

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**



**Hledání SNP pro genetické mapování resistance obaleče jablečného, *Cydia pomonella*, vůči viru granulózy (CpGV).**

**Bakalářská práce**

**Irena Hladová**

**Školitel: RNDr. Petr Nguyen**

České Budějovice

2012

Hladová I (2012) Hledání SNP pro genetické mapování resistance obaleče jablečného, *Cydia pomonella*, vůči viru granulózy (CpGV). [SNP identification for genetic mapping of CpGV resistance in codling moth, *Cydia pomonella*. Bc. Thesis, in Czech]. p.43, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

**Annotation:**

Codling moth (*Cydia pomonella*) is a major pest of pome fruit and walnuts worldwide. *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) is used as a highly efficient and specific way to control this pest. Recently, several resistant populations have been reported. In this thesis resistant and susceptible codling moth strains CpRR1 and Krym-61, respectively, were tested for presence of single nucleotide polymorphisms in introns of selected Z-linked genes. It also provides experimental design for linkage mapping of codling moth resistance to CpGV.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala 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 13.12. 2012

.....

Irena Hladová

**Poděkování:**

Touto cestou bych ráda poděkovala svým rodičům, kteří mě po celé mé studium podporovali jak finančně, tak především pravidelnými dodávkami lásky, jídla a optimismu. Velké díky patří Frantovi za to, že mě jako zbloudilého studenta druhého ročníku, vzal pod svá ochranná křídla. Díky si zaslouží hlavně Petr, který mě mnohému naučil a po celou dobu měl se mnou trpělivost. Chtěla bych také poděkovat všem holkám z naší laborky, Mirce, Martině, Jindře, Aničce, Báře a Janičce, že mě mezi sebe tak ochotně přijaly a po celou dobu mi pomáhaly a tvořily příjemnou atmosféru. Poděkování patří také Honzíkovi, Lukášovi, Ivet a Pavlovi, kteří mě vždy dokázali podpořit, rozveselit, uklidnit a rozptýlit, když bylo potřeba. Všem Vám ještě jednou moc děkuji!

# Obsah

1 Úvod.....	1
1.1 Charakteristika řádu Lepidoptera .....	1
1.1.1 Cytogenetika motýlů .....	1
1.1.2 Stabilita motýlích chromosomů.....	3
1.2 Charakteristika obaleče jablečného, <i>Cydia pomonella</i> .....	5
1.2.1 Životní cyklus.....	5
1.2.2 Cytogenetika obaleče jablečného .....	6
Metody ochrany ovoce proti obaleči jablečnému.....	9
1.2.3 Metoda ochrany ovoce pomocí CpGV .....	10
1.2.4 Rezistence obaleče jablečného proti CpGV .....	11
2 Cíle práce.....	13
3 Materiál a metody .....	14
3.1 Materiál .....	14
3.2 Izolace DNA.....	14
3.3 Polymerásová řetězová reakce .....	14
3.4 Gelová elektroforéza .....	16
3.5 Klonování.....	16
3.6 Sekvencování .....	17
3.7 Restrikční štěpení PCR produktů .....	17
3.8 Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) .....	18
4 Výsledky.....	20
4.1 Izolace intronových sekvencí.....	20
4.2 Restrikční štěpení PCR produktů .....	20
4.3 Denaturační gradientová gelová elektroforéza.....	23
5 Diskuze .....	27
6 Souhrn.....	31
7 Literatura .....	32
8 Příloha.....	41

# 1 Úvod

## 1.1 Charakteristika řádu Lepidoptera

Řád Lepidoptera je, se svými přibližně 160 000 popsányými druhy, druhým nejpočetnějším hmyzím řádem (Kristensen a kol., 2008). Jen v České republice bylo zaznamenáno 3 374 druhů motýlů (Laštůvka a Liška, 2005). Motýli jsou významní opylovači a indikátorové druhy klimatických změn (Parmesan a Yohe, 2003). Na druhou stranu jako fytofágové mohou některé druhy způsobovat významné ekonomické škody v podobě velkoplošných žírů kulturních rostlin, znehodnocení potravin a červivosti plodů. Proto se motýli stali předmětem četných ekologických (Scriber, 2011), fyziologických (Kehl a Fischer, 2012), genetických (Mita a kol., 2004) a fylogenetických studií (Beldade a kol., 2009).

