto geny: *isocitrát dehydrogenáza 2 (Idh2)*, který je u *C.pomonella* s *Ace-1* vazbě, *ribosomální protein P0 (RpP0)* ležící v blízkosti *Ace-1*, *ribosomální protein S23 (RpS23)*, *ribosomální protein L7A, (RpL7A)* a *ribosomální protein S5 (RpS5)*. Seznam primerů použitých pro amplifikaci výše uvedených genů spolu s reakčními podmínkami a délkou získaných sekvencí těchto genů je uveden v Tab. 1. Všechny identifikované sekvence budou poskytnuty internetové databázi GenBank.

### 4. 2. Selekcce klonů z genomové knihovny obaleče jablečného

BAC klony vyselektované z genomové knihovny obaleče jablečného byly označeny podle jejich umístění v genomové knihovně obaleče jablečného. Podrobnosti o odečítání BAC klonů jsou uvedeny v práci Dalíková (2009). V krátkosti, první číslo v názvu odpovídá číslu destičky, následující písmeno a číslo pak odpovídají konkrétnímu řádku a sloupečku v dané destičce. Hybridizací specifických genových sond s membránou, nesoucí kopie všech BAC klonů, se podařilo vyselektovat pouze klony pro geny *Ace-2*, *RpP0* a *Idh2*. Úspěšnou selekci těchto klonů dokumentuje jeden dvojitý signál na membráně s hybridizovaným sondou genu *Ace-2* (Obr. 1A), jediný dvojitý signál sondy genu *Idh2* (Obr. 1B) a tři dvojitě signály sondy genu *RpP0*, z nichž pro další pokusy byl vybrán klon s číslem 02O17 (Obr. 1C). Přítomnost sekvencí ve vyselektovaných BAC klonech potvrdila PCR se specifickými primery (Tab. 4.). Počet nalezených pozitivních a negativních klonů pro jednotlivé geny, spolu s jejich polohami odpovídající BAC knihovně jsou uvedeny v Tab. 5. V případě genu *Ace-1* byly na membráně odečteny tři dvojitě signály klonů, u kterých byly sice při PCR ověření pomocí specifických primerů (Tab. 4.) odečteny produkty očekávané délky, ale po izolaci těchto produktů z 1 % agarózového gelu a jejich osekvenování se ukázalo, že se jednalo o signály falešně pozitivní. Ani po dalších čtyřech pokusech s různými membránami

a kombinacemi primerů pro přípravu sondy *Ace-1*, mezi nimiž byla i sonda použitá pro Southernovu hybridizaci (Tab. 2., další sonda konstruovaná pomocí univerzálních primerů M13 R/F, a specifických pro amplifikaci *Ace-1*; Tab. 1.), se nepodařilo odhalit žádný jiný BAC klon. Vyhledávání klonů nebylo úspěšné ani u genů *RpL7A*, *RpS23* a *RpS5*, kde se alespoň u *RpS23* signály objevily, ale několikrát zopakovaná PCR nepotvrdila přítomnost požadované sekvence v odpovídajících klonech.



**Obr. 1.** Sektory na membráně s pozitivním dvojitým signálem pro geny **A)** *Ace-2*, klon 11F21, **B)** *Idh2* klon 12E19, **C)** *RpP0*- klon 02O17; první dvojičíslo značí kód vzájemné polohy dvojteček přiřazený pro jednotlivé sektory membrány odpovídající destičkám s BAC klony (I-VI).

**Tab. 5.** BAC klony vyselketované z knihovny obaleče jablečného

Gen	Klon	PCR ověření
<i>Ace-1</i>	01L24	-
	33L21	-
	34L24	-
<i>Ace-2</i>	11F21	+
<i>RpP0</i>	02O17	+
	12O03	+
	31O01	+
<i>Idh2</i>	12E19	+
<i>RpS23</i>	17P03	-

+/- pozitivní/negativní ověření přítomnosti sekvence

#### 4. 3. Ověření vazby genů na chromosom Z metodou Souhernovy hybridizace

Vzhledem k tomu, že v BAC knihovně nebyl nalezen klon obsahující gen *Ace-1*, který by byl použit pro fyzické mapování metodou BAC-FISH, bylo nutné ověřit vazbu tohoto genu na pohlavní chromosom Z resp. na autosom dvěma nezávislými metodami. Jako první byla použita Souhernova hybridizace (Nanda a kol., 2000; Itoh a Arnold, 2005; Fuková a kol., 2007, 2009). Pokud bychom předpokládali, že je zájmový gen na chromosomu Z, u samce by byl v genomu přítomen dvakrát, jelikož samčí pohlaví je u motýlů homogametické (vlastní dva pohlavní chromosomy Z). Genom heterogametické samice (WZ) by tudíž obsahoval pouze jednu kopii genu. Hybridizace sondy *Ace-1* (podrobnosti v Tab. 2.) se samčí a samičí genomovou DNA obaleče jablečného, fragmentovanou restrikcími enzymy *DraI* a *XbaI*, odhalila jediný proužek, jehož signál se mezi oběma pohlavími zřetelně lišil svou intenzitou. Výrazně intenzivnější hybridizační signál byl zaznamenán v dráze samčí DNA (Obr. 2A). Po odmytí sondy byl na stejnou membránu hybridizován referenční gen *EF-1 $\alpha$* , který je v genomu u obou pohlaví přítomen ve dvou kopiích. Výsledné hybridizační signály vykazovaly podobnou intenzitu v dráze samčí i samičí DNA (Obr.1A). Po hybridizaci genu *Ace-2* na druhé membráně, připravené společně s první membránou za stejných podmínek, byl pozorován opět jeden proužek podobné intenzity u DNA obou pohlaví (Obr.1B). Stejný charakter signálů byl pozorován i po opětovné hybridizaci *EF-1 $\alpha$*  na stejnou membránu po odmytí sondy pro *Ace-2* (Obr.1B). Po standardizaci intenzity signálů pomocí genu *EF-1 $\alpha$*  v programu Adobe Photoshop 7.0 se potvrdilo, že intenzita signálu genu *Ace-1* je u samčí DNA dvojnásobná v porovnání se samičí DNA, zatímco u *Ace-2* jsou intenzity signálů u obou pohlaví totožné. Výsledky těchto experimentů tak naznačily lokalizaci genu *Ace-1* na chromosomu Z a naopak autosomální lokalizaci genu *Ace-2*.

