

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA JIHOČESKÉ
UNIVERZITY**
České Budějovice

Katedra genetiky

**Využití genu *Notch* pro produkci
genetických „sexing“ linií obaleče
jablečného**

Bakalářská práce

Hana Švellerová

Vedoucí práce: **RNDr. Radmila Čapková Frydrychová, Ph.D.**

Rok vypracování: **2013**

Švellerová, H., 2013: Využití genu *Notch* pro produkci genetických „sexing“ linií obaleče jablečného. [Use of *Notch* gene for the production of genetic „sexing“ lines of codling moth. Bc. Thesis, in Czech] – 34 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

The codling moth, *Cydia pomonella*, is the key pest of pome fruit and walnut orchards in the temperate regions of the world. The extensive use of insecticides for a control of this pest has resulted in the development of resistance to these chemicals, and there is an increasing demand on the use of environment-friendly control tactics, such as the Sterile Insect Technique (SIT). Codling moth SIT relies on the mass rearing and release of genetically sterile both males and females into a wild population. However, male-only releases could significantly reduce costs of the mass rearing and increase SIT efficiency. In this thesis I focused on the use of a temperature-sensitive mutant allele of the *Notch* gene for production of genetic „sexing“ lines of codling moth.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě 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 13. prosince 2013

.....

Hana Švellerová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce Radmile Čapkové Frydrychové za její rady, trpělivost a odborné vedení. Děkuji i celému obsazení laborky a Františku Marecovi za jejich pomoc a vstřícnost. Obzvláště bych chtěla poděkovat Michale Korandové, bez jejíž pomoci, ochoty a trpělivosti bych se nedostala nikam. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině a příteli, že mě během celého studia podporovali.

Obsah

1	Úvod.....	1
1.1	Obaleč jablečný (<i>Cydia pomonella</i>)	1
1.2	Metoda SIT.....	2
1.2.1	Metoda SIT a obaleč jablečný	3
1.3	Signální dráha Notch.....	4
1.3.1	Různé formy Notch.....	5
2	Cíle práce.....	8
3	Materiál a metody	9
3.1	Pokusné organismy	9
3.2	Příprava transgenních konstruktů	9
3.3	Injikační směsi.....	11
3.4	Injikace obaleče jablečného.....	12
3.5	Gene switch GAL4-UAS systém.....	12
3.6	Příprava transgenních linií drozofily	14
3.7	Indukce GAL4-UAS	15
3.8	Příprava preparátů pro metodu FISH.....	15
3.9	Fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (FISH)	15
4	Výsledky	17
4.1	Optimalizace injikace obaleče jablečného	17
4.2	Příprava transgenních kmenů drozofily a mapování pozice transgenů	21
4.3	Optimalizace teplotního působení pro nastolení letality u drozofily	22
5	Diskuze.....	26
5.1	Injikace <i>C. pomonella</i>	26
5.2	Optimalizace teplotního působení pro nastolení letality u drozofily	27
6	Závěr	30
7	Použitá literatura.....	31

1 Úvod

Po staletí soupeří člověk se škůdci, kteří napadají jeho zásoby potravy, bohatství i člověka samotného. Mezi ně patří stovky, možná tisíce druhů napříč celou rostlinnou i živočišnou říší, ať se jedná o plevely, viry, bakterie nebo hmyz, ptáky či hlodavce. Člověk s nimi svádí boj, který v mnoha případech není ani v nejmenším úspěšný díky neuvěřitelné přizpůsobivosti daných škůdců. Největší problémy, vyjma lidského zdraví, způsobují v zemědělství po celém světě. Moje práce se zabývá obalečem jablečným, který je nejzávažnějším škůdcem napadajícím ovocné stromy, především jabloně a hrušně.

1.1 Obaleč jablečný (*Cydia pomonella*)

Obaleč jablečný (*Cydia pomonella*) patří do čeledi *Lepidoptera*. Dospělý jedinec obaleče je asi 1 cm dlouhý, přední křídla má popelavě hnědá s charakteristickými tmavými obrazci, zadní křídla jsou šedohnědá. Toto zbarvení mu zajišťuje splnutí s kůrou stromů. Motýli jsou nejvíce aktivní okolo soumraku, kdy noční teploty přesahují 12 °C. Po oplození samičky kladou 30-70 vajíček na plochy listů nebo na plody. Vajíčko je asi 1 mm velké, zpočátku je průhledné, později se však zbarví do běla. Těsně před líhnutím je na vajíčku vidět černá tečka, hlava larvy. Rychlost vývoje opět závisí na teplotě okolního prostředí, pohybuje se mezi 6-20 dny. Poté se z vajíčka vylíhne larva, která je bílá s černou hlavou. S jejím růstem se mění i její barva, a to z bílého těla na růžové s hnědou hlavou. Právě housenky způsobují hospodářské škody, zavrtávají se totiž do plodů, kde se dostávají až do jádřince a tam se živí vyvíjecími se semeny. Zavrtaná v plodu projde housenka pěti instary během 3-5 týdnů. Po dokončení vývoje larva opouští plod a hledá místo, kde se může bezpečně zakuklit. Pokud je vhodná teplota, z kukly se vylíhne další dospělý jedinec již během stejné sezóny, obvykle bývají dvě generace za rok, ale záleží na teplotě, je možné i pět generací ročně. Pokud není příznivá teplota, kukla přezimuje pod listím nebo kůrou stromu. Na začátku jara, když se zvýší teplota se zhruba za 7-30 dní, záleží na okolní teplotě, se vylíhne dospělý jedinec. Napadené plody se snadno poznají díky exkrementům, které obaleč zanechává v chodbičkách a které jsou dobře viditelné (Novák & Severa 1990; Alston et al. 2010). Pro ochranu zemědělských plodin a potlačení populace obaleče jablečného se především používají zejména širokospektrální insekticidy (např. organofosfáty), ale také feromonové lapače, protože obaleči využívají feromony pro komunikaci při páření (Witzgall et al. 2008) nebo různé látky na bázích hormonů způsobujících nevyvinutí jedince a podobně. Avšak, kvůli častému a mnohdy přehnanému používání stejných insekticidních chemických

látek dochází k jejich snížené účinnosti vedoucí až k rezistenci daného hmyzu na danou chemikálii (Varela et al. 1993). Chemické látky používané pro boj se zemědělskými škůdci se hromadí v přírodě, tím ovlivňují životní prostředí a v neposlední řadě vzbuzují strach o lidské zdraví po požití chemicky ošetřených potravin. Proto je snaha o vývoj nových technologií, které by měly obaleči zabránit v ničení zemědělských plodin, a to bez negativních dopadů na životní prostředí či lidské zdraví. Jednou z těchto metod je metoda SIT.

1.2 Metoda SIT

SIT, neboli „sterile insect technique“, je metoda využívaná k biologické kontrole hmyzu ve volné přírodě. Jedná se o vypouštění sterilních jedinců, ať jednoho nebo obou pohlaví, do volné přírody, kde se kříží s divokými jedinci bez možnosti vytvoření potomstva. Sterilita je způsobena buď neschopností klást vajíčka, netvořením spermií nebo jejich nefunkčností, neschopností se pářit nebo dominantně letální mutací v pohlavních buňkách samce či samice (Klassen 2005). Tato metoda se začala vyvíjet už ve 30.- 40. letech 20. století díky A. S. Serebrovskému, F. L. Vanderplankovi a E. F. Kniplingovi, kteří pracovali nezávisle na sobě (Klassen & Curtis 2005). Byl to právě Knipling, který navrhl použít sterilizaci ke kontrole nebo vymýcení škůdců po pozorování samečků mouchy *Callitroga hominivorax*, kteří se páří opakovaně, na rozdíl od samic, které se páří pouze jednou za život. Tato skutečnost ho přivedla k hypotéze, kdy by obrovské množství sterilních samečků opakovaně vypuštěných do volné přírody a opakovaně se pářících s volně žijícími samicemi, vedlo k postupnému snižování populace a mohlo by vést až k úplnému vymýcení daného škůdce (Knipling 1972).

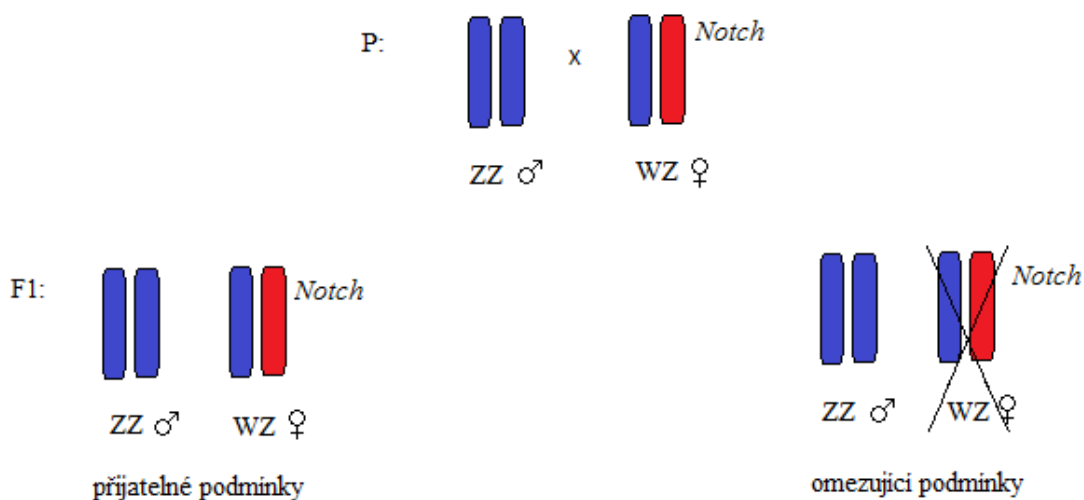
Mezi prvními organismy, na kterých se metoda SIT využila, byla už zmíněná moucha *C. hominivorax*, která klade vajíčka do ran teplomilných živočichů a její larvy poté parazitují jak na živočiších, tak na lidech, a u které došlo k úplnému vymýcení v místě použití. Metoda SIT se velice rychle rozšířila po celém světě. Například byla použita pro zastavení invaze mouchy *Ceratitis capitata*, která napadá ovocné stromy, ve střední Americe (Hendrichs et al. 1983) a její vymýcení na Bermudách (Hilburn & Dow 1990), pro vymýcení mouchy *Bactrocera cucurbitae* v Japonsku (Kakinohana et al. 1993), způsobující škody na melounech, okurkách a rajčatech nebo k vymýcení mouchy tse-tse *Glossina austeni* v Zanzibaru (Vreysen et al. 2000). Na obalečích byla použita poprvé v letech 1976-1978 (Proverbs et al. 1982), kde měla kladný výsledek a následovala regulace škůdce v Britské Kolumbii v Kanadě (Bloem et al. 2007).

SIT je metoda geneticky založené biologické kontroly, která má mnoho výhod, mezi které například patří to, že ovlivňuje pouze organismy, které ovlivnit chceme nebo že ji můžeme kombinovat s jinými metodami biologické kontroly, například parazitoidy (Botto & Glaz 2010). Ovšem druhou stranou mince je nutnost dokonale znát daný organismus nebo možnost chovat jej ve velkém množství, což zahrnuje dlouhodobé investice a vedení (Vreysen et al. 2006).