### 1.1.1 Cytogenetika motýlů

Většina motýlů má haploidní počet chromosomů blízký  $n = 30$  (Robinson, 1971). Za ancestrální počet chromosomů je přitom považován karyotyp  $n = 31$ , který byl pozorován i u basálních skupin motýlů (Lukhtanov, 2000; De Prins a Saitoh, 2003; Marec a kol., 2010). Počty chromosomů však mohou v extrémních případech dosahovat i hodnot od  $n = 5$  (např. *Hypothyris thea*, Nymphalidae) (Brown a kol., 2004) po  $n = 223$  (*Polyommatus atlantica*, Lycaenidae) (Marec a kol., 2010).

Charakteristické jsou pro motýly malé, početné a morfologicky uniformní mitotické chromosomy holokinetického typu (Robinson, 1971; Yasukochi a kol., 2009). Holokinetické chromosomy se vyznačují absencí primární konstriktce, kinetochor pokrývá téměř celý povrch chromatid a mikrotubuly se tak připojují po celé jejich délce (Wolf, 1996). To patrně snižuje důsledky chromosomálních translokací, fúzí a rozpadů. Při těchto přestavbách nedochází ke vzniku dicentrických chromosomů a acentrických chromosomálních fragmentů, které jsou typické pro monocentrické chromosomy (Malheiros, 1947, citováno v Yasukochi a kol., 2009; Xia a kol., 2004). Důsledkem holokinetické povahy motýlích chromosomů tak může být například zvýšená odolnost motýlů vůči radioaktivnímu záření (Bakri a kol., 2005 citováno ve Vreysen a kol., 2010; Carpenter a kol., 2005).

Samice motýlů a jejich sesterského řádu chrostíků (Trichoptera) mají heterogametické určení pohlaví s konstitucí chromosomů WZ nebo Z0. Samčí pohlaví je určeno homogametickou konstitucí ZZ (Traut a Marec, 1997). Toto určení pohlaví bylo pojmenováno jako typ Abraxas podle píďalky angreštové, *Abraxas grossulariata*, u které byl tento způsob dědičnosti vázané na pohlaví poprvé pozorován. Chrostíci a bazální

skupiny motýlů mají konstituci Z0/ZZ. Chromosom W má svůj původ až u společného předka skupin Tischeriina a její sesterské skupiny Ditrysia, která zahrnuje 98% všech současných motýlích druhů (Lukhtanov, 2000). Existují dvě hypotézy vzniku chromosomu W. Podle první chromosom W vznikl z nadpočetného chromosomu B, který se začal párovat s chromosomem Z. Druhá hypotéza předpokládá, že u společného předka skupin Tischeriina a Ditrysia došlo k fúzi pohlavního chromosomu Z s autosomem. Chromosom W tak vznikl z homologu tohoto autosomu (Traut a Marec, 1996; Lukhtanov, 2000). Hypotézu o autosomálním původu pohlavního chromosomu W podporuje krátký úsek homologie mezi chromosomem Z a W obaleče jablečného, *Cydia pomonella*, odhalený metodou fluorescenční *in situ* hybridizace se sondou z umělého bakteriálního chromosomu (BAC-FISH) (Dalíková, 2009). Chromosom W motýlů se stal v poslední době předmětem intenzivního výzkumu. Barvení orceinem prokázalo, že je chromosom W tvořen převážně heterochromatinem (Traut, 1977; Traut a Marec, 1997; Vítková a kol., 2007). Experimenty také odhalily, že se chromosom W skládá z repetitivních sekvencí. Abe a kol. (2005) ukázal, že chromosom W bource morušového, *Bombyx mori* (Bombycidae), je tvořen převážně retrotransposibilními elementy. Studium chromosomu W různých druhů motýlů metodami BAC-FISH, genomové *in situ* hybridizace (GISH), genomové komparativní hybridizace (CGH) a FISH s barvicími sondami připravenými laserovou mikrodisekcí pohlavně specifického heterochromatinu repetitivní složení chromosomu W potvrzují (Sahara a kol., 2003a, b; Fuková a kol., 2007; Vítková a kol., 2007). Právě akumulace repetitivních sekvencí komplikuje detailní studium chromosomu W.