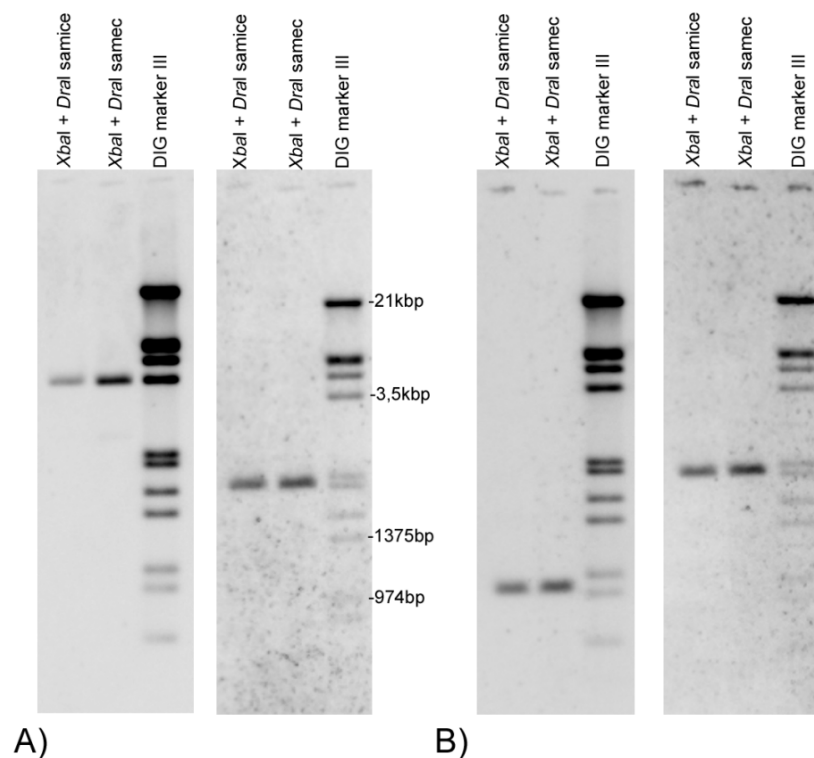
#### 4. 4. Stanovení relativního počtu kopií genů v genomu kvantitativní PCR

Kvantitativní PCR byla zvolena jako další nezávislá metoda k ověření vazby genů *Ace-1* a *Ace-2* na pohlavní chromosom Z resp. na autosom. Principem je stanovení poměru relativního počtu kopií cílového genu k referenčnímu genu prostřednictvím analýzy hodnot *C<sub>t</sub>* u srovnávaných vzorků DNA. Jako referenční gen byl opět zvolen elongační faktor 1 $\alpha$  (*EF-1 $\alpha$* ). Jedná se o autosomální gen, lokalizovaný v genomu bource morušového na autosomu 5 (Miao a kol., 2005).

Pro docílení přesného a objektivního výsledku byly vždy jednotlivé experimenty prováděny se třemi nezávisle izolovanými vzorky genomové DNA (gDNA) pro každé pohlaví obaleče jablečného. U každého vzorku byla reakce prováděna v triplicátech. Reakce byla opakována třikrát, a to vždy s DNA z nové nezávislé izolace. Účinnost reakcí (primerů) pro jednotlivé geny byla stanovena pomocí standardní křivky, která byla získána sérií ředění

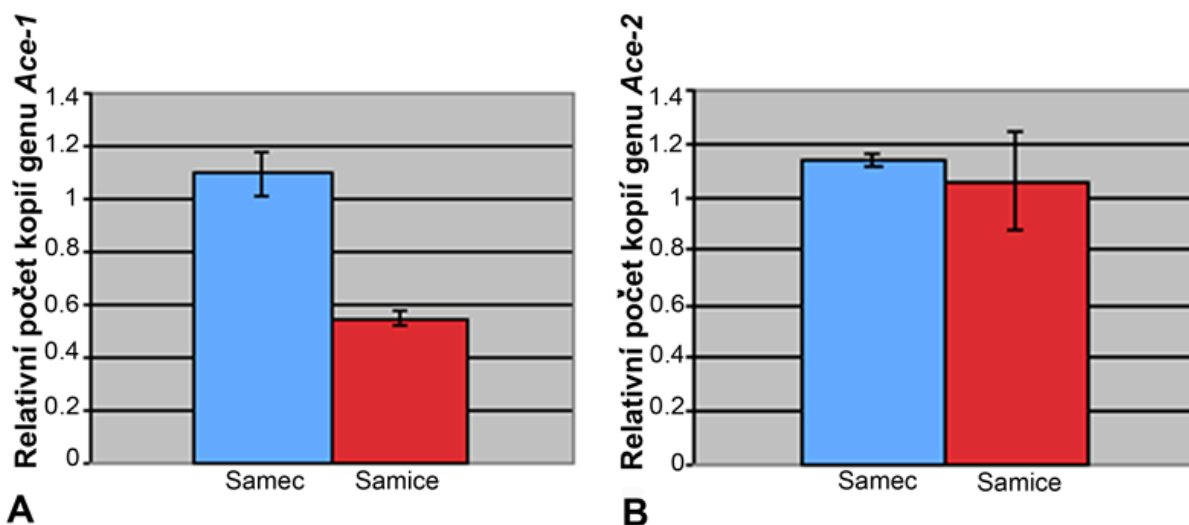
DNA (neředěná, 10x, 100x, 1000x, 10000x), nanesené opět v triplikátech. Analýza byla provedena v programu CFX Manager™ Software Data Analysis Quick Guide, který vygeneroval pro jednotlivé reakce jejich standardní křivku a vypočítal účinnost reakce (primerů). Účinnost reakce s primery genu *Ace-1* byla 95,9%, *Ace-2* 89,5% a *ef1α* 85,8%. Tyto hodnoty byly zahrnuty v analýzách jednotlivých genů.

Získaná data byla použita pro výpočet poměrů hodnot *Ct* dle vzorce v kapitole 3. 4. Na základě těchto výpočtu byl v případě *Ace-1* prokázán přibližný poměr 1:1 (*EF-1α* ku *Ace-1*) u samčího gDNA, zatímco analýza poměru hodnot *Ct* u samičího genomu vykazovala poměr 1:2 (*EF-1α* ku *Ace-1*) (Obr. 3A). Při srovnání genů *Ace-2* a *EF-1α* odpovídal poměr průměrných *Ct* hodnot poměru 1:1 u obou pohlaví (Obr. 3B). Výsledky kvantitativní PCR tak potvrdily, že samice obaleče mají poloviční dávku genu *Ace-1*, z čehož vyplývá, že je tento gen lokalizován na chromosomu Z. Naopak u genu *Ace-2* byla potvrzena vazba na autosom.



**Obr. 2.** Výsledky Southernovy hybridizace sond připravených z genů **A)** *Ace-1* a referenčního *EF-1α* **B)** *Ace-2* a referenčního *EF-1α* k 6 μg samčí a samičí genomové DNA obaleče jablečného štěpené současně restrikcími enzymy *Dral* a *Xbal*. Sonda genu *EF-1α* byla hybridizována na odmytou membránu po hybridizaci genu *Ace-1*, resp. *Ace-2*. Intenzita signálu při přibližně stejném množství nanesené DNA závisí na počtu kopií dané sekvence v genomu. Navíc byla intenzita signálu v dráze samčí a samičí DNA standardizována porovnáním signálu s referenčním genem *EF-1α*. Výrazně vyšší intenzita proužku u samce v případě *Ace-1* naznačuje vazbu tohoto genu na chromosom Z. Naopak podobný poměr signálů genů *Ace-2* a *EF-1α* v drahách obou pohlaví predikuje autosomální lokalizaci.





**Obr. 3.** Výsledky analýzy relativního počtu kopií genů **A)** *Ace-1* a **B)** *Ace-2* v genomu samce a samice obaleče jablečného. Ze srovnání poměru relativního počtu kopií genu *Ace-1* s referenčním genem *EF-1α* (1:1) vyplývá, že samčí genom obsahuje dvě kopie tohoto genu, zatímco samičí pouze jednu (2:1). To odpovídá vazbě na pohlavní chromosom Z. Naopak gen *Ace-2* u obou pohlaví vykazuje s referenčním genem přibližně poměr 1:1, což dokládá, že obě pohlaví mají dvě kopie genu *Ace-2*, v souladu s jeho předpokládanou autosomální lokalizací. Hodnota standardních odchylek pro gen *Ace-1* je 0,08 u samce a 0,025 u samice, pro gen *Ace-2* 0,025 u samec a 0,14 u samice.