1.2.1 Metoda SIT a obaleč jablečný

Obaleč jablečný je jeden z živočichů, na kterých byla využita metoda SIT (Knipple 2013). Výrazný posun v této problematice byl zapříčiněn genetickým výzkumem tohoto druhu. Díky tomu bylo zjištěno, že *C. pomonella* má pohlavní chromozomy WZ, přičemž samice má sestavu WZ a samec ZZ. Chromozom Z patří mezi tzv. neo-pohlavní chromozomy, který vznikl u společného předka pro téměř 700 škůdců fúzí původního chromozomu Z a odpovídajícího chromozomu 15 v referenčním genomu bource morušového (Nguyen et al. 2013). Díky této fúzi došlo i k vazbě dvou genů pro resistenci k insekticidům a tím se výrazně zlepšilo fitness, zvýšila se přizpůsobivost a následné rozšíření obalečů po celém světě. Navíc se mezi sebou chromozomy W a Z znatelně liší, což činí z obaleče jablečného skvělého kandidáta pro vytvoření pohlavně oddělitelných linií na základě pohlavních chromozomů (Fuková et al. 2009). Pro vypouštění sterilních jedinců jsou ideální pouze samečci (Rendón et al. 2004), protože ti mohou v divoké populaci šířit dominantně letální mutaci. Vypouštěním obou pohlaví najednou rovněž hrozí preferenční páření mezi vypuštěnými jedinci, což vede ke snížení efektivity SIT. Současnou praxí je nicméně vypouštění obou pohlaví, a to z toho důvodu, že dosud chybí jednoduchý způsob jejich separace v masovém měřítku. Jednou z možností separace pohlaví je eliminace samic s využitím podmíněně letálních mutací, vedoucích k chladové letalitě. Studie na drozofily ukázaly, že k navození chladové letality lze využít mutaci genu *Notch*, označovanou jako N^{60g11} . (Fryxell & Miller 1995), která způsobuje dominantně chladově podmíněnou letalitu u heterozygotních embryí. Gen *Notch* je vysoce konzervativní u členovců i obratlovců a lze tedy předpokládat, že daná mutace může obdobným způsobem působit i u jiných druhů hmyzu než jen u drozofily. Přítomnost transgenního konstruktů s mutací *Notch* (Obr. 1) na samičím chromosomu W by vedla k chladové letalitě, a to pouze u samic (Marec et al. 2005). Přesněji za standardních teplotních podmínek, tj. teploty okolo 25°C by se líhla obě pohlaví a samičí letalita by nastávala pouze při snížené teplotě. Důležitým aspektem rovněž je, že transgenní jsou pouze samice, naopak samci, určení k ozáření a k vypouštění do divoké populace, nenesou žádnou

mutaci a tím také nehrozí žádné riziko z vypouštění transgenních organismů do volné přírody.

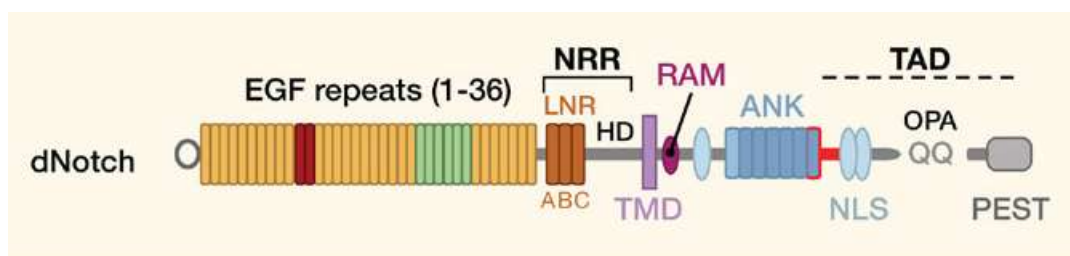


Obr. 1: Schéma možného využití genu *Notch*, jakožto dominantně podmíněné letální mutace, při separaci pohlaví obaleče jablečného. Samice (WZ) nesou na chromozomu W mutantní alelu genu *Notch*, která za omezujících podmínek (snížená teplota) způsobí letalitu samic a tím vznikne pouze samčí potomstvo (ZZ), které je připraveno k ozáření (upraveno podle Marec et al. 2005).

1.3 Signální dráha Notch

V mnohobuněčných organismech dochází mezi buňkami ke komunikaci, která je nezbytná pro evoluci, vývoj i pro bezchybný chod organismu. Vývoj zahrnuje komplexní síť signálů z okolí a následných odpovědí a k tomuto šíření informací se využívá signálních drah. U metazoi stačí na celý vývoj daného jedince méně než 20 signálních drah, přičemž pouze sedm z těchto drah se účastní vývoje organismu. Jsou to dráhy Hedgehog, Wnt, TGF- β , RTK, JAK/STAT, NHR a Notch (Gazave et al. 2009; Pires-daSilva & Sommer 2003). Tyto dráhy mají zásadní vliv jak na ustanovení polaritý embrya a tělních os, určování jednotlivých částí embrya, tak jsou klíčové pro buněčnou proliferaci, diferenciaci, apoptózu, homeostázi dospělých tkání a mnoho dalších. Signální dráha Notch zajišťuje diferenciaci v embryu i homeostázi v dospělci. Podílí se na vývoji a funkci neuronů, kostní dřeni, vývoji srdce, T-buněk, kontroluje jak proliferaci, diferenciaci, tak i apoptózu (Gazave et al. 2009). Je aktivována nasednutím transmembránového ligandu Delta nebo Jagged/Serrate z okolních buněk na Notch receptor. Ten je jednosměrným transmembránovým proteinem tvořeným dvěma částmi, extracelulární, na kterou nasedá daný ligand, a intracelulární část, která se

posléze oddělí a pomocí intracelulárních proteinů je transportována do jádra, kde se podílí na transkripční regulaci cílových genů (Gordon et al. 2008). Extracelulární doména (NECD) obsahuje 36 tandemových repeticií EGF (epidermal growth factor), z nichž některé zprostředkovávají vazbu s ligandem. Dále následují NRR regiony (negative regulatory region), které mají hlavní roli při kontrole receptoru, aby nedošlo k jeho aktivaci bez navázání ligandu. Extracelulární doména končí C-koncem, který obsahuje Arg/Lys zbytky. Intracelulární část (NICD) je složena z RAM domény (RBPjk association module), dále následuje ANK doména (ankyrin domain), která je nejkonzervativnější částí Notch a má nezbytný podíl na správné funkci receptoru. Koncovým dílem intracelulární části je PEST (proline/glutamic acid/serine/threonine-rich motifs), který obsahuje degradační signály, které zajišťují stabilitu NICD (Kopan & Ilagan 2009) (Obr. 2). Tento systém pracuje na principu laterální inhibice, což znamená, že sousedící buňky mající stejnou funkci se vzájemně ovlivňují. Nejschopnější buňka produkuje nejvíce ligandů, které zaplní membránové receptory na ostatních buňkách, a tím je může omezovat a ovlivňovat, čímž vlastně řídí osud daných buněk (Wesley & Saez 2000).



Obr. 2: Organizace Notch receptoru u drozofily (Kopan and Ilagen 2009).

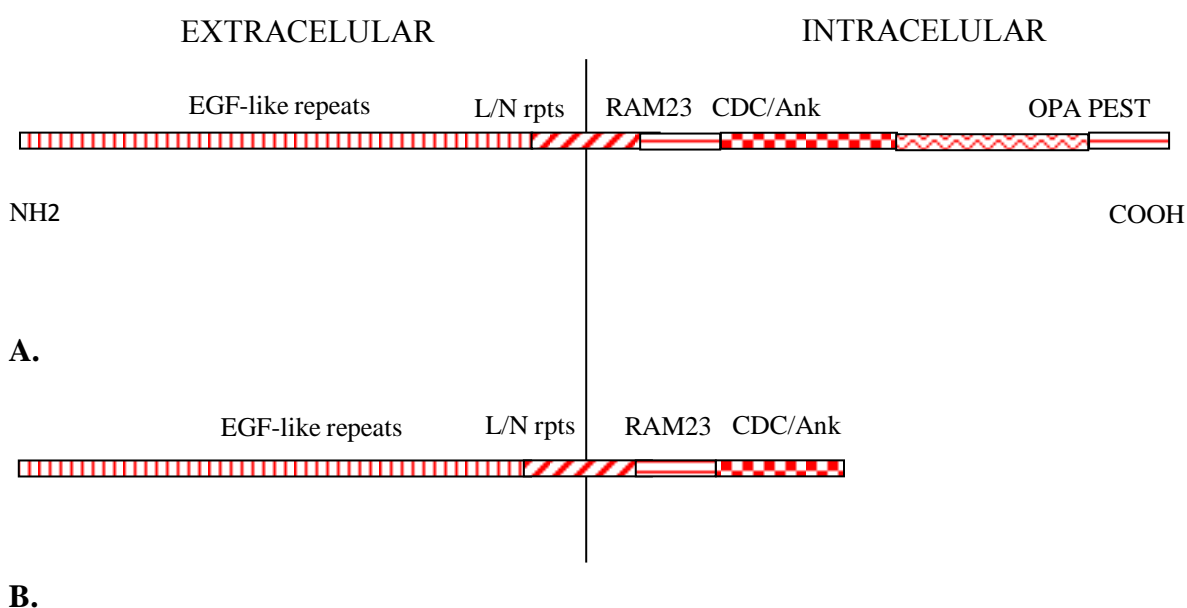
1.3.1 Různé formy Notch

Během embryogeneze má Notch vliv na produkci nervových a epidermálních prekurzorových buněk. Po navázání Delta ligandu na extracelulární doménu Notch je NICD transportována do jádra pomocí intracelulárního proteinu SuH (Suppressor of Hairless), který nasedá na RAM 23 a ankyrinovou doménu, se buňka vyvíjí jako epidermální a dominantní formou Notch exprimovanou v buňkách je jeho plná forma, tzv. NFull (Obr. 3).

Buňky, které nemají navázané ligandy na receptorech nebo dokáží tento proces zvrátit, se vyvíjejí jako nervové a dochází u nich k tvorbě zkrácené formy, tzv. NΔCterm (Obr. 3), kterému chybí koncová část obsahující PEST doménu. NΔCterm se váže na SuH a ten poté

není k dispozici pro vazbu s NFull, který je bez navázaného proteinu SuH rychle degradován (Wesley & Saez 2000).

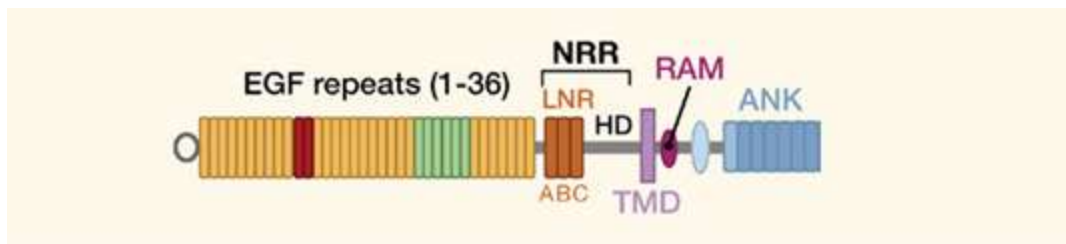
Tento systém pracuje na principu laterální inhibice, což znamená, že sousedící buňky mající stejnou funkci se vzájemně ovlivňují. Nejschopnější buňka produkuje nejvíce ligandů, které zaplní membránové receptory na ostatních buňkách, a tím je může omezovat a ovlivňovat, čímž vlastně řídí osud daných buněk. Epidermální buňky, které jsou schopny akumulovat protein SuH, mají stabilnější signalizaci Notch naproti buňkám nervovým, které mají nedostatek proteinu SuH a signalizace u nich nakonec úplně vymizí (Wesley & Mok 2003).



Obr. 3: **A.** Forma NFull exprimovaná v epidermálních buňkách. **B.** Forma NΔCterm exprimovaná v nervových buňkách.

Bylo dokázáno, že poměr NFull a NΔCterm je závislý na teplotě, kdy s rostoucí teplotou roste hladina NΔCterm a klesá hodnota NFull. Notch signalizace je tedy závislá nejen na poměru NFull a NΔCterm, ale i na teplotě, která tento poměr ovlivňuje (Wesley & Mok 2003). Přežití jedince je podmíněno správným množstvím kopií NFull a NΔCterm, a protože je tento poměr ovlivňován teplotou, teplota pro přežití mouchy s uměle vytvořeným konstruktem obsahujícím NΔCterm se bude měnit v závislosti na síle použitého promotoru. Právě pro tuto vlastnost se využívá gen *Notch* při chladové terapii. Chladová letalita prostřednictvím genu *Notch* byla pozorována u drozofily s využitím alely N^{60g11} . N^{60g11} je dominantní alelou genu *Notch*, vzniklá delecí v intracelulární části PEST a způsobující tak

posun čtecího rámce (Obr. 4) (Lyman & Young 1993) a chladově podmíněnou letalitu. Heterozygotní embrya s alelou N^{60g11} hynou při teplotě pod 20°C (Fryxell & Miller 1995).