Je známo jen několik znaků vázaných na samičí pohlaví, tj. chromosom W. Patří mezi ně gen určující velikost vajíček ("egg size determining", *Esd*) (Kawamura a kol., 1988; 1990) a epistatický faktor určující samičí pohlaví popsáný u bource morušového (Ohbayashi a kol., 2002). V práci Marec a kol. (2001) byl na chromosom Z zavíječe moučného, *Ephestia kuehniella*, zářením translokován fragment chromosomu W, nesoucí faktor neslučitelný se samčím vývojem ("male-killing factor").

Na rozdíl od chromosomu W se chromosom Z svou sekvenční kompozicí více podobá autosomům. Pro chromosom Z je také charakteristická konzervovanost genomového obsahu, která je, až na výjimky, zachována napříč celým řádem Lepidoptera. V některých případech byly orthology některých genů, které se u *B. mori* nacházejí na chromosomu Z, lokalizovány na autosomech zkoumaných druhů motýlů (Beldade a kol., 2009; Nguyen, 2009; Kroemer a kol., 2011). Tato odhalení dokazují, že během evoluce karyotypu motýlů docházelo i k transpozicím a translokacím chromosomu Z a autosomů (shrnutí v Sahara a kol., 2012).

Geny lokalizované na chromosomu Z také podléhají tzv. efektu rychlejšího Z ("faster Z effect") (Mank a kol., 2010). Jejich rychlejší vývoj oproti genům nacházejícím se na autosomech může být zapříčiněn tím, že jsou tyto geny v samičím pohlaví v hemizygotním stavu, a tudíž mohou být jejich recesivní mutace vystaveny přímému selekčnímu tlaku. Mezi významné geny ležící na chromosomu Z patří například geny zodpovědné za regulaci feromonů a schopnost jejich rozpoznání. Dále jsou to geny související s pohlavím a velké množství genů, k jejichž expresi dochází pouze ve varlatech (shrnuje Sahara a kol., 2012).

Na rozdíl od savců a octomilky *Drosophila melanogaster* se systémem určení pohlaví XX/XY dochází u motýlích pohlavních chromosomů W a Z navzdory značné nehomologii během meiotické profáze k úplnému spárování (Weiht a Traut, 1986). Dochází k tzv. "twisting", kdy delší chromosom Z obtáčí kratší chromosom W a pomocí synaptonemálního komplexu se chromosomy spárují po celé své délce (Marec a Traut, 1994). WZ bivalent obvykle tvoří nejdelší chromosomový pár v genomu (Traut a Marec, 1997; Traut a kol., 1999; Fuková a kol., 2005; Yoshido a kol., 2005b).

### **1.1.2 Stabilita motýlích chromosomů**

Díky snadnému chovu a jeho dlouhé tradici, která umožnila nashromáždění velkého množství morfologických, biochemických a behaviorálních mutací, se bourec morušový, *Bombyx mori*, stal nejvýznamnějším motýlím modelem pro genetické a genomické studie (Goldsmith, 2010). Jeho domestikace započala už před více než 5000 lety a o jeho důležitosti není pochyb ani v dnešním moderním světě. Zatímco dříve jeho význam spočíval především v produkci hedvábí, dnes se uvažuje o jeho využití k produkci rekombinantních proteinů pro biomedicínské a farmakologické účely (Tomita a kol., 2002; Wurm, 2003; Tatematsu a kol., 2010).

V roce 2004 byla zveřejněna předběžná sekvence genomu *B. mori* (Mita a kol., 2004; Xia a kol., 2004). Následně byl metodou BAC-FISH sestaven karyotyp *B. mori*, ve kterém byly všechny chromosomy identifikovány specifickou kombinací hybridizovaných klonů BAC. Tato fyzická mapa umožnila přiřazení již známých vazebných skupin k jednotlivým chromosomům bource morušového (Yoshido a kol., 2005a; Yasukochi a kol., 2006). Ještě podrobnější analýzu genomu *B. mori* provedl Yamamoto a kol. (2008). Fyzickou mapu pokrývající 76% genomu bource integrovali s vazebnou mapou jednonukleotidových polymorfismů ("single nucleotide polymorphism", SNP). Výsledná mapa významně přispěla k sestavení genomu bource.