## 5. Diskuse

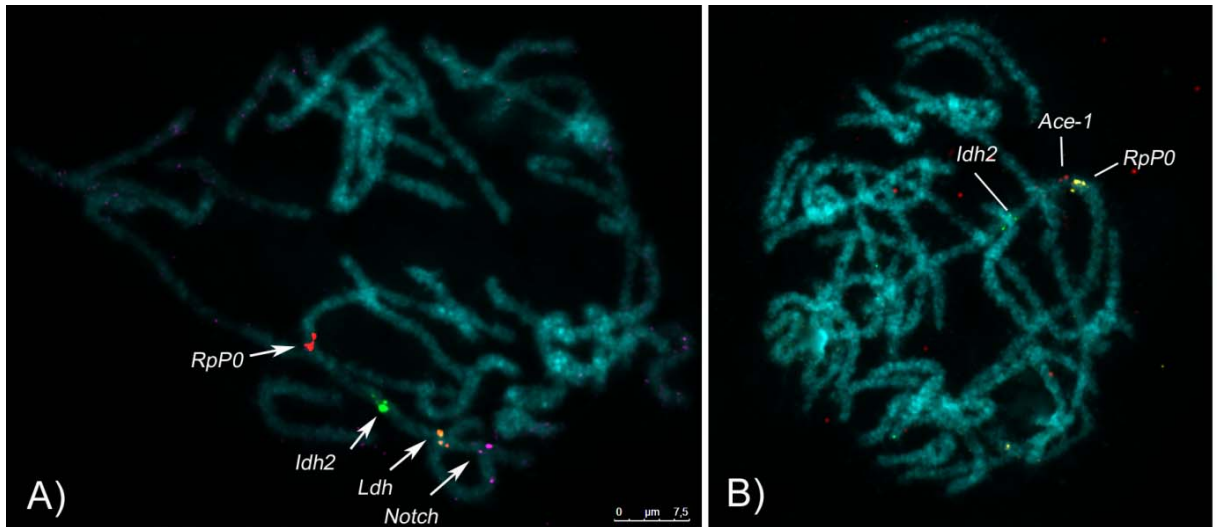
Cílem této práce bylo ověřit hypotézu o možné translokaci genu *Ace-1*, kódujícího acetylcholinesterázu, z autosomu na pohlavní chromosom Z u obaleče jablečného, *Cydia pomonella*, zástupce čeledi Tortricidae, u které je tato translokace předpokládána na základě dříve publikovaných údajů (Heckel a kol., 1998). Jelikož je známo, že u modelového druhu bource morušového, *Bombyx mori*, je tento gen lokalizován na autosomu 15, bylo nutné pro získání představ o rozsahu této translokace vytipovat i další geny, které u bource leží v téže vazebné skupině, tak aby rovnoměrně pokryly celý chromosom 15. K tomuto účelu byly z genomu obaleče jablečného získány pomocí PCR částečné ortologní sekvence celkem šesti genů, jmenovitě *acetylcholinesterázy 1 (Ace-1)*, *isocitrát dehydrogenázy 2 (Idh2)*, *ribosomálního proteinu P0 (RpP0)*, *ribosomálního proteinu S23 (RpS23)*, *ribosomálního proteinu L7A (RpL7A)* a *ribosomálního proteinu S5 (RpS5)*. Dále byly získány sekvence *acetylcholinestrázy 2 (Ace-2)* a *elongačního faktoru 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ )*, který je u bource zařazen do vazebné skupiny 5 (Miao a kol., 2005) a který posloužil v dalších analýzách jako autosomální referenční gen. Tyto sekvence byly použity k přípravě hybridizačních sond, kterými byla prohledávána BAC knihovna obaleče jablečného. V práci se podařilo získat BAC klony obsahující gen *Ace-2*, lokalizovaný u bource na chromosomu 9, a gen *Idh2*, který je u obaleče jablečného, na rozdíl od bource, vázán na chromosom Z (D.P. Pashley, nepublikované výsledky citované v práci Heckel a kol., 1998). Dále byl identifikován BAC klon obsahující gen *RpP0*, jenž na chromosomu 15 bource leží blízko genu *Ace-1*. Avšak klony obsahující geny *Ace-1*, *RpS23*, *RpL7A* a *RpS5* nebyly v knihovně nalezeny. Použitá BAC knihovna obsahuje přibližně čtyřnásobek genomu samic obaleče jablečného (Dalíková, 2009). Avšak protože se ve všech případech jedná o geny, které byly během evoluce translokovány na pohlavní chromosom Z, obsahují klony odvozené od chromosomu Z pouze dvojnásobek genetického obsahu Z. Je tedy možné, že klony s výše uvedenými čtyřmi geny včetně genu *Ace-1* v knihovně zcela chybí. Alternativní vysvětlení, že připravené sondy nehybridizovaly s hledanými klony, je nepravděpodobné vzhledem k tomu, že jako sondy byly použity pouze kódující sekvence a že se jedná o velmi konzervativní geny.

V této práci byla pro samotné ověření vazby genů *Ace-1* a *Ace-2* na pohlavní chromosom Z resp. autosom provedena analýza porovnání počtu kopií obou genů v genomu samce a samice dvěma nezávislými metodami, Southernovou hybridizací genových sond se samčí a samičí DNA a kvantitativní PCR. V obou případech byl jako referenční použit gen *EF-1 $\alpha$* . Výsledky obou metod jednoznačně prokázaly poloviční dávku genu *Ace-1* v genomu samic ve srovnání s genomem samce a podpořily tak hypotézu o lokalizaci tohoto genu na pohlavním chromosomu Z obaleče jablečného. V souladu s předpoklady byla oběma

metodami zjištěna shodná dávka genu *Ace-2* u obou pohlaví, což potvrdilo, že se jedná o autosomální gen.