Obr. 4: Mutantní alela N^{60g11} (Kopan and Ilagan 2009, upraveno dle Lyman and Young 1993).

2 Cíle práce

Obaleč jablečný je celosvětovým problémem a mnoho laboratoří ve světě se snaží přijít na způsob, jak jej vymýtit nebo alespoň snížit jeho populaci. Má práce je zaměřená na vývoj metody SIT, která využívá zkrácenou formu proteinu Notch, u níž předpokládáme, že její inzercí do genomu obaleče jablečného nastává teplotně podmíněná letalita využitelná při metodě SIT.

Konkrétními cíly je determinovat podmínky teplotního působení pro nastolení letálního účinku, a to pomocí GAL4-UAS drozofilího systému, dále optimalizovat transformační experimenty s využitím konstruktů $3 \times P3$ -Tom na *C. pomonella* a transformace konstruktem $3 \times P3$ -ANK-Tom.

3 Materiál a metody

3.1 Pokusné organismy

Drosophila melanogaester

Při mé práci byly použity dvě linie, jedna nesoucí transgen obsahující GAL4 s progesteronovým receptorem (*yw; ACT-GAL4:PR/TM3,Tb*) a druhá s integrovaným konstruktem *RATom* (*yw; UAS-RATom*). Obě linie byly chovány ve stejných podmínkách při 25°C nebo 18°C na standardním kukuřično-melasovém médiu (163 g kukuřičného šrotu, 16 g agaru, 33 g sušených kvasnic, 200 ml melasy, 2,6 l vody) s desinfekčním roztokem (12 g kyseliny benzoové, 2,5 g kyseliny sorbové, 240 ml denaturovaného etylalkoholu). Jako kontrolní linie byl použit běžně používaný kmen *yw; Sb/TM6* a rovněž kmen *yw; 11-5* nesoucí inzerci transgenu *white* (*w*) ve 2L telomeře (Capkova Frydrychova et al. 2007).

Cydia pomonella

K injikování byla využívána vajíčka jedinců kmenu Krym-61, který je chován v insektáriu ve stálé teplotě 25°C při fotoperiodě 16 hodin světlo a 8 hodin tma na speciálním médiu pro obaleče (800 g pšeničných klíčků, 125 g ječných klíčků, 125 g pivovarských kvasnic, 100 g agaru, 5,6 l vody) s desinfekčním roztokem (25 g kyseliny askorbové, 25 g kyseliny citronové, 8,5 g methylparabenu, 0,35 g B-komplexu, 7 g kyseliny sorbové a 30 ml 37% formaldehydu). Detailnější podrobnosti o původu kmenu jsou v publikaci Fuková et al. (2005).

3.2 Příprava transgenních konstruktů

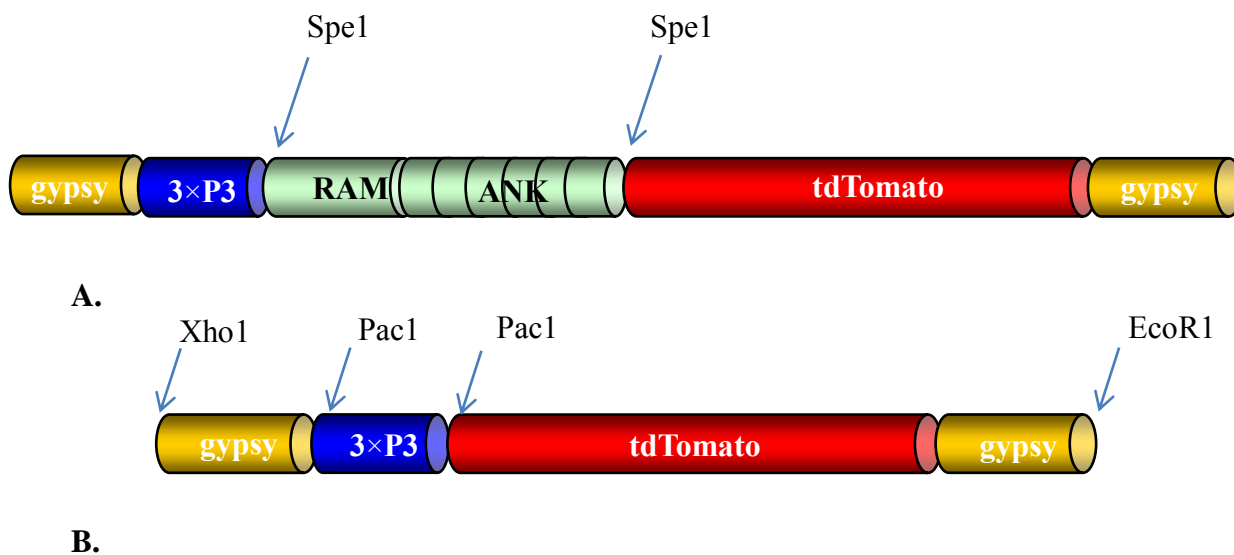
Konstrukt *RATom* byl vytvořen v rámci diplomové práce (Kůta 2011). Pro získání sekvence genu *Notch* obaleče jablečného byly použity degenerované primery pro gen *Notch* bource morušového, navrhování primerů probíhalo pomocí srovnání konzervativních úseků daného genu mezi drozofilou a bourcem. Sekvence byla získána pomocí metody PCR a následným sekvenováním.

Do konstruktů *RATom* byla zařazena ankyrinová doména, u níž se právě předpokládalo, že je pro nastolení chladové sensitivity zásadní, rovněž byla zahrnuta i RAM doména a transmembránová doména, a to ke zvýšení afinity receptoru. Konstrukt byl nesený transposabilním elementem *piggyBac* označeným jako *pXL BacII*, jako reportérový gen byl použit *td Tomato* (Clontech). Konstrukt byl ohraničen insulátory *gypsy*, které potlačí

případný poziční efekt po integraci do genomu. Jako promotor byl využit 3×P3, který směřuje expresi do očí a CNS (Thomas et al. 2002).

Pro optimalizaci injikace vajíček obaleče jablečného byl využit konstrukt *Tom*, tzn. konstrukt identický konstruktu *RATom*, akorát bez ankyrinové, RAM a transmembránové domény, které byly z konstruktu *RATom* vyštěpeny (Obr. 5). Vyštěpení uvedených částí z konstruktu *RATom* bylo provedeno pomocí restričního enzymu *SpeI*. Po elektroforetické separaci a excizi daného fragmentu z gelu (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel, katalogové číslo 740609.50) byl konstrukt re-cirkularizován pomocí T4 DNA ligázy (New England BioLabs®), na 10 µl reakci bylo potřeba 400 U T4 DNA ligázy, 50 ng plazmidu a 50 ng inzertu. Ligace byla prováděna při 4°C přes noc. Poté byla provedena transformace do kompetentních buněk (buňky DH5α, kmen *E. Coli*) pomocí teplotního šoku. Ligační směs (10 µl) byla přidána k 50 µl kompetentních buněk (kmen DH5α) a inkubována na ledu po dobu 30 minut. Teplotní šok byl proveden zahřátím na 42°C po dobu 30 s a opětovným přemístěním na led, na 2 minuty. Po přidání 250 µl přehřátého SOC média a inkubace v 37°C za konstantního třepání (225 otáček/min) po dobu 1 hodiny byla transformační směs aplikována na kultivační Petriho misku s LB/Amp/X-gal/IPTG a ponechána inkubovat přes noc ve 37°C. Identifikace pozitivních kolonií byla provedena pomocí PCR s primery pro ankyrinovou doménu (primer 1667F, sekvence 5'-ATGGGACCACGCCGTTGATATT-3' a primer N6352R, sekvence 5'-GGCAGACGGTCCATGTGGTC-3') a pro fluorescenční protein Tomato (primer *Ratom2785*, sekvence 5'-AGGACAACAACATGGCCGTCA-3' a primer *Ratom3027R*, sekvence 5'-GGGGAAGGACAGCTTCTTGTA-3'). Reakční směs byla složena z 10×DreamTaq Buffer, 10 mM dNTP, 0,4 µM primerů, 8 U DreamTaq a doplněná vodou, reakční profil byl 95°C, 3 min – (95°C, 30 s – 63°C, 30 s – 72°C, 3 min)_{30x}, 72°C, 7 min.

Pro izolaci plazmidové DNA byl využit komerční kit PureLink® HiPure Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen, katalogové číslo K2100-03), postupovalo se dle návodu doporučeného výrobcem. Správnost konstruktu byla ověřena restričním štěpením pomocí enzymů *EcoRI*, *XhoI* a *PacI* (New England BioLabs®).



Obr. 5: **A.** Konstrukt RATom **B.** Konstrukt bez ankyrinové domény.

3.3 Injikační směsi

K injikaci obaleče jablečného bylo využito několika různých injikačních směsí jak s konstruktem *Tom* (Tab. 1), tak s konstruktem *RATom* (Tab. 2), konstrukty byly injikovány společně s helperem pHspBac, který nese gen pro transpozázu umožňující inzerci vektoru *piggyBac* do genomu.

Tab. 1: Složení injikačních směsí s konstruktem *Tom*.

Injikační směs	Vektor ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Helper ($\text{ng}/\mu\text{l}$)	Na_3PO_4 (mM)	KCl (mM)
směs 1	1,1	0,5	0,1	5
směs 2	1,65	0,5	0,1	5
směs 3	2,2	0,5	0,1	5
směs 4	10	6	0,1	5

Tab. 2: Složení injikačních směsí s konstruktem *RATom*.

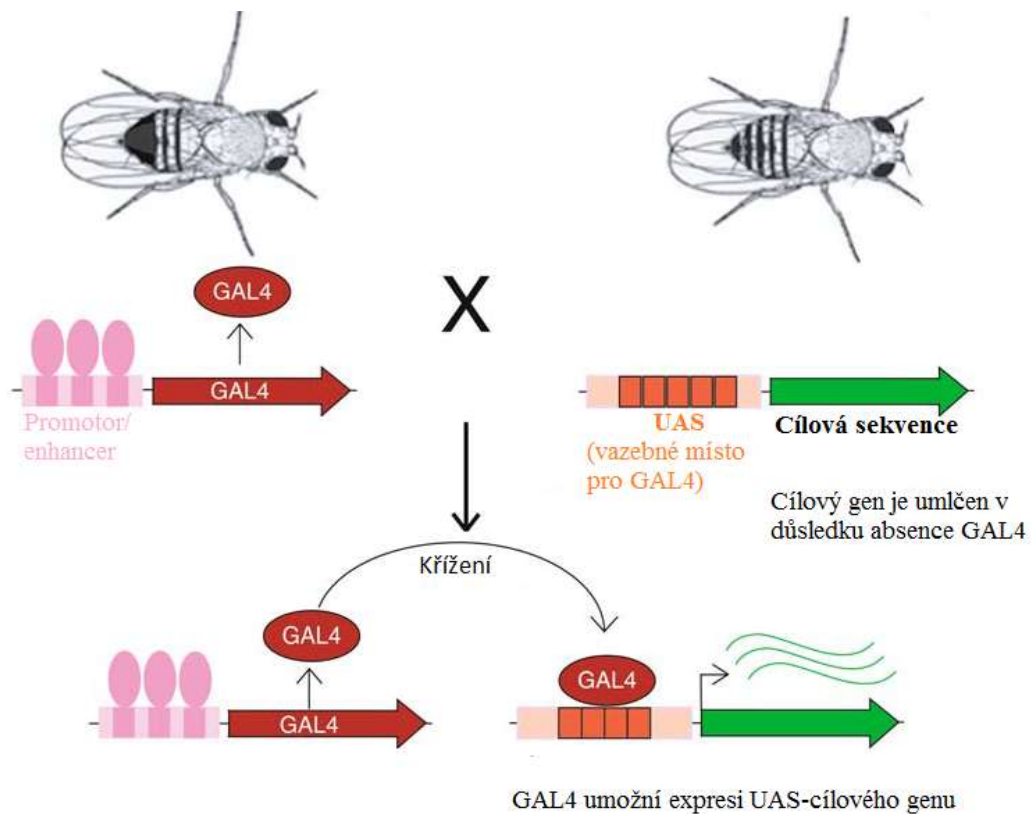
Injikační směs	Vektor ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Helper ($\text{ng}/\mu\text{l}$)	Na_3PO_4 (mM)	KCl (mM)
směs 5	10	0,7	0,1	5
směs 6	1	0,5	0,1	5
směs 7	10	5	0,1	5
směs 8	0,5	0,25	0,1	5