Osekvenovaný genom bource umožnil provedení srovnávacích studií u nemodelových druhů motýlů (Pringle a kol., 2007; Beldade a kol., 2009; d'Alençon a kol., 2010; Baxter a kol., 2011b; Yoshido a kol., 2011). První takovou studií bylo srovnání genomu bource s genetickou mapou neotropické babočky *Heliconius melpomene* ( $n = 21$ ) (Nymphalidae). Zástupci rodu *Heliconius* jsou významným modelem pro studium adaptivní radiace a evoluce mimetického zbarvení (Jiggins a kol., 2005; Joron a kol., 2006). Výsledky ukázaly zachovalou syntenii 72 genů i přes značnou divergenci obou druhů (cca. 100 milionů let dle molekulárních hodin) a rozdílné počty chromosomů (Pringle a kol., 2007).

Yasukochi a kol. (2009) vytvořil fyzickou mapu genomu oblíbeného modelu pro studium fyziologie a neurobiologie hmyzu, lišaje tabákového, *Manduca sexta* (Sphingidae). Porovnání karyotypu *M. sexta* ( $n = 28$ ) s genomem bource odhalilo jen několik chromosomálních přestaveb zahrnujících tři inverze, tři translokace a dvě fúze. I v tomto případě, byla tedy zjištěna vysoce konzervovaná syntenie genů včetně jejich pořadí (Yasukochi a kol., 2009). Oba tyto druhy jsou zástupci stejné nadčeledi, Bombycoidea, a mají shodný počet chromosomů,  $n = 28$ . Do této nadčeledi patří i martináč *Samia cynthia* (Saturniidae). *S. cynthia* má redukovaný počet chromosomů na  $2n = 25-28$ . Tato různorodost v počtu je způsobena proměnlivostí konstituce pohlavních chromosomů v různých geografických oblastech (Yoshido a kol., 2005b). Podle Yoshido a kol. (2011) jsou příčinou opakované fúze autosomů a pohlavních chromosomů. Přes odvozený karyotyp byla u *S. cynthia* pomocí srovnávacího mapování genů opět potvrzena překvapivá vnitřní stabilita genomů zástupců řádu Lepidoptera (Yoshido a kol., 2011). Beldade a kol. (2009) provedla vazebnou analýzu exprimovaných sekvencí ("expressed sequence tag", EST) u okáče *Bicyclus anynana* (Nymphalidae), modelového organismu evoluční vývojové biologie ("evo-devo"). Detailní genetická mapa obsahující 462 orthologních markerů opět prokázala značnou konzervovanost chromosomů motýlů. Stabilitu genomu napříč celým řádem Lepidoptera potvrdila i srovnávací analýza provedená u škůdce zápředníčka polního, *Plutella xylostella*, řazeného do nadčeledi Yponomeutoidea považované za bazální linii skupiny Ditrysia (Baxter a kol., 2011b). Tyto výsledky tak ukázaly, že osekvenovaný genom *B. mori* lze skutečně použít jako referenční ke srovnávacím a funkčním studiím jiných druhů motýlů. Přesto se neustále rozšiřuje počet dostupných genomových knihoven motýlů a díky klesajícím nákladům a novým sekvenačním metodám roste také počet probíhajících sekvenačních projektů zameraných na transkripty i celé genomy motýlů (Baxter a kol., 2011b; Robinson a kol., 2011; Vogel a kol., 2011; Zhan a kol., 2011; Dasmahapatra a kol., 2012).



## 1.2 Charakteristika obaleče jablečného, *Cydia pomonella*

Obaleč jablečný, *Cydia pomonella*, je hospodářsky významný škůdce z čeledi *Tortricidae*, který se z Euroasie během posledních dvou století spolu s produkcí jádrového ovoce rozšířil téměř po celém světě (Barnes, 1991). Jeho housenky způsobují tzv. červivost plodů, zejména jabloní a hrušní (Voudouris a kol., 2011). Dále mohou tyto hmyzí škůdci napadat meruňky a vlašské ořechy. Bez ochrany těchto zemědělsky a ekonomicky významných plodin mohou škody dosáhnout až 95% z celkového výnosu (Asser-Kaiser a kol., 2009). Z tohoto důvodu neustále roste snaha vědců a zemědělců o nalezení metod k potlačení obaleče jablečného.