Vlastní mapování genů pomocí BAC klonů izolovaných v této práci, bylo prováděno P. Nguyenem "vícebarevnou" BAC-FISH během jeho stáže v laboratoři K. Sahary (Hokkaido University, Sapporo, Japonsko), která je vybavena specifickými fluorescenčními filtry, umožňujícími zároveň mapovat až šest sond značených pěti různými fluorochromy (viz Sahara a kol., 2007). Díky tomu bylo možné efektivně integrovat většinu genetických markerů dosud získaných v naší laboratoři do detailní fyzické mapy chromosomu Z obaleče jablečného (P. Nguyen, nepublikované výsledky). Na Obr. 4 A jsou identifikované BAC klony hybridizovány na chromosomální preparáty pachytenních bivalentů samců obaleče postupem popsaným v práci Nguyen (2009). Pro identifikaci bivalentu chromosomu Z zde byla použita BAC sonda obsahující gen *laktát dehydrogenáza (Ldh)*, který byl již dříve lokalizován na chromosomu Z (Nguyen, 2009). Zároveň s touto sondou byly hybridizovány BAC sondy genů *RpP0* a *Idh2* (izolovaných v této práci) a genu *Notch*, jenž byl izolován a jeho vazba na chromosom Z potvrzena v diplomové práci V. Kůty (Kůta, 2011). Všechny čtyři sondy hybridizovaly k jednomu pachytennímu bivalentu (P. Nguyen, nepublikované výsledky). Pořadí dvojitých signálů sond pro jednotlivé geny bylo následovné: *RpP0 – Idh2 – Ldh – Notch*. Toto pořadí mapovaných genů obaleče jablečného odpovídá rozložení těchto genů na chromosomu 15 bource morušového s výjimkou genu *Ldh*, který leží u bource na chromosomu Z a mezi studované geny se patrně dostal chromosomální přestavbou (Obr. 6). Protože se nepodařilo v rámci této práce identifikovat klon obsahující gen *Ace-1*, byla ortologní sekvence genu *Ace-1* mapována modifikovanou metodou FISH pro přímou lokalizaci genových sekvencí motýlů (Yoshido a kol., 2010). Touto metodou byl úspěšně lokalizován gen *Ace-1* spolu s BAC sondami pro geny *Idh2* a *RpP0*. Hybridizační signál sondy genu *Ace-1* se nacházel mezi signály BAC sond pro geny *Idh2* a *RpP0*, v těsné blízkosti místa hybridizace sondy pro *RpP0* (Obr. 4B; P. Nguyen, nepublikované výsledky). Toto pořadí signálů na chromosomu Z obaleče jablečného odpovídá i pořadí odpovídajících genů na chromosomu 15 bource morušového. Výsledky fyzického mapování tak ukázaly, že část genomu odpovídající u bource prakticky celému chromosomu 15 je u obaleče translokována na chromosom Z, což potvrzuje výsledky této práce získané Southernovou hybridizací a kvantitativní PCR (viz výše). Výsledky též ukázaly poměrně konzervované pořadí genů mezi chromosomem 15 bource a translokovanou částí chromosomu Z obaleče. Mapování tak definitivně potvrdilo vazbu genu *Ace-1* na chromosom Z obaleče jablečného. Vysoce konzervovaná syntenie genů včetně konzervovaného pořadí genů mezi původní (ancestrální) částí chromosomu Z obaleče a chromosomu Z bource byla již prokázána v předchozí studii (Nguyen, 2009). Kromě toho, nedávno provedená BAC-FISH jiným členem naší laboratoře se sondami pro geny *Ace-2*, *RpP0* a *Period (Per)*, jehož vazba na

chromosom Z byla zjištěna dříve (Fuková a kol., 2009; Nguyen, 2009), potvrdila lokalizaci genu *Ace-2* na jednom z autosomů v souladu s výsledky této práce (Obr. 5; M. Dalíková, nepublikované výsledky).



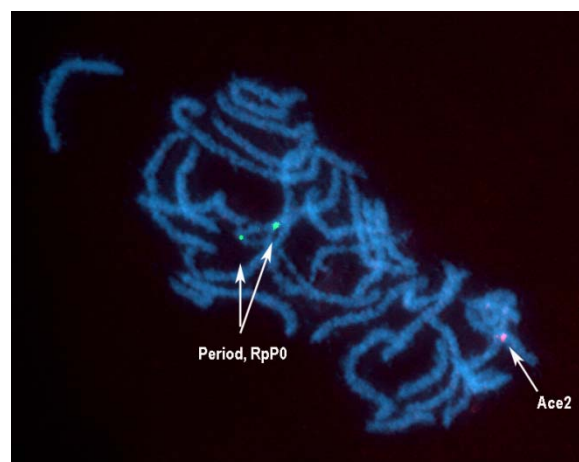
**Obr. 4.** Výsledky fyzického mapování genů na pachytenních bivalentech samců obaleče jablečného metodou BAC-FISH (věnoval P. Nguyen, nepublikované výsledky). **A)** BAC sondy pro geny *RppP0*, *Idh2* a *Notch* hybridizují na stejném pachytenním bivalentu jako BAC klon *Ldh*, který byl již dříve lokalizován na chromosomu Z (Nguyen, 2009). **B)** Hybridizace BAC sond pro geny *RppP0* a *Idh2* spolu s přímo značenou sondou ortologní sekvence genu *Ace-1*; signály všech tří sond jsou lokalizovány na jediném pachytenním bivalentu identifikovaném jako chromozom Z.

Přesunutí původně autosomálního genu *Ace-1* na pohlavní chromosomy může mít velký význam zejména z hlediska adaptivní evoluce jejich genů. Pohlavní chromosomy hrají v tomto případě důležitou roli, jelikož je na nich přítomno mnohem větší množství genů souvisejících s reprodukcí a speciací než na autosomech; tento jev je nazýván „velký efekt X (Z) chromosomu“ nebo Coyneovo pravidlo (Coyne, 1984; Coyne a Orr, 1989). Významný vliv chromosomu X byl potvrzen např. studiem hybridních zón octomilek, kdy bylo zjištěno, že introgrese chromosomu X mezi druhy je menší než introgrese autosomů (Masly a Presgraves, 2007).

Předpokládá se, že lokusy na pohlavním chromosomu X (Z) mají vyšší rychlost adaptivní evoluce než lokusy na autosomech (Charlesworth a kol., 1987). Podle modelu v práci Rice (1984) usnadňují pohlavní chromosomy šíření sexuálně antagonistických genů v populaci, čímž dojde ke spuštění evoluce pohlavně dimorfních znaků. Tento model také předpokládá, že by měly recesivní sexuálně antagonistické geny být ve velkém počtu

zastoupeny na chromosomech X a Z. Frekvence recesivní alely takového genu, která je prospěšná pro heterogametické pohlaví (XY či WZ) a škodlivá pro pohlaví homogametické (XX či ZZ), se v populaci bude zvyšovat v případě, že bude vázána na pohlavní chromosom X či Z. To je dáno tím, že alela lokalizovaná na X/Z chromosomu heterogametického pohlaví může okamžitě podléhat přímé hemizygotní selekci (Haldane, 1924), zatímco u homogametického pohlaví bude před negativní expresí skryta standardní alelou.

Rychlost evoluce prostřednictvím pozitivní selekce se tak pro recesivní alely a jejich případné mutace zvyšuje právě díky umístění na chromosomu X u samčího heterogametického pohlaví (tzv. „fast X effect“). U druhů, které mají opačný chromosomální systém, tedy heterogametické samice WZ jako jsou motýli a ptáci, představuje chromosom Z analogický model - tzv. „faster Z chromosom“.



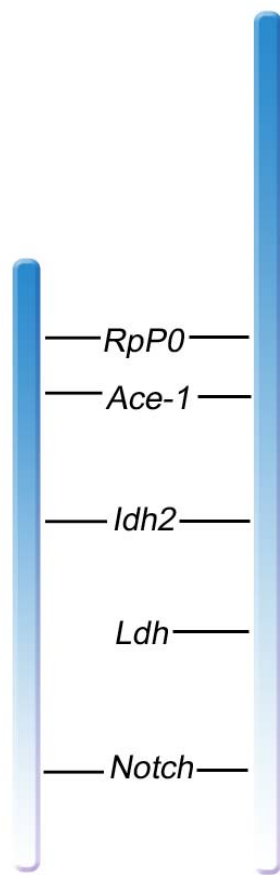
**Obr. 5.** Výsledek BAC-FISH sond pro gen *Ace-2* a pro dva geny lokalizované na chromosomu Z, *RpP0* (P. Nguyen, nepublikováno) a *Per* (Nguyen, 2009) na pachytenních bivalentech samců obaleče jablečného (věnovala M. Dalíková, nepublikované výsledky). BAC sonda genu *Ace-2* značený fluorochromem Cy3-dUTP (červený signál) hybridizuje k autosomu, zatímco sondy genů *RpP0* a *Per* značené fluorochromem Alexa Fluor 488-dUPT (zelené signály) hybridizují ke stejnému bivalentu, identifikovanému jako pár pohlavních chromosomů ZZ.