3.4 Injikace obaleče jablečného

Čerstvě vylíhlí jedinci obaleče jablečného byli necháni se spářit v plastové krabici, která byla umístěna v inkubátoru s 25°C, se světelnou periodou 8 hodin světlo a 16 hodin tma, kdy v 6 hodin ráno se světlo vypínalo. 1-2 hodiny po setmění byla vybírána vajíčka a injikace probíhala neprodleně poté. K injikaci byly použity buď komerční jehly (Eppendorf, katalogové číslo 930000043) nebo mnou vytažené ze skleněných kapilár. Pro vytahování jehel byl využit přístroj Narishige PC-10 Puller a vytahování probíhalo při teplotě cca 60°C s použitím všech závaží. Injikační roztok byl do jehel natahován pomocí špiček Eppendorf, katalogové číslo 930001007. K injikaci byl použit mikroskop Olympus SZX12 a mikroinjikátor Eppendorf FemtoJet express. Po injikaci byla vajíčka přenesena na médium a nechána v insektáriu při 25°C. V rámci jednotlivých pokusů bylo průměrně injikováno 25-150 vajíček, přičemž bylo provedeno 35 pokusů s konstruktem *Tom* a 17 pokusů s konstruktem *RATom*.

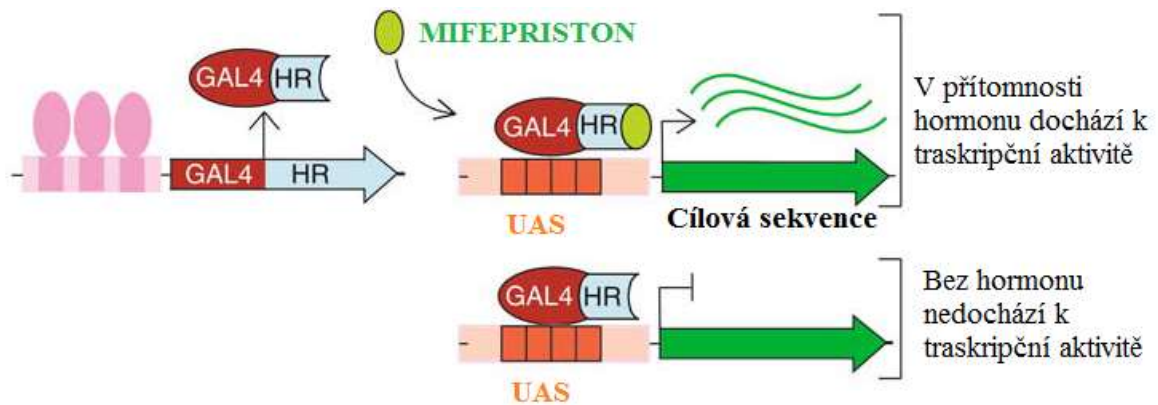
3.5 Gene switch GAL4-UAS systém

GAL4-UAS je expresní systém, který je hojně využíván k cílené expresi transgenů, a to nejen u drozofily. Systém je tvořen ze dvou částí – z genu *GAL4* a sekvence UAS (Upstream activation sequence). Gen *GAL4* kóduje kvasinkový transkripčně aktivátorový protein GAL4, který se specificky naváže k enhancerové sekvenci UAS a tím aktivuje transkripci genu ležícího právě za UAS (Duffy 2002) (Obr. 6). Exprese GAL4 je kontrolována vhodně zvoleným promotorem. Taktéž před cílovým genem je potřeba promotor, například TATA box (Tsai et al. 1998).



Obr. 6: Znárodnění systému GAL4-UAS (Elliott and Brand 2008).

GAL4-UAS, který je velice flexibilním systémem a využívaným po celém světě, má mnoho forem. K lepší ovladatelnosti GAL4-UAS systému byla, mimo jiné, využita kontrola pomocí ligandu, nasedajícího na specifický receptor, kterou využívá GeneSwitch GAL4-UAS systém (Osterwalder et al. 2001), a který jsem využila ke svým experimentům. Základní princip je stejný jako u základní formy GAL4-UAS systému, tzn. v jedné transgenní linii much je zabudovaný *GAL4* s promotorem, v druhé linii je UAS s daným cílovým genem. U této modifikace ovšem gen *GAL4* nese navíc také progesteronový receptor. Bez přidání daného ligandu nedochází k aktivaci *GAL4* a tedy ani k transkripční aktivitě (Obr. 7) (Elliott & Brand 2008). Jako ligand nasedající na receptor se využívá hormon mifepriston, známý také jako RU486 (Tsai et al. 1998; Emelyanov & Parinov 2008; Osterwalder et al. 2001; Elliott & Brand 2008; Roman et al. 2001). Mifepriston je syntetický steroidní hormon, který je antagonistou progesteronu. K progesteronovému receptoru má dokonce pětkrát vyšší afinitu než progesteron. Mimo jiné je v lékařství využíván jako „potratová pilulka“, protože kvůli chybějící aktivitě progesteronu v těhotenství způsobuje smrt a odloučení embrya (Dobáková 2013).



Obr. 7: Znárodnění systému GAL4-UAS závislého na přidání ligandu (v tomto případě hormonu mifepriston) (Elliott & Brand 2008).

3.6 Příprava transgenních linií drozofily

Konstrukt *RATom* byl integrován do vektoru *pUAST* nesoucí sekvenci UAS. Celý tento konstrukt byl do drozofily injikován firmou Rainbow Transgenic, Inc. (USA), přičemž pro injikace byla použita linie *yw*. Transformanty jsem selektovala na základě exprese reportérového genu *w*. Celkem bylo získáno 7 linií transgenních much.

Transgenní linie *RATom* byly kříženy s liniemi nesoucími gen *GAL4*, který je nutný pro aktivaci UAS. Schéma křížení je uvedeno na Obr. 8.

$$yw; \frac{UAS-RATom}{UAS-RATom} \quad \times \quad yw; \frac{Act-Gal4:PR}{TM6, Tb}$$

$$F1: \quad yw; \frac{UAS-RATom}{Act-Gal4:PR}$$

$$yw; \frac{UAS-RATom}{TM6, Tb}$$

Obr. 8: Schéma křížení linie nesoucí konstrukt *RATom* s linií nesoucí gen *GAL4* s progesteronovým receptorem. Křížením vznikají jedinci, kteří nesou jak *RATom*, tak *GAL4*, a kteří jsou rozpoznatelní jako *Tb*⁺. Po přidání určité koncentrace hormonu do média dochází u těchto jedinců k expresi *RATom*, a tím k následné letalitě. Dále vznikají jedinci s konstruktem *RATom* a s balancerovým chromosomem *TM6* nesoucí marker *Tb*. Přidání hormonu u těchto jedinců by na jejich životaschopnost nemělo mít vliv.

3.7 Indukce GAL4-UAS

Jako spouštěč systému GAL4-UAS byl využit mifepriston (Sigma-Aldrich, katalogové číslo 84371). Jako zásobní roztok byla použita koncentrace 10 µg/µl (10 mg RU468 v 1 ml 96% etanolu). Ze zásobního roztoku byly ředěním v etanolu připraveny testované koncentrace v rozpětí od 10⁻¹⁷ ng/µl po 200 ng/µl. Na připravené médium ve vialce bylo rozlito 100 µl mifepristonu o testované koncentraci a ponecháno přes noc v lednici, aby se dostatečně vsákl do potravy. Obvykle bylo kříženo 2-5 virginálních samic s 4-10 samečků. Při pokusech v rozdílných teplotách byly kříženy stejné linie ve stejném čase, aby se případné rozdíly mohly porovnat. Kontrolní křížení probíhala na stejném médiu bez přidání hormonu.

V případě pokusu s larvami bylo 100 µl RU468 nanášeno na Petriho misku s agarem (500 ml jablečného džusu se 7,5 g agaru), rozetřeno pomocí očkovací hokejky a opět ponecháno v lednici vyschnout.

3.8 Příprava preparátů pro metodu FISH

Z larvy drozofily byly ve fyziologickém roztoku vypitvány slinné žlázy, které byly na 45 s přeneseny do 45% kyseliny octové. Poté byly žlázy dány na podložní sklíčko do kapky roztoku kyseliny mléčné, vody a kyseliny octové v poměru 1:2:3 na 5 minut. Následně byla tkáň přikryta krycím sklíčkem a byla provedena roztlaková metoda.

3.9 Fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH)

K mému pokusu byla využita směs dvou fluorescenčně značených sond nasedajících na specifický úsek genu *w*, který je přítomen v konstruktu pUAST jako reportérový gen. Sonda *w*¹ byla získána pomocí PCR s primery *w*6248F, sekvence 5'-CGAGCTTCACTCAAC-CAACA-3' a *w*8748R, sekvence 5'-GAAGGAGGCGCAATTATTCA-3', sonda *w*² s primery *w*1056, sekvence 5'-TTGGAAACTCGGATCTTGG-3' a *w*13065, sekvence 5'-ACGGAACCATGAGAGGTACG-3'. Teplota nasedání primerů byla 61 °C a doba extenze 1,5 minut. Po elektroforetické separaci byly fragmenty přečištěny kitem QIAquick Gel extraction kit (Qiagen, katalogové číslo 28704) a zaklonovány do vektoru pGEM. Pro ligaci v 10 µl reakci bylo použito 400U T4 DNA ligázy (NEB), 50 ng pGEM a 40 ng sondy. Připravené konstrukty byly značeny biotinem pomocí Biotin-Nick Translation Mix (Roche, katalogové číslo 11745824910) dle návodu dodaného výrobcem. Při hybridizaci na jeden vzorek připadala směs 1 µl (tj. 20 ng) proby *w*¹, 1 µl proby *w*² (tj. 20ng) a 10 µg DNA lososích spermií (Sigma, katalogové číslo 9007-49-2). Tato směs DNA byla nejprve precipitována a smíchaná s 10 µl hybridizačního roztoku 50 % deionizovaného formamidu

(Sigma, katalogové číslo F9037), 10% dextransu sulfátu (Sigma, katalogové číslo D8906), 2×SSC, 1% Tween 20 (Sigma, katalogové číslo P1379). Směs byla 5 minut denaturována při 95°C a ihned poté přenesena na led. Preparáty byly ochlazeny tekutým dusíkem a pomocí žiletky bylo odstraněno krycí sklíčko. Poté byly odvodněny vzestupnou alkoholovou řadou (postupně 30 s v 70%, 80% a 96% etanolu). Preparáty byly vloženy do Coplinovy nádoby s 2×SSCT přehřáté na 37°C na 20 min. Poté byly preparáty denaturovány v 70% formamidu/2×SSCT zahřátého na 75°C po dobu 10 minut. Po vyjmutí sklíček z lázně byly preparáty zbaveny přebytečného roztoku lehkým osušením hran a bylo aplikováno 10 µl sondy v hybridizačním mixu. Preparáty byly přikryty krycím sklíčkem a inkubovány přes noc při 37°C.