### 1.2.1 Životní cyklus

Vývoj housenky prochází pěti larválními instary (L1–L5), z nichž L1 až L4 jsou si vzhledově velmi podobné. Housenky pátého (posledního) instaru jsou 14–18 mm dlouhé, růžového zbarvení s hnědou hlavou (Novák a Severa, 2002). Zimu přečkávají v pevných zámotcích pod kůrou stromu, opadance či v trhlinách. Během jara se kuklí a od poloviny května vylétají první dospělí motýli. Imago je přibližně 1 cm velké s rozpětím křídel dosahujícím 2 cm. Přední pár křídel je popelavě šedý s příčnými tmavými pruhy, zadní křídla jsou popelavě šedého zbarvení (Obr. 1). Imago je aktivní za soumraku a při teplotě kolem 12°C, páření dospělců probíhá při více jak 15°C a kladení vajíček na listy či plody při teplotě 16°C a vyšší. Samice klade přibližně 80 až 120 vajíček. Housenky vylíhlé z vajíček zhruba po týdnu vyhledají plod a pronikají do něj. Nejprve se drží těsně pod slupkou, ale jakmile dosáhnou druhého instaru, vytváří si chodbičky vyplněné trusem, které vedou přímo k jádřinci. Jakmile housenka doroste do pátého instaru, vyleze z plodu a hledá vhodné místo k přezimování. V oblastech s vyšší teplotou, jako je například střeoevropský region, vytváří i druhou generaci (Hluchý a kol., 1997; Pemsel a kol., 2010). Tu tvoří předčasně zakuklené housenky první generace, které neupadly do diapauzy. V některých velmi teplých oblastech může obaleč vytvořit až čtyři generace ročně (Asser-Kaiser a kol., 2010). Jedna housenka obaleče jablečného poškodí, a tím i znehodnotí, za svůj život až tři plody. U mladých plodů způsobí jejich předčasný opad. U později napadených plodů dojde k jejich výraznějšímu zbarvení, snížení kvality i chuti. Takové poškození plodů může být příčinou sekundárního napadení, především houbovými chorobami, např. moniliovou hnilobou jádrovin (*Monilinia fructigena*). Mykotoxiny, tj. sekundární metabolity těchto hub, kontaminující plody během vegetace, sklizně, skladování či zpracování představují vážné riziko celosvětového měřítka,

neboť ohrožují bezpečnost potravin, a tím mají negativní ekonomický vliv na zemědělství a zpracovatelský průmysl (Prugar a kol., 2008).



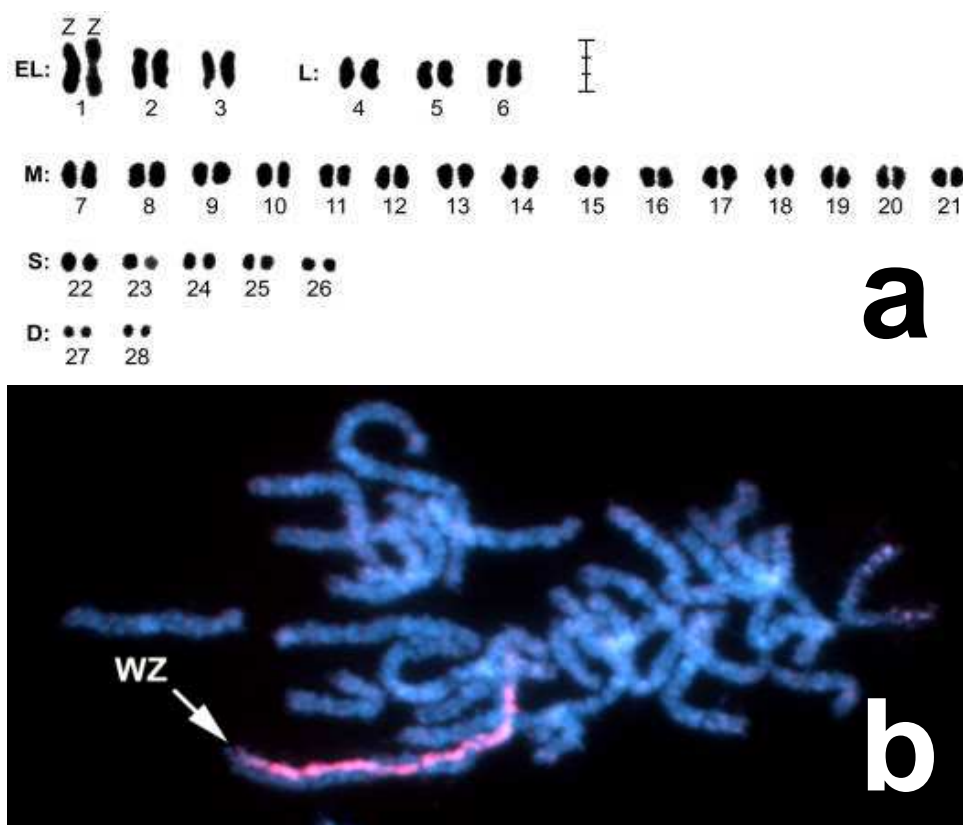
**Obr. 1:** Dospělý jedinec obaleče jablečného. Fotografie: Alexandr Pospěch.