Důsledky plynoucí z přesunu genu pro acetylcholinovou rezistenci na pohlavní chromosom Z u motýlů jsou tedy zjevné. Dá se předpokládat, že nově vzniklé mutace mohou díky vazbě tohoto genu na pohlavní chromosom Z podléhat u samic pozitivní selekci a jsou tak mnohem rychleji fixovány, než by tomu bylo v případě vazby na autosom. Odpověď na toxické látky včetně insekticidů v podobě vzniku rezistence prostřednictvím acetylcholinesterázové necitlivosti tak může být velmi rychlá.

Vedle genu pro *Ace-1* se na chromosomu Z obaleče jablečného vyskytuje také ortholog genu pro GABA receptor (P. Nguyen, nepublikované výsledky). Mutace v tomto genu způsobuje necitlivost k insekticidům ze skupiny cyklodienů (ffrench-Constant a kol., 1993a,b). Paralogy tohoto genu leží na chromosomu Z také v genomu *B. mori*. Dalším zajímavým případem rezistence vázané na pohlaví je rezistence některých populací obaleče jablečného vůči granulovirům, které jsou významným prostředkem v boji proti škůdcům v organickém zemědělství. Granulovirus CpGV je druhově specifický a extrémně virulentní patogen působící na obaleče jablečného (Huber, 1998). Přesto byly zaznamenány případy velmi rychlého vzniku rezistence u obaleče (Sauphanor a kol., 2006). Zpětná křížení provedená v práci Asser-Kaiser a kol. (2007) odhalila, že je tato rezistence vázána na pohlaví. Mechanismus rezistence však dodnes nebyl identifikován, k čemuž mohla přispět skutečnost, že byly vyloučeny některé kandidátní geny na základě chybného předpokladu úplné syntenie genů mezi chromosomy Z obaleče a referenčního druhu, *B. mori*. Tato práce však jasně prokázala chybnost tohoto předpokladu, a může tak významně napomoci identifikaci genu souvisejícího s rezistencí vůči CpGV.

Vazba genu *Ace-1* na pohlavní chromosom Z byla prokázána také u dalšího druhu z čeledi Tortricidae, obaleče východního (*Grapholita molesta*) (Kanga a kol., 2001). Jiný gen, glutamát oxaloacetát transferáza (*GOT-1*), který leží dle genomové databáze KAIKObase na chromosomu 15 bource morušového a jehož autosomální dedičnost byla prokázána u černopásky *Heliothis virescens* (Noctuidae) (Heckel a kol. 1998), je vázán na pohlaví u obaleče *Choristoneura fumiferana* (May a kol., 1977; citován v práci Heckel a kol., 1998). Na základě vazby tohoto genu na pohlaví a faktu, že je chromosom Z největším elementem karyotypu zástupců čeledi Tortricidae, Heckel a kol. (1998) předpověděl, že se jím navržená chromosomální přestavba může vyskytovat u „mnoha druhů čeledi Tortricidae“. Výsledky této práce společně s informacemi o vazbě jednotlivých genů na pohlavní chromosom Z různých druhů (viz výše) naznačují, že k popsané chromosomální přestavbě mohlo dojít u společného předka podčeledí Olethreutinae (zahrnující *C. pomonella* a *G. molesta*) a Tortricinae (zahrnující *C. fumiferana*). Vzhledem k tomu, že celá čeleď Tortricidae zahrnuje 687 ekonomicky významných druhů, tj. potencionálních škůdců (Roe a kol., 2010), je informace o možné translokaci genů pro rezistenci významná také pro dlouhodobě udržitelnou regulaci jejich populací. K jednoznačnému závěru o původu výše popsané chromosomální přestavby je však třeba dalšího studia.

Tato práce jako první přímo potvrdila domněnku o translokaci genu *Ace-1* u obaleče jablečného, *C. pomonella*, a poskytuje tak motivaci pro ověření přítomnosti této přestavby u dalších druhů čeledi Tortricidae. Prokázaná vazba genu podmiňující acetylcholinesterázovou rezistenci na pohlavní chromosom Z může přispět k objasnění rychlé adaptace obaleče na vysoké dávky insekticidů, kterým je v ošetřovaných oblastech vystavován.



Ch. 15 *B. mori*      Ch. Z *C. pomonella*

**Obr. 6.** Schématický přehled srovnání pořadí genů mezi chromosomem 15 bource morušového, *Bombyx mori*, a chromosomem Z obaleče jabločného, *Cydia pomonella*. S výjimkou genu *Ldh*, který je u bource morušového lokalizován na chromosomu Z, je zachováno pořadí genů mezi transkolovanou částí chromosomu Z obaleče jablečného a autosomem 15 bource morušového.

## 6. Souhrn

Tato práce se zabývá ověřením hypotézy translokace jednoho z genů kódujících acetylcholinesterázu na pohlavní chromosom Z obaleče jablečného, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidea). V rámci této práce byly na základě znalosti sekvencí genů pro acetylcholinesterázu 1 (*Ace-1*) a 2 (*Ace-2*) obaleče jablečného navrženy specifické primery. Oba geny byly úspěšně izolovány, zaklonovány a sekvenováním ověřeny. Díky přístupu do databáze osekvenovaného genomu bource morušového, *Bombyx mori* bylo vytipováno dalších pět markerů kolokalizovaných s *Ace-1* na chromosomu 15. Pomocí degenerovaných primerů byly izolovány jejich ortology z genomu obaleče jablečného. Jmenovitě *isocitrát dehydrogenáza2 (ldh2)*, *ribosomální protein P0 (RpP0)*, *ribosomální protein S23 (RpS23)*, *ribosomální protein L7A, (RpL7A)*, *ribosomální protein S5 (RpS5)*. Ze získaných zaklonovaných sekvencí byly zkonstruovány sondy pro následné prohledání BAC knihovny obaleče jablečného. Podařilo se vyselektovat klony pro geny *Ace-2*, *ldh2*, a *RpP0*. Tyto klony posloužily jako sondy při fyzickém mapování zájmových genů metodou BAC-FISH v rámci souvisejícího projektu naší laboratoře. Z důvodu neúspěšné identifikace klonu obsahujícího sekvenci genu *Ace-1* v BAC knihovně obaleče jablečného bylo využito analýz schopných odhalit případnou vazbu genu na pohlavní chromosom Z. K provedení těchto analýz bylo nutné vhodně zvolit a izolovat referenční autosomální gen. Často používaným referenčním genem je *elongační faktor 1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ )*, který byl pro tyto analýzy pomocí degenerovaných primerů vyizolován, zaklonován a sekvenováním identifikován. Vazebná analýza metodou Southernovy hybridizace obou genů potvrdila vazbu genu *Ace-1* na pohlavní chromosom Z a lokalizaci *Ace-2* na autosomu. Stejný výsledek poskytlo i srovnání relativního počtu kopií těchto genů v genomu mezi samčím a samičím pohlavím metodou kvantitativní PCR.