Druhá den byla odstraněna krycí sklíčka a preparáty promyty v přehřátém (45°C) 50% formamidu/2×SSCT po 4 × 5 minut. Dále pokračovalo promývání v 2×SSCT v 37°C po 4 × 2 minuty a jako poslední část promývací pufr v 4×SSCT při pokojové teplotě po 5 minut. Poté byla reakce blokována přidáním 250-500 µl 2,5% BSA při pokojové teplotě po 10 minut. Sklíčka byla lehce osušena a bylo přidáno 100 µl roztoku streptavidinu-Cy (1 µl streptavidinu-Cy s 1 ml 2,5% BSA) (Vector laboratories, katalogové číslo SA5000), preparáty byly přikryty krycími sklíčky a inkubace probíhala 30-60 minut při pokojové teplotě. Po odstranění krycího sklíčka byly preparáty promývány v 4×SSCT po 3×5 minut. Následně bylo opět přidáno 250-500 µl 2,5% BSA a po přikrytí sklíčky necháno 10 minut při pokojové teplotě ve tmě. Po odstranění přebytečného BSA bylo přidáno 50 µl roztoku biotinylovaného anti-streptavidinu (10 µl biotinylovaného anti-streptavidinu s 250 µl 2,5% BSA) (Vector laboratories, katalogové číslo BA-0500) a inkubováno, opět s krycími sklíčky, po dobu 30-60 minut v 37°C ve tmě. Následně proběhlo opět promytí v 4×SSCT po 3×5 minut při pokojové teplotě. Sklíčka byly opět blokovány 250-500 µl 2,5% BSA po 10 min a poté inkubovány 100 µl streptavidinu-Cy, přikryté krycími sklíčky po 30-60 minut. Finální promývání je v 4×SSCT po 3×5 minut. Posledním krokem bylo obarvení chromozomů pomocí DAPI (1 µl DAPI a 60 µl Dabco), kdy bylo na sklíčko napipetováno 10-15 µl směsi, přikryto krycím sklíčkem a zafixováno lakem na nehty.

4 Výsledky

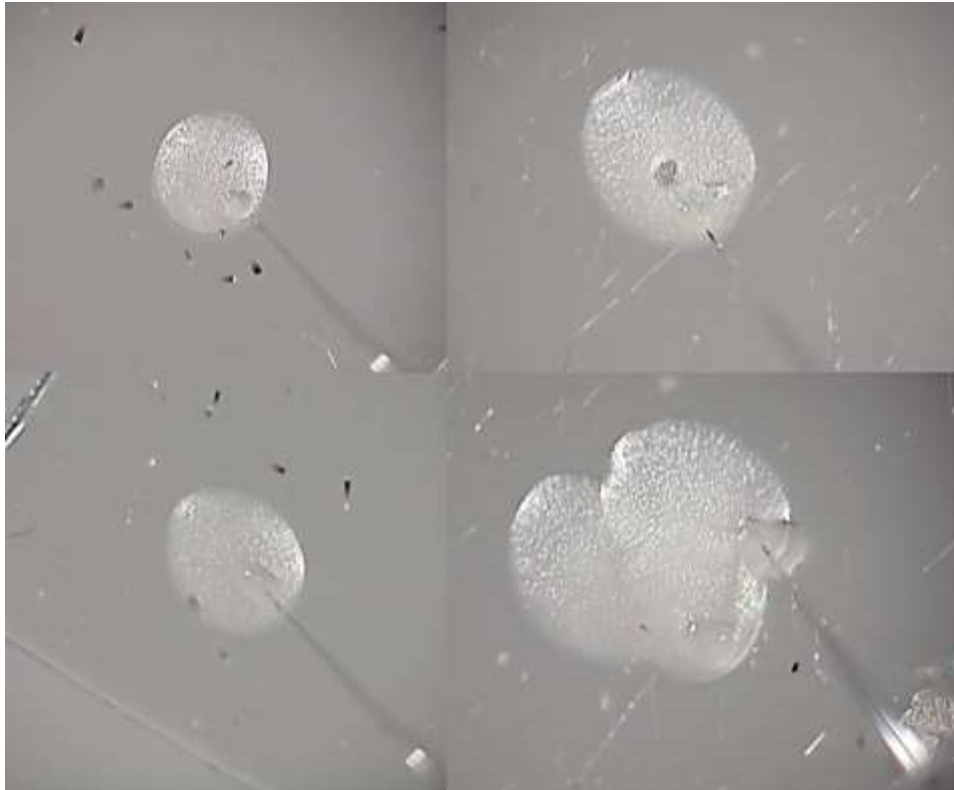
4.1 Optimalizace injikace obaleče jablečného

Dosažením prvního cíle bylo vytvoření konstruktů *Tom*. Využitím tohoto konstruktů bylo provedeno celkem 35 injikačních experimentů a paralelně také 17 injikačních experimentů s konstruktem *RATom*, přičemž v rámci každého experimentu bylo injikováno cca 25-150 vajíček. Z prvních 21 experimentů, kdy byly využity směsi 1, 2, 3 a 8 a byla injikována i několik hodin stará vajíčka, se nevylíhlo žádné potomstvo (Tab. 3). Proto byly pozměněny podmínky injikace. Byla upravena koncentrace injikované DNA, injikace probíhala do vajíček starých hodinu, maximálně dvě od jejich naklazení. Rovněž byly využívány komerčně dostupné jehly. Z těchto injikací bylo pozorováno nejméně 16 larev a vylíhnutí 8 dospělých jedinců. Dospělí jedinci, kteří byli dále kříženi s divokými jedinci, byli schopni reprodukce a měli prokazatelně životaschopné potomstvo (Obr. 10). Potomstvo bylo ve stádiu vajíčka či embryonálního vývoje vyhodnocováno pomocí fluorescenčního mikroskopu na expresi proteinu Tomato. Ani u jednoho z potomků exprese zaznamenána nebyla. Nicméně je důležité také zmínit, že na expresi Tomato nebyli vyhodnoceni všichni získaní jedinci, a to vzhledem k tomu, že v době nejintenzivnějších injikačních experimentů byly naše chovy obalečů napadeny roztoči, celý pokus musel být zastaven a veškeré potomstvo injikovaných jedinců zlikvidováno.

Po obnovení chovu došlo k dalším 5 injikacím, ze kterých se vylíhli prozatím tři dospělí jedinci, kteří byli opět kříženi s divokými dospělci. Po naklazení byla na přítomnost fluorescence sledována vajíčka těsně před jejich vylíhnutím, popř. larvy I. instaru těsně po vylíhnutí. U jednoho vajíčka byla pozorována fluorescence (Obr. 11), což může znamenat, že intergrace konstruktů byla úspěšná. Jeho vývoj bude dále pozorován.

Tab. 3: Výsledky z injikací obaleče jablečného.

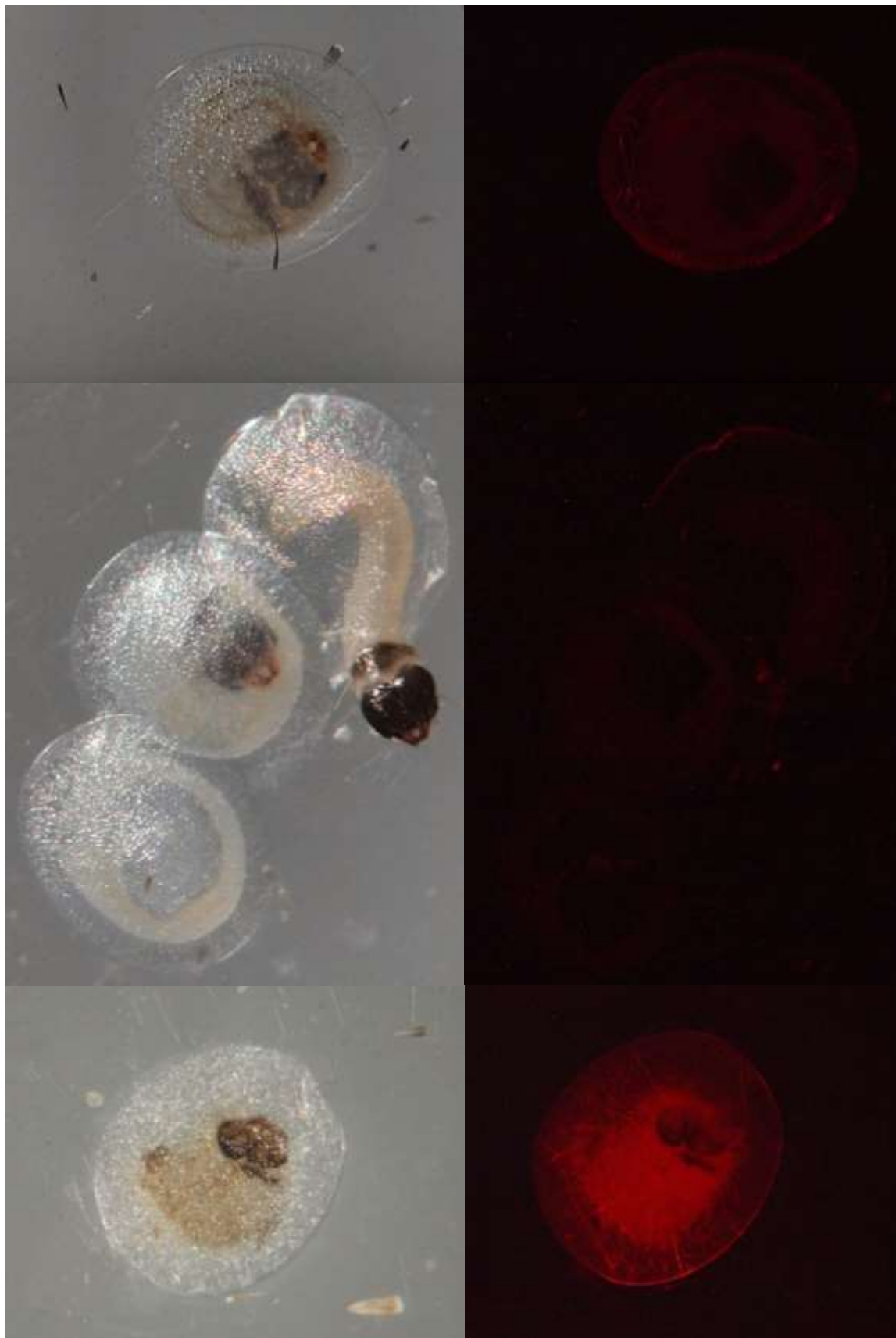
Injikační směs	Vektor ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Helper ($\text{ng}/\mu\text{l}$)	Počet injikovaných vajíček	Počet vylíhlých jedinců (larev)
směs 1	1,1	0,5	} 1575	0 (0)
směs 2	1,65	0,5		
směs 3	2,2	0,5		
směs 4	10	6	1487	12 (35)
směs 5	10	0,7	1225	5 (11)
směs 6	1	0,5	15	0 (1)
směs 7	10	5	5	0 (0)
směs 8	0,5	0,25	520	0 (0)



Obr. 9: Injikace vajíček obaleče jablečného.