### 1.2.2 Cytogenetika obaleče jablečného

Genom obaleče jablečného byl detailně charakterizován teprve nedávno. První cytogenetická studie určila haploidní počet chromosomů obaleče  $n = 28$  (Ortiz a Templado, 1976). Fuková a kol. (2005) provedli detailní analýzu karyotypu tohoto významného škůdce zaměřenou především na jeho pohlavní chromosomy. Preparáty mitotických spermatogonií larev potvrdily, že komplement obaleče sestává z  $n = 28$  elementů uniformního tvaru. Chromosomy byly rozděleny do pěti skupin uspořádaných podle velikosti (Obr. 2a). Největším chromosomem je chromosom Z. N preparátech pachytenních jader samic i samců byl pozorován bivalent, na jehož koncích nedocházelo k úplné synapsi. Barvení stříbrem a následná FISH s rDNA sondou, prokázalo, že se jedná o oblasti organizátorů jádérka ("nucleolus organizer region", NOR).

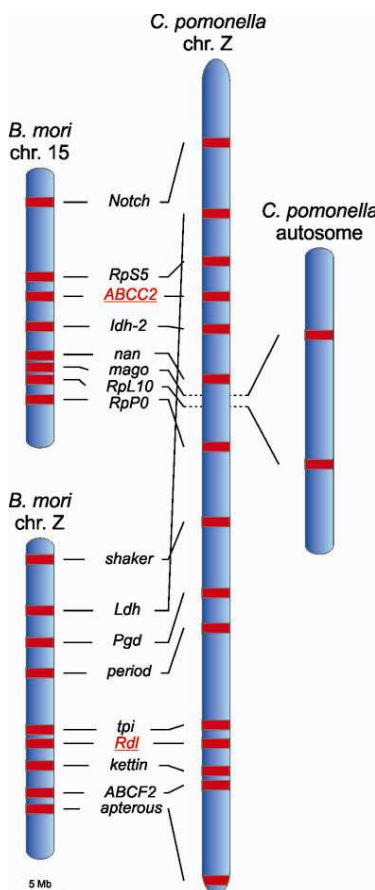
Ve vysoce polyploidních jádrech somatických buněk samic byla detekována pohlavně specifická heterochromatinová tělíska indukující chromozomální systém určení pohlaví WZ/ZZ typický pro většinu zástupců řádu Lepidoptera (Traut a Marec, 1997; Lukhtanov, 2000). Bivalent WZ byl ve fázovém kontrastu v pachytenním jádře identifikován podle heterochromatinové struktury chromosomu W naznačující jeho repetitivní složení. Ta byla potvrzena metodami CGH a GISH (Obr. 2b) (Fuková a kol., 2005) a FISH s W-specifickými malovacími sondami získanými laserovou mikrodisekcí (Fuková a kol., 2007). Klonování a sekvenování fragmentů DNA získaných mikrodisekcí W-specifického heterochromatinu

identifikovalo sekvence čtyř typů: (i) sekvence unikátní nebo s malým počtem kopií vázané výhradně na chromosom W, (ii) sekvence s malým počtem kopií vyskytující se na chromosomu W i Z, (iii) sekvence s velkým množstvím kopií vyskytující se v celém genomu, ale obohacené na chromosomu W a (iv) všudypřítomné sekvence s velkým množstvím kopií nacházející se především na autosomech (Fuková a kol., 2007). Takto získaná W-specifická sekvence CpW2 posloužila později jako molekulární marker pro určení samičího pohlaví vajíček nebo raných larválních instarů (Fuková a kol., 2009).