Výsledky této práce jako první potvrdily domněnku o přesunu genu *Ace-1* translokací chromosomu 15 na pohlavní chromosom Z u obaleče jablečného. Ta vychází z faktu, že v rámci celé čeledi Tortricidae jsou u cytogenticky prozkoumaných druhů pohlavní chromosomy nápadně větší než autosomy na rozdíl od ostatních skupin motýlů, což by mohla vysvětlit právě translokace autosomu na chromosom Z. Translokace genu *Ace-1* je významná z toho důvodu, že geny vázané na pohlavní chromosom Z podléhají pozitivní selekci a jsou rychleji fixovány v populaci, než by tomu bylo v případě vazby na autosom. Mutantní alela genu *Ace-1* zodpovědná za rezistenci k insekticidům zvyšuje zdatnost populace, a je tak rychleji fixována.

Závěry vyvozené z této práce tak pomohou vysvětlit podstatu rychlého vývoje resistance u obaleče jablečného. Mohou též přispět k pochopení úspěšnosti ostatních motýlích škůdců z čeledi Tortricidae.



## 7. Literatura

- Aldridge W. N. (1950) Some properties of specific cholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl *p*-nitrophenyl thiophosphate (E605) and analogues. *Biochem. J.* **46**:451-460
- Ankersmit G. W. (1953) DDT-resistance in *Plutella maculioennis* (Curt.) (Lep.) in Java. *Bull. Entomol. Res.* **44**:421-23
- Argentine J. A., Clark J. M., Ferro D. N. (1989) Genetics and synergism of resistance to azinphosmethyl and permethrin the Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* **82**:698-705
- Aseser-Kaiser S., Fritsch E., Undorf-Spahn K., Kienzle J., Eberle K. E., Gund N. A., Reineke A., Zebitz C. P. W., Heckel D. G., Huber J., Jehle J. A. (2007) Rapid emergence of baculovirus resistance in codling moth due to dominant sex-linked inheritance. *Science* **317**:1916-1918
- Barnes M. M. 1991. Codling moth occurrence, host race formation, and damage. V: Tortricid Pests: Their Biology, Natural Enemies and Control. *Editováno*: L. P. S. Van der Geest a H. H. Evenhuis. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp.313–327.
- Beak J. H., Kim J. U., Lee D. W., Chung B. K., Myiata T., Lee S. H. (2005) Identification and characterization of *ace1*- type acetylcholinesterase likely associated with organophosphate resistance in *Plutella xylostella*. *Pest. Biochem. Physiol.* **81**:164-175
- Beldade P., Saenko S. V., Pul N., Long A. D. (2009) A gene-based linkage map for *Bicyclus anynana* butterflies allows for a comprehensive analysis of synteny with the lepidopteran reference genome. *PLoS Genet.* **5**:e1000366
- Bergé J. B., Feyreisen R., Amichot M. (1998) Cytochrome P450 monooxygenase and insecticide resistance in insects. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **353**:1701-1705
- Brown T. M., a P. K. Bryson (1992) Selective inhibitors of methyl parathion-resistant acetylcholinesterase from *Heliothis virescens*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **44**:155–64
- Brun-Barale A., Bouvier J.-Ch., Pauron D., Bergé J.-B., Sauphanor B. (2005) Involvement of a sodium channel mutation pyrethroid resistance in *Cydia pomonella* L., and development of diagnostic test. *Pest. Manag. Sci.* **61**:549-554
- Cassanelli S., Reyes M., Rault M., Manicardi G. C., Sauphanor B. (2006) Acetylcholinesterase mutation in an insecticide-resistant population of the codling moth *Cydia pomonella* (L.). *Insec. Biochem. Molecul. Biol.* **36**:642-653
- Charlesworth, B., Coyne, J. A., a Barton, N. H. 1987. The relative rates of evolution of sex-chromosomes and autosomes. *Amer. Natural.* **130**:113-146
- Cheng E. Y. Chou T. M., Kao C. H. (1983) Insecticide resistance study in *Plutella xylosella* (L.). IV. The activities of glutathione-S-transferase in the organophosphorus-resistant strains. *J. Agric. Res. China.* **32**:373-378
- Coyne J. A. (1984) Genetic basis of male sterility in hybrids between two closely related species of *Drosophila*. *Evolution* **81**:4444- 4447.
- Coyne J. A. and Orr, H. A. (1989) Two rules of speciation. V: Speciation and Its Consequences, *Editováno*: D. Otte and J. Endler. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, pp.180-207
- Dalíková M. (2009) Využití BAC klonů při studiu pohlavního chromosomu W obaleče jablečného *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). Diplomová práce, v češtině, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Česká republika, 30 pp.

- French-Constant R. H., Steichen J. C., Rocheleau T. A., Aronstein K., Roush R. T. (1993) A single amino substitution in a  $\gamma$ -aminobutyric acid subtype A receptor locus is associated with cyclodiene insecticide resistance in *Drosophila* populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 1957-1961
- French-Constant R. H., Rocheleau T. A., Steichen J. C., Chalmers A. E. (1993) A point mutation in a *Drosophila* GABA receptor confers insecticide resistance. *Nature* **363**:449-451
- Fournier D., Bride J.-M., Hoffman F., Karch F. (1992) Acetylcholinesterase two types of modifications confer resistance to insecticide. *J. Biol. Chem.* **267**:70-74
- Fournier D. (2005) Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations. *Chem. Biol. Interact.* **157**:257-61
- Fournier D., Karch, F., Bride J. M., Hall L. M. C., Berge J.-B. a Spierer, P. (1989) *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase gene, structure, evolution and mutations. *J. Mol. Evol.* **210**:15-22
- Fuková I., Nguyen P., Marec F. (2005) Codling moth cytogenetics: karyotype, chromosomal location of rDNA, and molecular differentiation of sex chromosomes. *Genome* **48**:1083-1092
- Fuková I., Traut W., Vitková 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**:135-145
- Fuková I., Neven L. G., Bárcenas N. M., Gund N. A., Dalíková M., Marec F. (2009) Rapid assessment of the sex of codling moth *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae) eggs and larvae. *J. Appl. Entomol.* **133**:249-261.
- Fuentes-Contreras, E., Reyes M., Barros, W., Sauphanor, B. (2007) Evaluation of azinphosmethyl resistance and activity of detoxifying enzymes in codling moth (Lepidoptera:Tortricidae) from central Chile. *J. Econom. Entomol.* **100**:551-556
- Gao J. R., Kambhampati S., Zhu K. Y. (2002) Molecular cloning and characterization of a greenbug (*Schizaphis graminum*) cDNA encoding acetylcholinesterase possibly evolved from a duplicate gene lineage. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **32**:765-775
- Georghiou G. P. (1986). The magnitude of resistance problem, V: Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management. Nat. Acad. Press, Washington DC, pp.11-13
- Gilbert R. D., Bryson P. K., Brown T. M. (1996) Linkage of acetylcholinesterase insensitivity to methyl parathion resistance in *Heliothis virescens*. *Biochem. Genet.* **34**:297-312
- Goodyer G. J., Wilson A. G. L. (1975) Insecticide resistance in the cotton bollworm *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in the Namoi Valley of New South Wales, Australia. *J. Aust. Entomol. Soc.* **14**:171
- Goodyer G. J., Greenup L. R. (1980) A survey of insecticide resistance in the cotton bollworm *Heliothis armigera* (Hübner) (Lepidoptera : Noctuidae) in New South Wales. *Gen. Appl. Entomol.* **12**:37
- Gunning R. V., Easton C. S. (1994) Endosulfan resistance in *Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *J. Aust. Entomol. Soc.* **33**:9-12
- Gunning R. V., Moores G. D., a Devonshire A.L. (1996) Insensitive acetylcholinesterase and resistance to thiodicarb in Australian *Helicoverpa armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* **55**:21-28
- Haldane J. B. S. (1924) A mathematical theory of natural and artificial selection, Part I. Trans. *Camb. Philos. Soc.* **23**:19-41