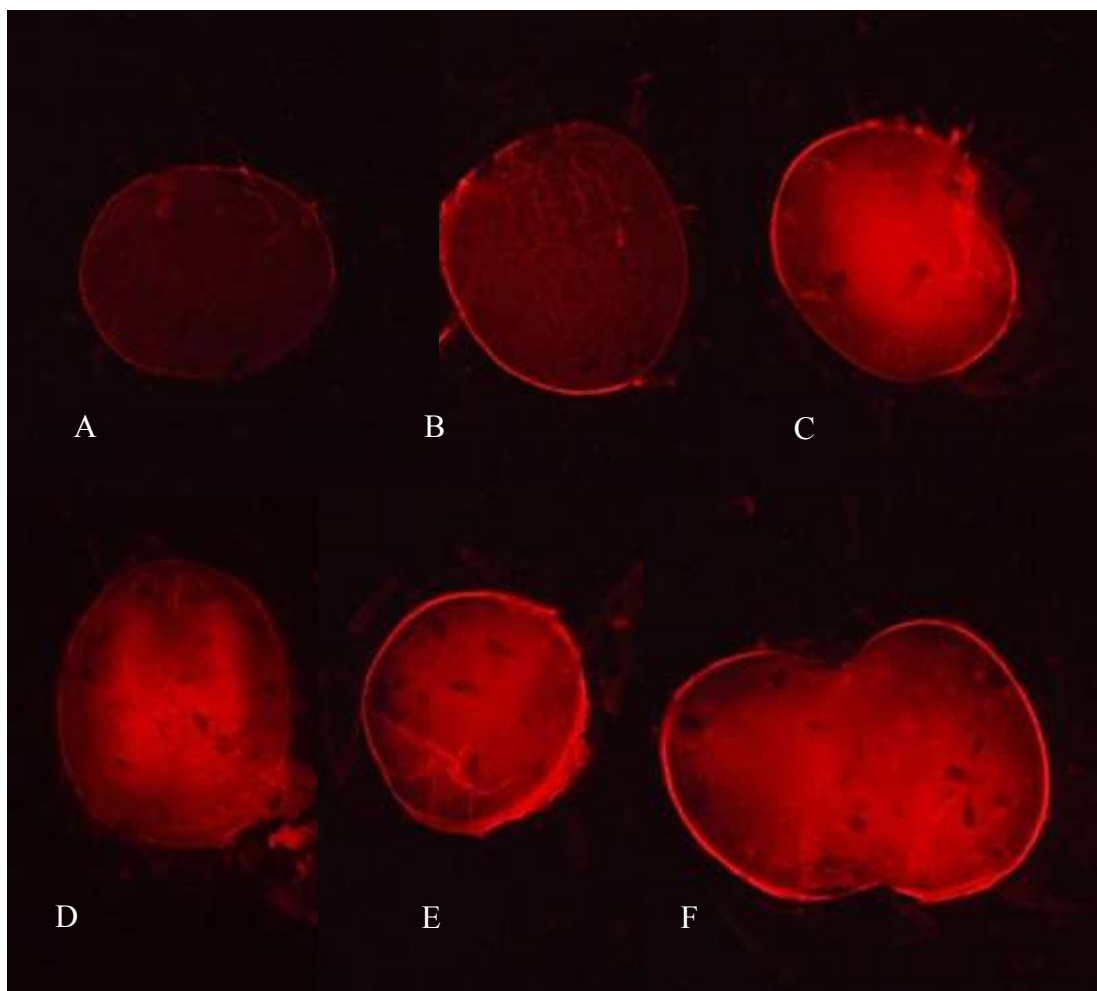


Obr. 10: Vytvíjející se larvy potomků motýlů, kteří byli injikováni injikační směsí 4 a následně zkříženi s divokými motýli. Pozorované potomstvo bylo životaschopné, na obrázku je zachyceno líhnutí larev I. instaru z vajíček.

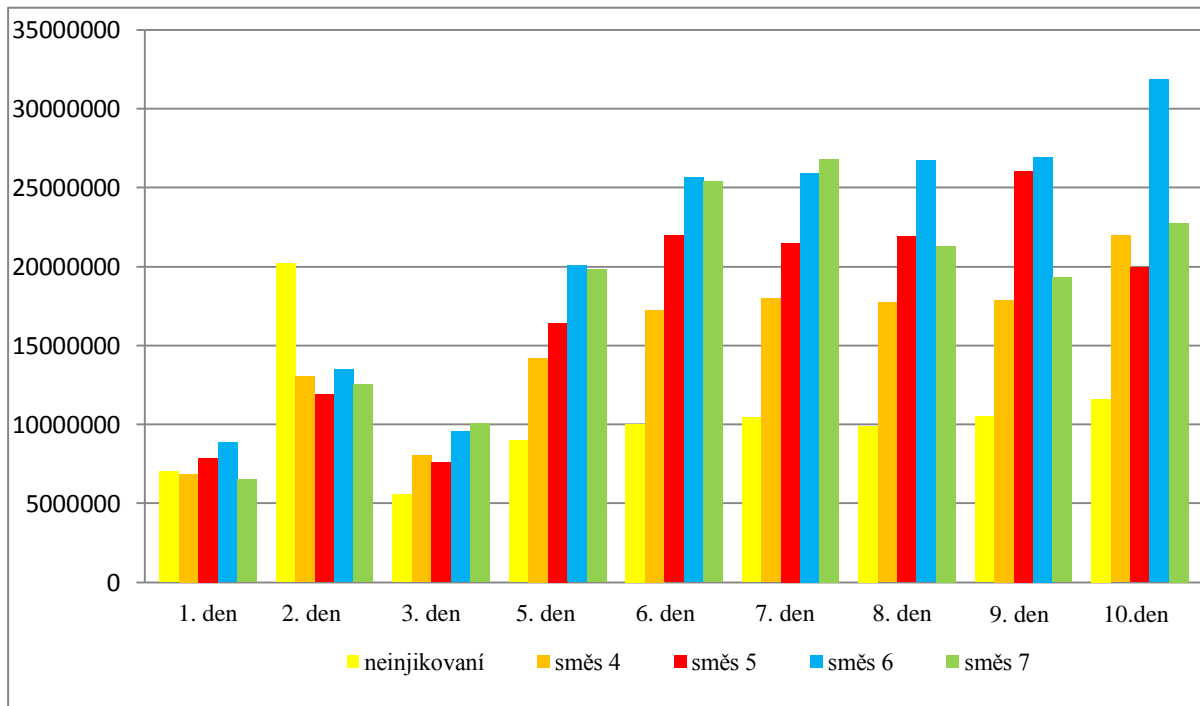


Obr. 11: Srovnání fluorescence u potomků injikovaných motýlů. Jedinci byli injikováni stejnou směsí, a to směsí 4.

U injikovaných vajíček byla sledována také transientní exprese konstruktů. Ačkoliv transientní exprese byla kontrolována a potvrzována po jednotlivých injikacích v průběhu celého projektu, vyhodnocení přesné intenzity exprese s použitím programu Adobe Photoshop CS5 bylo provedeno v rámci pouze jednoho pokusu, kdy bylo nainjektivováno 21 vajíček různými koncentracemi (Obr. 12). K tomuto pokusu byly použity směsi 4, 5, 6 a 7 a jako kontrola byly použity neinjektovaná vajíčka. Transientní exprese byla prokázána celkem u 90 % injikovaných vajíček a obecně intenzita exprese stoupala se stářím vajíček (Obr. 14). Rovněž byly patrné rozdíly v expresi mezi vajíčky injikovanými různými injikacími směsmi, kdy k největší expresi docházelo po injikaci vektoru *RATom* s dvěma nejvyššími koncentracemi.



Obr. 12: Srovnání transientní exprese u neinjektovaných (A, B) a injektovaných vajíček (C-F).



Obr. 13: Vyhodnocení transienční exprese v průběhu vývoje vajíčka. Vajíčka byla injikována různými koncentracemi injikačních směsí (viz. Tab. 2), první vyhodnocení exprese proběhlo ihned po injikaci a následně po 24 hodinách atd.

Rovněž bylo pozorováno, že doba vývoje injikovaných vajíček je výrazně prodloužena oproti vývoji divokých linií. U neinjikovaných jedinců trvá celý vývoj, tj. od oplození vajíčka po vylíhnutí dospělce 6 týdnů. U injikovaných vajíček se larvy líhnou za 2-4 týdny, v některých případech se larvy objeví i po déle než 4 týdnech. Celý vývoj není ukončen dříve než po 7 týdnech.

4.2 Příprava transgenních kmenů drozofily a mapování pozice transgenů

Injikace konstruktů *RATom-pUAST* do kmene *yw* byla provedena firmou Rainbow Transgenic. Jedince vylíhlé z injikovaných vajíček jsem křížila s kmenem *yw* a postupným křížením jsem díky expresi reportérového genu *w* získala homozygotní linie. Celkem bylo získáno sedm linií. Mezi jednotlivými liniemi byly patrné rozdíly v intenzitě zbarvení očního pigmentu, naznačující vliv pozičního efektu. Pozice transgenů byla nejprve mapovaná pomocí křížení, později byla poloha transgenů určena metodou FISH. U linií 1, 3 a 14 se transgen vyskytoval na 2L chromozomu, u linií 12, 15 a 16 na 3L chromozomu. Bohužel přesnou polohu transgenů se mi určit nepodařilo. Údaje o intenzitě očního zbarvení a pozici transgenů u jednotlivých linií jsou uvedeny v tab. 2.

4.3 Optimalizace teplotního působení pro nastolení letality u drozofily

Systém Gal4-UAS byl využit k selektivní indukci exprese konstruktů *RATom*. Nejprve byla testována indukce aktinovým promotorem křížením s linií *yw; Act-GAL4/TM6,Tb*, která nese marker *Tb* viditelný ve formě krátkých kukel. Křížením došlo k letalitě všech jedinců o genotypu *yw; Act-GAL4/RATom-UAS*. Proto jsem přistoupila ke křížení testovaných linií s kmenem *yw; GAL4:PR/TM6,Tb*, což umožnilo postupným zvyšováním/snižováním koncentrace mifepristonu v médiu zesilovat/tlumit expresi testovaného konstruktů. U transgenických linií 1, 3 a 14 byla jako hraniční koncentrace, pod kterou už hormon neovlivňuje expresi GAL4, zjištěna koncentrace < 10 ng/μl. Tato hodnota byla hraniční jak při pokusech v 25°C, tak i v 18°C.

Po křížení *yw; Act-GAL4/TM6,Tb* s liniemi 12, 15 a 16 se po podání jakýchkoliv koncentrací mifepristonu, a to i těch nulových, objevují pouze jedinci *Tb*, tedy veškeré potomstvo nesoucí *RATom* v kombinaci s *GAL4:PR* je letální. To může být způsobeno tím, že *GAL4* má bazální expresi i bez podání hormonu, která u těchto linií stačí na aktivaci UAS, a tím dochází ke stálé letalitě jedinců s konstruktem *RATom*. Zajímavostí bylo, že samci z linie 16 se v žádném z provedených pokusů nepářily se samičkami genotypu *yw; GAL4:PR/TM6, Tb* nebo alespoň u uvedeného křížení nikdy nevzniklo žádné potomstvo. Veškeré pokusy s různými koncentracemi hormonu mifepriston jsou zaznamenány v tab. 4-6.

Pro zjištění, zda snížená teplota může indukovat zvýšenou letalitu, byly provedeny pokusy při 18°C a 4°C. Testování s přidavkem hormonu bylo v těchto teplotách provedeno u linií, u nichž byla nalezena hraniční koncentrace působení hormonu. Z výsledků je zřejmé, že rozdíly mezi pokusy provedenými ve 25°C a pokusy při snížené teplotě nejsou nijak markantní (Tab. 5, 6). U linií 12, 15 a 16 bylo testováno, zda u nich letalitu nemůže vyvolat i samotné snížení teploty, a to i bez hormonální indukce. Linie byly tedy umístěny do 18°C, nicméně letalita pozorována nebyla.

Tab. 4: Potomstvo (*Tb* nebo *Tb*⁺) vzniklé křížením jednotlivých linií s linií nesoucí gen *GAL4* při podání různých koncentrací mifepristonu při 25°C.

Linie	1	3	14	12	15	16	yw; Sb/TM6	yw; 11-5
	2. chr	2. chr	2. chr	3. chr	3. chr	3. chr		
	Barva oka červená	červená	červená	oranžová	oranžová	červená	červená	červená
100								<i>Tb</i>
50		<i>Tb</i>						<i>Tb</i>
20	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>
15	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>					
13		<i>Tb</i>	<i>Tb</i>					
12	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>					
10	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>
0,95	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺					
0,90	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺					
0,85	<i>Tb, Tb</i> ⁺		<i>Tb, Tb</i> ⁺					
0,80	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺					
0,75	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺					
0,70		<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺					
0,65		<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺					
0,60		<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺					
0,55		<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺					
0,50	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺					
0,45		<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺					
0,40		<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺					
0,25	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺					
0,01	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>		
0,02		<i>Tb, Tb</i> ⁺		<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>		
10 ⁻⁵				<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>		
20 ⁻⁵				<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>		
10 ⁻⁸	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>		
10 ⁻¹¹		<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>		
10 ⁻¹⁴		<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>		
10 ⁻¹⁷		<i>Tb, Tb</i> ⁺						
0	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺		<i>Tb</i>		<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺

Koncentrace mifepristonu (ng/ul)

Tab. 5: Potomstvo (*Tb* nebo *Tb*⁺) vzniklé křížením jednotlivých linií s linií nesoucí gen *GAL4* při podání různých koncentrací mifepristonu při 18°C.

	linie	1	3	14
	barva oka	červená	červená	červená
Koncentrace mifepristonu (ng/μl)	50	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>
	20	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>
	15	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>
	10	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>
	0,95	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	
	0,90	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	
	0,85	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	
	0,80	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	
	0,75	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺
	0,50	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺
	0,25	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺
	0,01	<i>Tb, Tb</i> ⁺		<i>Tb, Tb</i> ⁺
	0	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺

Tab. 6: Potomstvo (*Tb* nebo *Tb*⁺) vzniklé křížením jednotlivých linií s linií nesoucí gen *GAL4* při podání různých koncentrací mifepristonu.

Koncentrace mifepristonu (ng/μl)	Linie	1				14		
	Teplota	24 hod (4°C)	20 hod (4°C)	1 hod (4°C)	25°C	3 hod (4°C)	1 hod (4°C)	1 hod (4°C)
	10		<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>	<i>Tb</i>		
0,90						<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺
0,80						<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺
0,75		<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺			
0,70						<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺
0,60						<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺
0,50			<i>Tb, Tb</i> ⁺		<i>Tb, Tb</i> ⁺			
0		<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺	<i>Tb, Tb</i> ⁺

Bylo také provedeno kontrolní křížení *yw; GAL4:PR/TM6, Tb* s *yw:Sb/TM6* a *yw;11-5*. Výsledkem těchto křížení byla letalita jedinců *Tb*⁺ po přidání hormonu. Bez přidání hormonu vznikalo sice očekávané potomstvo s jedinci *Tb*⁺ i *Tb*, ale neočekávaná letalita jedinců *Tb*⁺ však bohužel naznačuje pravděpodobnou nefunkčnost testovacího systému.

Pro zjištění, ve kterém stádiu dochází k letálním účinkům, byly vajíčka a larvy I., II. a III. instaru položeny na agar s hormonem o koncentraci 15 ng/μl. Ze všech provedených

pokusů, tj. celkově 15 pokusů, přežili pouze jedinci *Tb*. V kontrolním pokusu bez přidání hormonu se vylíhli jedinci jak *Tb*, tak i *Tb*⁺. Z tohoto výsledku vyplývá, že hormon má vliv na jakékoliv stádium vývoje. Dále bylo zjišťováno, zda má hormon vliv ještě na stádium kukly, kdy *Tb*⁺ s genotypem *yw; Act-GAL4/RATom-UAS* byly dány na hormon (15 ng/μl). Letalita nebyla pozorována, z čehož vyplývá, že stádium kukly není na přítomnost hormonu citlivé.

5 Diskuze

Mými cíli bylo optimalizovat injikaci *C. pomonella* pomocí konstruktů $3\times P3$ -*Tom* a pomocí systému GAL4-UAS determinovat podmínky teplotního působení pro nastolení letality u drozofily.

5.1 Injikace *C. pomonella*

Potřeba vědeckého výzkumu obaleče jablečného je daná především závažností působení toho škůdce, tj. nemalými škodami vzniklými jeho působením na ovocných stromech po celém světě (Kot 2010; Mani et al. 1997; Nikolic & Selamovska 2007; Nguyen et al. 2013; Fuková et al. 2009). Ideovou součástí tohoto výzkumu je i tato bakalářská práce, která je zaměřena na vývoj separace pohlaví u obaleče s využitím genu *Notch*. Má bakalářská práce navázala na předcházející výzkum v naší laboratoři, kdy byl *Notch* u obaleče osekvenován a byl připraven konstrukt *RATom*, obsahující část genu *Notch* a fluorescenční marker *Tomato* (Kůta 2011). Pro optimalizaci injikace jsem vytvořila konstrukt *Tom*, se kterým probíhaly injikace a paralelně probíhaly také injikace s konstruktem *RATom*. Pro první injikace byly použity koncentrace DNA použité při úspěšných transformacích provedených Fergusson et al. (2011). Vzhledem k tomu, že z injikovaných vajíček opakovaně nevznikalo žádné potomstvo či potomstvo nevykazovalo žádnou transformaci, byla postupně koncentrace injikované DNA pozměňovaná a byly také použity koncentrace dle publikací, kde byly injikace prováděny do vajíček bource (Shamila & Mathavan 1997; Handler et al. 1998). Dále se pro injikaci začaly využívat komerčně vyráběné jehličky. Avšak rozdíl mezi komerčními a vytaženými jehličkami, co se týče úspěšnosti injikace, se nejevil nijak markantní. S komerčními jehlami se navíc o něco hůře manipulovalo, jehly jsou velice náchylné na odrazení i o samotné vajíčko a často jsou tak úzké, že se velice snadno zanesly případnými nečistotami. Často se stávalo, že byly tak tenké, že nedokázaly ani vajíčko probodnout. Na druhou stranu jehly připravené v laboratoři nebyly vždy dokonale vytažené, ale nebyla nutné s nimi zacházet tak citlivě. Po úpravě koncentrací a změně injikace se z následujících experimentů vylíhli jedinci, kteří byli dále kříženi s divokým kmenem. U jejich potomstva byl pozorován jeden jedinec, u kterého byla zaznamenána fluorescence. Lze tedy předpokládat, že je transgenní a nese konstrukt *Tom* a jeho další vývoj bude sledován. Nicméně je to jeden jedinec z několika tisíců injikací. Neúspěšnost transformace může to být způsobena nevyhovující koncentrací vektoru, nebo také nekompatibilitou vektoru s helperem. Existují také studie, které se zabývají zvýšením efektivity integrace vektoru

pomocí chimérického transpozonu *piggyBac* (Wang et al. 2010), využívající systém GAL4-UAS ke specifickému zabudování vektoru do genomu. Neúspěšnost injikace lze možná také přičíst na vrub malému počtu vajíček, které jsem měla k injikacím k dispozici. U bource morušového byly pozorovány rozdíly v úspěšnosti injikace také v závislosti na místě, kde bylo vajíčko injikováno (Thomas et al. 2002). Dále naše vajíčka nebyla před injikací desinfikována ani nebyl vpich do vajíčka ošetřen speciálním lepidlem (Thomas et al. 2002), což může mít samozřejmě vliv na přirozený vývoj jedince, který může být oslaben případnou ztrátou vaječné hmoty.

Při injikaci *B. mori* konstruktem $3 \times P3$ -EGFP v *piggyBac* byla u potomstva injikovaných jedinců pozorována EGFP fluorescence už sedmý den embryonálního vývoje (Ma et al. 2013). U mnou provedených injikací nebyla zaznamenána žádná fluorescence markeru Tomato u potomků injikovaných jedinců. Byla pouze potvrzena transientní exprese u injikovaných vajíček, stejně jako u injikace obaleče konstruktem $3 \times P3$ -EGFP, kde byla pozorována u jedné koncentrace exprese u 63 % injikovaných vajíček (Ferguson et al. 2011).

Při injikaci vajíček obaleče docházelo k mnoha problémům. Při přenosu do jiné fotoperiody se motýli pár dní vůbec nepářili, pravděpodobně kvůli šoku vzniklého změnou světla a tmy a muselo dojít k jejich aklimatizaci; podobné pozorování bylo zaznamenáno i v publikované studii (Ferguson et al. 2011). Motýli se pravděpodobně i přes stále stejné podmínky v insektáriu řídí svými biorytmy, které do určité míry kopírují podmínky panující zrovna ve volné přírodě. V neměnném prostředí insektária kladou v zimním období mnohem méně vajíček než v letním období. Naše první injikace probíhaly na podzim a v zimě, naproti tomu další série injikací, která probíhala na jaře a v létě, měla, co se týče vylíhlých jedinců, kladné výsledky. Je diskutabilní, jestli pozorované sezonní vlivy mohou také působit na zdárnost injikace. Samozřejmě také záleželo na stáří kladoucích jedinců, nebylo možné každý den pracovat s novými dospělými jedinci a také jsem musela počítat s tím, že všechna nakladená vajíčka nebyla oplodněná. Významnou překážkou pro tento projekt byli roztoči, kteří v podstatě zastavily pokus probíhající v létě, protože bylo třeba zlikvidovat veškeré napadené jedince a obnovit celý chov, což bylo záležitostí na několik týdnů.

5.2 Optimalizace teplotního působení pro nastolení letality u drozofily

U drozofily byl pro uplatnění genu *Notch* využit systém GAL4-UAS (Duffy 2002) a pro indukci systému byl využit hormon mifepriston. Mifepriston funguje tak, že zaplňuje místo

určené pro progesteron. V mém případě byl použit jako spouštěč systému GAL4-UAS, kdy nasedal na progesteronový receptor na genu *GAL4* (Tsai et al. 1998; Osterwalder et al. 2001; Roman et al. 2001; Nicholson et al. 2008). Po aktivaci systému došlo k expresi z konstruktů *RATom*, která způsobila letalitu daných jedinců. Mým úkolem bylo zjistit, jaká je hraniční koncentrace podávaného mifepristonu. Experimenty probíhaly tak, že křížené linie drozofil *yw; Act-GAL4/TM6,Tb* s liniemi *yw; UAS-RATom/UAS-RATom* byly dány na médium, které obsahovalo 100 μ l RU486 v různé koncentraci. Hormon se do těla drozofily dostane dvěma způsoby, buď v potravě nebo pomocí tzv. „larvální lázně“ (Osterwalder et al. 2001; Nicholson et al. 2008). Z experimentu je tedy nutné vynechat embryonální stádium a stádium kukly, kdy se potrava nepřijímá (Elliott & Brand 2008), což bylo i potvrzeno pokusem, kdy jsem dala kukly s genotypem *yw; Act-GAL4/RATom-UAS* do vysoké koncentrace mifepristonu a došlo k vylíhnutí všech testovaných jedinců. Při zjišťování stádia, ve kterém dochází k letalitě, došlo ke stejnému výsledku, a to že k letalitě dochází v jakémkoli larválním stádiu. Mifepriston není pro larvy nebo dospělé toxický, respektive při pokusech s drozofilami nebyly zjištěny horní meze dávek. Dospělci bez jakýchkoliv známek tolerovali dávky o 214 μ g/ml, nicméně vyšší koncentrace mifepristonu (100 μ g/ml) u samic snižují životaschopnost embryí až o 50%, je tedy pravděpodobné, že embrya jsou k RU486 citlivější (Tsai et al. 1998). RU486 přechází z matky do embrya, pravděpodobně přes buněčnou stěnu (Osterwalder et al. 2001). V mém pokusu bylo pracováno nejvýše s koncentrací 100 μ g/ml, kterou bylo testováno kontrolní křížení a nebylo pozorováno viditelně méně potomstva. U tří linií drozofil byla nalezena hraniční koncentrace působení mifepristonu, a to 10 ng/ μ l. Pod touto hodnotou se vždy objevovaly jak kukly *Tb*, tak kukly *Tb⁺*, a to ve všech pokusech, tzn. ve 25°C, v 18°C i ve 4°C. Naproti tomu u dalších třech linií (12, 15 a 16) docházelo k aktivaci GAL4-UAS systém stále, i bez přidání hormonu. To by mohlo být způsobeno bazální expresí GAL4, ke které dochází i bez mifepristonu, a která u těchto linií stačí na expresi v konstruktě *RATom*. Důvodem pozorovaného rozdílu mezi liniemi 12,15 a 16 od ostatních linií může být pozice transgenu v jejich genomu; u linií 12, 15 a 16 transgen leží na 3L chromozomu, kdežto u linie 1,3 a 14 leží na 2L chromozomu. Přesnou polohu transgenu se mi ovšem nepodařilo zjistit z důvodu nepřítomnosti kvalitních preparátů. Poziční efekt může být způsoben integrací do místa s určitým transkripčním potenciálem, který ovlivní transkripci daného transgenu. Ačkoliv byly u konstruktů použity izolátory, nelze účinnost izolátorů brát jako stoprocentní. Další možností je, že po zkřížení s jakýmikoliv mouchami na hormonu dochází společně s aktivací genu *GAL4* i k expresi nějakého dalšího genu, který má vliv na potomstvo, protože u kontrolního křížení docházelo