- Heather N. W. (1986) Sex- linked resistance to pyrethroids in *Sitophilus oryzae* (L.) (Coleoptera: Curculionidae). *J. Stored. Prod. Res.* **22**:15-20
- Heckel D. G. (2010) Molecular genetics of insecticide resistance in Lepidoptera. V : Goldsmith M. R., Marec F. (eds.) *Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp.239-269
- Heckel D. G., P. K. Bryson, and T.M. Brown. (1998) Linkage analysis of insecticide-resistant acetylcholinesterase in *Heliothis virescens*. *J. Hered.* **89**:71–78
- Huang Y., Qiao C., Williamson M. S., Devonshire A. L. (1997) Characterization of acetylcholinesterase gene from insecticide-resistant houseflies (*Musca domestica*). *Chin. J. Biotechnol.* **13**:177-183
- Huber J. (1998) Western Europe. V: Hunter-Fujita F. R., Entwistle Ph. F., Evans H. F., Crook N. E., (Eds), *Insects Viruses and Pest Management*, Wiley & Sons, pp.201-215
- Huchard E., Martinez M., Alout H., Douzery E. J. P., Lutfalla G., Berthomieu A., Berticat C., Raymond M., Weill M. (2006) Acetylcholinesterase genes within the Diptera: takeover and loss in true flies. *Proc. R. Soc. Lond. B* **273**: 2595-2604
- Itoh Y., Arnold A. P. (2005) Chromosomal polymorphism and comparative painting analysis in the zebra finch. *Chrom. Res.* **13**:47-56.
- Jiggins C. D., Mavarez J., Beltran M., McMillan W. O., Johnston J. S., Bermingham E. (2005) A genetic linkage map of the mimetic butterfly *Heliconius melpomene*. *Genetics* **171**:557-570
- Kanga L. H. B., Pree D. J., van Lier J. L., Whitty K.J. (1997) Mechanisms of resistance to organophosphorus a carbamate insecticides in Oriental fruit moth population (*Grapholita molesta* Brusck). *Pestic. Biochem. Physiol.* **59**:11-23
- Kanga L. H. B., Pree D. J., van Lier J. L., Walker G. W. (1999) Monitoring for resistance to organophosphorus, carbamate, and pyrethroid insects in Oriental fruit moth (Lepidoptera: Tortricidae). *Can. Entomol.* **134**: 441-450
- Kanga L. H. B., Pree D. J., Plapp Jr. F. W., Van Lier J. L. (2001) Sex-linked altered acetylcholinesterase resistance to carbamate insecticides in adults of the Oriental fruit moth, *Grapholita molesta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Pesti. Biochem. Physiol.* **71**:29-39
- Kozaki T., Shono T., Tomita T. a kol. (2001) Fenitroxon insensitive acetylcholinesterases of the housefly, *Musca domestica* associated with point mutations. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**:991–997
- Kůta V. (2011) Izolace, charakterizace a lokalizace ortologní sekvence genu *Notch* u obaleče jablečného, *Cydia pomonella*. Diplomová práce, v češtině, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Česká republika, 40 p.
- Lee D.- W., Choi J. Y., Kim W. T., Je Y. H., Song J. T., Chung B. K., Boo K. S., Koh Y. H. (2007) Mutations of acetylcholinesterase1 contribute to prothiofos-resistance in *Plutella xylostella* (L.). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **353**:591–5999
- Lee D.-W., Kim S.-S., Shin S. W., Kim W. T., Boo K. S. (2006) Molecular characterization of two acetylcholinesterase genes from the oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta* (Guenee). *Bioch. Biophysic. Act.*, **1760**:125-133
- Li F., Hang Z. (2002) Purification and characterization of acetylcholinesterase from cotton aphid (*Aphis gossypii* Glover). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **51**:37-45
- Little E. J., McCaffery A. R., Walker C. H., Parker T. (1989) Evidence for enhanced metabolism of cypermethrin by a monooxygenase in pyrethroid-resistant strain of tobacco budworm (*Heliothis virescens* F.). *Pestic. Biochem. Physiol.* **34**:58-68

- May B., Leonard B. E., a Vadas R. L. (1977) Electrophoretic variation and sex linkage in spruce budworm. *J. Hered.* **68**:355–359
- Masly J. P., Presgraves D. C. (2007) High-resolution genome-wide dissection of the two rules of speciation in *Drosophila*. *PLoS Biol.* **5**:1890-1898
- Matsumura F. (1985) Toxicology of Insecticides, 2.vydání, Plenum Press, New York
- Miao X.-X., Xu S.-J., Li M.-H., Li M.-W., Huang J.-H. a kol. (2005) Simple sequence repeat-based consensus linkage map of *Bombyx mori*. *Proc. Natl. Acad. Soc. USA* **102**:16303–16308
- Mita K., Kasahara M., Sasaki S. a kol. (2004) The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Res.* **11**:27-35
- Mota-Sanchez D., Bills S. P., Whalon M.E. (2002) Arthropod resistance to pesticides: status and overview. V: Wheeler W. B. (ed.) Pesticides in Agriculture and the Environment, Marcel Dekker, Gainesville, FL, pp.241-272
- Murakami A., Imai H. T. (1974) Cytological evidence for holocentric chromosomes of silkworms, *Bombyx mori* and *B. mandarina*, (Bombycidae, Lepidoptera). *Chromosoma.* **47**:167-178
- Mutero A., Pralavorio M., Bride J. M., Fourier D. (1994) Resistance associated point mutations in insecticide insensitive acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:5922-5926
- Nanda I., Zend-Ajusch E., Shan Z., Grutzner F., Scharf M., Burt D. W., Koehler M., Fowler V.M., Goodwin G., Schneider W. J., Mizuno S., Dechant G., Haaf T., Schmid M. (2000) Conserved synteny between the chicken Z sex chromosome and human chromosome 9 includes the male regulatory gene DMRT1: a comparative (re)view on avian sex determination. *Cytogenet. Cell Genet.* **89**:67-78.
- Nath B. S. a Kumar R. P. S. (1999) Toxic impact of organophosphorus insecticides on acetylcholinesterase activity in the silkworm, *Bombyx mori* L.. *Ecotox. Environment. Safe.* **42**:157-162.
- Ni X. Y., Tomita T., Kasai S., Kono Y. (2003) cDNA and deduced protein sequence of acetylcholinesterase from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Plutellidae). *Appl. Entomol. Zool.* **38**:49-56
- Nguyen P. (2009) Studium syntenie chromosomu Z obaleče jablečného metodou BAC-FISH. Diplomová práce, v češtině, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Česká republika, pp.38
- Noppun V. T., Miyata T., Saito T. (1987) Insensitivity of acetylcholinesterase in phenothoate resistant diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: YoPONOMEUTIDAE). *Appl. Entomol. Zool.* **22**:116-118
- Radhakrishna P. G. a Delvi M. R. (1992) Effect of organophosphorus insecticides on food utilization in different races of *Bombyx mori* (Lepidoptera, Bombycidae). *Sericologia* **32**:71-79
- Raymond M., Heckel D. G., Scott J.G. (1989) Interactions between pesticide resistant genes: Model and experiment. *Genetics* **123**:543-551
- Pree D. J. , Whitty K. J., Van Driel, Walker G. W. (1998) Resistance to insecticides in Oriental fruit moth populations (*Grapholita molesta*) from Niagara Peninsula of Ontario. *Can. Entomol.* **130**:245-256
- Pringle E. G., Baxter S. W., Webster C. L., Papanicolaou A., Lee S. F., Jiggins C. D. (2007) Synteny and chromosome evolution in the Lepidoptera: Evidence from mapping in *Heliconius melpomene*. *Genetics* **177**:417-426