k letalitě Tb^+ . Na základě publikovaných výsledků s drozofilou (Fryxell & Miller 1995) se při pokusech ve snížené teplotě předpokládalo, že dojde ke změně hraniční koncentrace, případně, že jedinci s *RATom* budou hynout. Tato hypotéza ovšem potvrzena nebyla, výsledky byly obdobné jako ve 25°C. Toto pozorování ovšem není možné brát jako zcela jistě směrodatné, vzhledem k tomu, že mé pozdější kontrolní experimenty zpochybnilly funkčnost celého použitého systému. Pro ujasnění situace je třeba experiment zopakovat s využitím jiného GAL4 driveru.

6 Závěr

V mé bakalářské práci jsem optimalizovala podmínky injikace obaleče jablečného, kdy se z injikovaných vajíček prokazatelně líhli životaschopní jedinci, kteří byli dále schopní se reprodukovat, což je velice kladný výsledek. Bylo využito několik injikačních směsí v různých koncentracích vektoru i helperu, i využití dvou injikovaných konstruktů, a to konstruktů *RATom* a *Tom*. V injikovaných vajíčkách byla zaznamenána transienční exprese a u jednoho potomka injikovaného konstruktem *Tom* byla pozorována fluorescence. I přesto bych se ráda dále zaměřila na různé úpravy koncentrací jak vektorů, tak helperů, zahrnula do injikací i ošetřování vajíček desinfekcí a lepidlem. V experimentu s drozofilou se u několika linií nepodařilo nalézt hraniční koncentraci působení hormonu mifepristonu, u zbylých linií tato koncentrace nalezena byla, nicméně použitý systém se ukázal jako ne zcela funkční, a proto by bylo třeba experimenty zopakovat s jiným GAL4 driverem.

7 Použitá literatura

- Alston, D., Murray, M. & Reding, M., 2010. Codling Moth (*Cydia pomonella*). *Utah Pesets fact sheet*, (June), p.7.
- Bloem, S. et al., 2007. Suppression of the Codling Moth *Cydia pomonella* in British Columbia, Canada Using an Area-Wide Integrated Approach with an SIT Components. In *Area-Wide Control of Insect Pests*. pp. 591–601.
- Botto, E. & Glaz, P., 2010. Potential for controlling codling moth *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae) in Argentina using the sterile insect technique and egg parasitoids. *Journal of Applied Entomology*, 134(3), pp.251–260.
- Dobáková, P., 2013. Mifepriston. *Lekárnické listy*, 2, p.20.
- Duffy, J.B., 2002. GAL4 system in *Drosophila*: a fly geneticist's Swiss army knife. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)*, 34(1-2), pp.1–15.
- Elliott, D.A. & Brand, A.H., 2008. The GAL4 System: A versatile System for the Expression of Genes. In *Drosophila: Methods and protocols*. pp. 79–95.
- Emelyanov, A. & Parinov, S., 2008. Mifepristone-inducible LexPR system to drive and control gene expression in transgenic zebrafish. *Developmental biology*, 320, pp.113–21.
- Ferguson, H.J. et al., 2011. Genetic transformation of the codling moth, *Cydia pomonella* L., with piggyBac EGFP. *Transgenic research*, 20, pp.201–214.
- Frydrychova, R.C. et al., 2007. Transcriptional activity of the telomeric retrotransposon HeT-A in *Drosophila melanogaster* is stimulated as a consequence of subterminal deficiencies at homologous and nonhomologous telomeres. *Molecular and cellular biology*, 27(13), pp.4991–5001.
- Fryxell, K.J. & Miller, T.A., 1995. Autocidal biological control: a general strategy for insect control based on genetic transformation with a highly conserved gene. *Journal of Economic Entomology*, 88, pp.1221–1232.

- Fuková, I. et al., 2009. Rapid assessment of the sex of codling moth *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae) eggs and larvae. *Journal of Applied Entomology*, 133(4), pp.249–261.
- Fuková, I., Nguyen, P. & Marec, F., 2005. Codling moth cytogenetics: karyotype, chromosomal location of rDNA, and molecular differentiation of sex chromosomes. *Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada*, 48, pp.1083–1092.
- Gazave, E. et al., 2009. Origin and evolution of the Notch signalling pathway: an overview from eukaryotic genomes. *BMC evolutionary biology*, 9, p.249.
- Gordon, W.R., Arnett, K.L. & Blacklow, S.C., 2008. The molecular logic of Notch signaling--a structural and biochemical perspective. *Journal of cell science*, 121(Pt 19), pp.3109–19.
- Handler, a M. et al., 1998. The lepidopteran transposon vector, piggyBac, mediates germ-line transformation in the Mediterranean fruit fly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(13), pp.7520–5.
- Hendrichs, J. et al., 1983. Six years of successful medfly program in Mexico and Guatemala. *Fruit Flies of Economic Importance*, pp.353–365.
- Hilburn, D.J. & Dow, R.L., 1990. Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*, eradicated from Bermuda. *Florida Entomologist*, 73(2), pp.342–343.
- Kakinohana, H. et al., 1993. The Eradication of the Melon Fly from the Okinawa Islands, Japan: II. Current Control Program. In *Fruit flies: Biology and Management*. Springer New York, pp. 465–469.
- Klassen, W., 2005. Area-wide integrated pest management and the sterile insect technique. In V. A. Dyck, J. Hendrichs, & A. S. Robinson, eds. *Sterile Insect Technique: Principles and practice in area-wide integrated pest management*. Springer Netherlands, pp.40–67.

- Klassen, W. & Curtis, C., 2005. History of the sterile insect technique. In V. A. Dyck, J. Hendrichs, & A. S. Robinson, eds. *Sterile Insect Technique: Principles and practice in area-wide integrated pest management*. Springer Netherlands, pp. 3–36.
- Knipling, E.F., 1972. Entomology and the management of man's environment. *Australian Journal of Entomology*, 11(3), pp.153–167.
- Knipple, D.C., 2013. Prospects for the use of transgenic approaches to improve the efficacy of the Sterile Insect Technique (SIT) for control of the codling moth *Cydia pomonella* Linnaeus (Lepidoptera: Tortricidae). *Crop Protection*, 44, pp.142–146.
- Kopan, R. & Ilagan, M.X.G., 2009. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. *Cell*, 137(2), pp.216–33.
- Kot, I., 2010. Monitoring of codling moth (*Cydia pomonella* L.) in apple orchards using two methods. *Journal of Plant Protection Research*, 50(2), pp.220–223.
- Kůta, V., 2011. *Izolace, charakterizace a lokalizace ortologní sekvence genu Notch (Drosophila) u obaleče jablečného, Cydia pomonella*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích.
- Lyman, D. & Young, M.W., 1993. Further evidence for function of the *Drosophila* Notch protein as a transmembrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(21), pp.10395–9.
- Ma, S. et al., 2013. Genetic marking of sex using a W chromosome-linked transgene. *Insect biochemistry and molecular biology*, 43(12), pp.1079–1086.
- Mani, E. et al., 1997. Population dynamics of codling moth, *Cydia pomonella* (L.), in undisturbed apple orchards of eastern Switzerland. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft*, 70(1-2), pp.117–132.
- Marec, F. et al., 2005. Development of genetic sexing strains in Lepidoptera: from traditional to transgenic approaches. *Journal of economic entomology*, 98, pp.248–259.

- Nguyen, P. et al., 2013. Neo-sex chromosomes and adaptive potential in tortricid pests. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17), pp.6931–6.
- Nicholson, L. et al., 2008. Spatial and temporal control of gene expression in *Drosophila* using the inducible GeneSwitch GAL4 system. I. Screen for larval nervous system drivers. *Genetics*, 178(1), pp.215–34.
- Nikolic, K. & Selamovska, A., 2007. The harmfulness *Cydia pomonella* L. in the fruit production in Jablanica District. *Agroznanje - Agroknowledge Journal*, 8(2), pp.43–49.
- Novák, I. & Severa, F., 1990. *Motýli*, Praha: Aventinum nakladatelství s. r. o.
- Osterwalder, T. et al., 2001. A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22), pp.12596–601.
- Pires-daSilva, A. & Sommer, R.J., 2003. The evolution of signalling pathways in animal development. *Nature reviews. Genetics*, 4(1), pp.39–49.
- Proverbs, M.D., Newton, J.R. & Campbell, C.J., 1982. Codling moth: A pilot program of control by sterile insect release in British Columbia. *The Canadian Entomologist*, 114(4), pp.363–376.
- Rendón, P. et al., 2004. Medfly (Diptera: Tephritidae) genetic sexing: large-scale field comparison of males-only and bisexual sterile fly releases in Guatemala. *Journal of economic entomology*, 97(5), pp.1547–1553.
- Roman, G. et al., 2001. P[Switch], a system for spatial and temporal control of gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(22), pp.12602–7.
- Shamila, Y. & Mathavan, S., 1997. Hatching ability of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) eggs micro-injected with different concentrations of DNA at selected embryonic stages. *European journal of entomology*, 94(4), pp.553–555.

- Thomas, J.L. et al., 2002. 3xP3-EGFP marker facilitates screening for transgenic silkworm *Bombyx mori* L. from the embryonic stage onwards. *Insect biochemistry and molecular biology*, 32, pp.247–253.
- Tsai, S. et al., 1998. A novel RU486 inducible system for the activation and repression of genes. *Advanced drug delivery reviews*, 30(1-3), pp.23–31.
- Varela, L.G. et al., 1993. Monitoring and characterization of insecticide resistance in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in four western states. *Journal of Economic Entomology*, 86, pp.1–10.
- Vreysen, M., Hendrichs, J. & Enkerlin, W., 2006. The sterile insect technique as a component of sustainable area-wide integrated pest management of selected horticultural insect pests. *Journal of fruit and ornamental ...*, 14.
- Vreysen, M.J.B. et al., 2000. *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) Eradicated on the Island of Unguja, Zanzibar, Using the Sterile Insect Technique. *Journal of Economic Entomology*, 93(1), pp.123–135.
- Wang, N. et al., 2010. Using chimeric piggyBac transposase to achieve directed interplasmid transposition in silkworm *Bombyx mori* and fruit fly *Drosophila* cells. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 11(9), pp.728–34.
- Wesley, C.S. & Mok, L., 2003. Regulation of Notch Signaling by a Novel Mechanism Involving Suppressor of Hairless Stability and Carboxyl Terminus-Truncated Notch. *Molecular and Cellular Biology*, 23(16), pp.5581–5593.
- Wesley, C.S. & Saez, L., 2000. Analysis of notch lacking the carboxyl terminus identified in *Drosophila* embryos. *The Journal of cell biology*, 149(3), pp.683–96.
- Witzgall, P. et al., 2008. Codling moth management and chemical ecology. *Annual review of entomology*, 53, pp.503–522.