- Ren X. X., Han Z. J., Wang Y. C. (2002) Mechanisms of monocrotophos resistance in cotton bollworm, *Helicoverpa armigera* (Hübner). *Arch. Insect. Biochem. Physiol.* **51**:103-110
- Rice W. R. (1984) Sex chromosomes and the evolution of sexual dimorphism. *Evolution* **38**:735-742.
- Roe A. D., Weller S. J., Baixeras J., Brown J., Cummings M. P., Davis D. R., Kawahara A. Y., Parr C. S., Regier J. C., Rubinoff D., Simonsen T. J., Wahlberg N., Zwick A. (2010) Evolutionary framework for Lepidoptera model systems. V: Goldsmith M. R., Marec F. (eds.) *Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp.49-63
- Rosenberry T. L. (1975) Acetylcholinesterase. *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* **43**:103-218
- Sahara K., Marec F., Traut W. (1999) TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Res.* **7**:449-460
- Sahara K., Yoshido A., Marec F., Fukova I., Zhang H. B., Wu C. C., Goldsmith M. R., Yasukochi Y. (2007) Conserved synteny of genes between chromosome 15 of *Bombyx mori* and a chromosome of *Manduca sexta* shown by five-color BAC-FISH. *Genome* **50**:1061-1065
- Sauphanor B., Brosse V., Monier C., Bouvier J. C. (1998) Differential ovicidal and larvicidal resistance to benzoylureas in the codling moth, *Cydia pomonella*. *Entomol. Exp. Appl.* **88**:247-253
- Sauphanor B., Berling M., Toubon J.-F., Reyes M., Delnatte J., Allezmoz P. (2006) Corpocapse des pommes. Cas de résistance au virus de la granulose en vergers biologique. *Phytoma-La Défense des Végétaux*, **590**:24-27
- Seino A., Kazuma T., Tan A.J. a kol. (2007) Analysis of two acetylcholinesterase genes in *Bombyx mori*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **88**:92-101
- Shizuya H., Kouros-Mehr H. (2001) The development and application of the bacterial artificial chromosome cloning system. *Keio. J. Med.* **50**:26-30
- Smitsaert H. R. (1964) Cholinesterase inhibition in spider mites susceptible and resistant to organophosphate. *Science* **143**:407-409
- Smith L. C. (1955) DDT resistant codling moth: a report on the 1954-1955 control trials. *J. Dept. Agric. S. Aust.* **60**:185-187
- Shang J. Y., Shao Y.M., Lang G. J. a kol. (2007) Expression of two types of acetylcholinesterase gene from the silkworm, *Bombyx mori*, in insect cells. *Insect Sci.* **14**:443-449
- Sun C. N., Wu, T. K., Chen, J. S., Lee W. T. (1986) Insecticide resistance in diamondback moth. V: Diamondback Moth Management, Proc. 1st Int. Workshop. (N. S. Talekar a T. D. Griggs, eds), Asian Veg. Res. Dev. Cent., Shanhuah, Taiwan, pp.359-371.
- Sun C. N., Chui H., Feng H. T. (1978) Diamond moth resistance to diazion and methomyl in Taiwan, *J. Econ. Entomol.* **71**:551-554
- Suomalainen E. (1969) Chromosome evolution in the Lepidoptera. V: Darlington C. D., Lewis K. R. (eds.) *Chromosomes Today 2*. Oliver and Boyd, Edinburgh, pp.132-138.
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., (2007) MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**:1596-1599
- Traut W., Sahara K., Marec F. (2007) Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sex. Dev.* **1**:332-346
- Timm A. E., Geertsema H., Warnich L. (2006) Gene flow among *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidaw) geographic and host populations in Souht Africa. *J. Econ. Entomol.* **99**:341-348

- Voss G., Matsumura F. (1964) Resistance to organophosphorus compounds in the two-spotted spider mite: two different mechanisms of resistance. *Nature* **202**:319-320
- Weill M., Fort P., Berthomieu A., Dubois M. P., Pasteur N., Raymond M. (2002) A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. *Proc. R. Soc. Lond. B* **269**:2007-2016
- Williamson M. S., Martinez-Torres D., Hick C. A., Devonshire A. L. (1996) Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.* **252**:51-60
- Wilson A. G. L. (1974) Resistance of *Heliothis armigera* to insecticides in the Ord irrigation area, north western Australia. *J. Econ. Entomol.* **67**:256
- Whalon M. E., Mota-Sanchez D., Hollingworth R.M. (2008) Analysis of global pesticide resistance in arthropods. V: Whalon M. E., Mota-Sanchez D., Hollingworth R. M. (eds.) Global Pesticide Resistance in Arthropods. CABI Publishing, CAB International, Wallingford, pp.5–31
- Whalon, M. E., Mota-Sanchez, D., Hollingworth, R. M. (2008) Global Pesticide Resistance in Arthropods. CAB International, pp.381
- Xia Q. Y., Zhou Z. Y., Lu C. a kol. (2004) A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science* **306**:1937-1940
- Wolf K. W., Novak K., Marec F. (1997) Kinetic organization of metaphase I bivalents in spermatogenesis of Lepidoptera and Trichoptera species with small chromosome numbers. *Heredity* **79**:135-143
- Yasukochi Y. (1998) A dense genetic map of the silkworm, *Bombyx mori*, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers. *Genetics* **150**:1513-1525
- 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**:1319-1328
- Yasukochi Y., Tanaka-Okuyama M., Shibata F., Yoshido A., Marec F., a kol. (2009) Extensive conserved synteny of genes between the karyotypes of *Manduca sexta* and *Bombyx mori* revealed by BAC-FISH mapping. *PLoS ONE* **4**: e7465.
- Yoshido A., Bando H., Yasukochi Y., Sahara K. (2005) The *Bombyx mori* karyotype and the assignment of linkage groups. *Genetics* **170**:675-685
- Yoshido A., Yasukochi Y., Marec F., Abe H., Sahara K. (2007) FISH analysis of the W chromosome in *Bombyx mori* and several other species of Lepidoptera by means of *B.mori* W-BAC probes. *J. Insect Biotechnol. Sericol.* **76**:1-7
- Yoshido A., Sahara K., Marec F., Matsuda Y. (2010) Step-by-step evolution of neo-sex chromosomes in geographical populations of wild silkmoths, *Samia cynthia* ssp.. *Heredity*, DOI: 10.1038/hdy.2010.94
- Zraket C. A. (1990) Genetic linkage mapping using restriction fragment length polymorphisms in tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Master's thesis]. Clemson, South Carolina: Clemson University