**Obr. 2:** Karyotypová analýza obaleče jablečného. (a) Karyotyp samce obaleče jablečného sestavený ze spermatogoniálních metafázních chromosomů. Chromosomy jsou seřazené podle velikosti: EL - extra velké, L - velké, M - středně velké, S - malé, D - tečkovitého tvaru. Chromosom Z je největším elementem v komplementu. Měřítko - 3  $\mu\text{m}$ . Převzato a upraveno z Fuková a kol. (2005). (b) Genomová *in situ* hybridizace (GISH) na samičích chromosomálních preparátech. Chromosomy byly podbarveny DAPI. Samičí sonda označená Cy3 (červená) zvýraznila chromosom W. Pachytenní bivalent WZ (označen šipkou) je spárován po celé délce. Chromosom W se obtáčí okolo delšího chromosomu Z. Převzato a upraveno z Marec a kol. (2007).

Díky dostupnosti genomové BAC knihovny obaleče jablečného bylo možné sestavit fyzickou mapu jeho chromosomu Z. První výsledky ukázaly zachovanou syntenii i pořadí genů vázaných na chromosom Z mezi obalečem jablečným a bourcem morušovým (Nguyen, 2009). Sýkorová (2011) testovala hypotézu o možné translokaci genu pro acetylcholinesterázu 1 (*Ace-1*), jejíž mutace jsou zodpovědné za resistenci škůdců k organofosfátovým a karbamátovým insekticidům, na pohlavní chromosom Z obaleče jablečného (Heckel a kol., 1998). Pomocí kvantitativní PCR a Southernovy hybridizace se jí podařilo potvrdit vazbu *Ace-1* na pohlavní chromosom Z obaleče (Sýkorová, 2011). Další důkaz o této chromosomální přestavbě přinesl ve své práci Kůta (2011). Ten pomocí kvantitativní PCR a přímého fyzického mapování ukázal, že také gen *Notch* leží v genomu obaleče jablečného na chromosomu Z. Oba tyto geny se přitom v referenčním genomu bource morušového nachází na chromosomu 15. Podrobné fyzické mapování metodou BAC-FISH potvrdilo syntenii všech genů vázaných na původní chromosom Z a jeho fúzi



s chromosomem 15 (Obr. 3). Dále odhalilo delecii o rozsahu asi 0,5 – 2,8 Mbp jejíž osud zůstává nejasný a je předmětem dalšího výzkumu. Studium příbuzných druhů obalečů také ukázalo, že k popsané chromosomální přestavbě došlo přinejmenším u společného předka skupiny Olethreutinae (Nguyen a kol., 2012).

**Obr. 3:** Schématický přehled pohlavního chromosomu Z obaleče jablečného (**Cp Chr.Z**), který vznikl fúzí chromosomů odpovídajících Chr. Z (**Bm Chr.1**) a Chr. 15 (**Bm Chr.15**) bource morušového. Delece o velikosti 5 Mbp mezi geny *Ace-1* a *IDH2* není vyznačena. Pořadí genů zůstalo s výjimkou *Ldh* zachováno. Převzato a upraveno ze Sýkorová a kol., 2011.

## Metody ochrany ovoce proti obaleči jablečnému

Světovým trendem je získávání ovoce s kvalitními organoleptickými vlastnostmi, jako je chuť, vůně a struktura. Důležitými předpoklady jsou také jeho schopnost přepravy a skladování. Mezi nejdůležitější jakostní znaky ovoce patří vybarvení plodů, křehkost a čerstvost. Normy ČSN 46 3010 a ON 46 3012 určují základní požadavky na jakost jádrového ovoce (Prugar a kol., 2008). Pro různé druhy jádrového ovoce jsou důležité charakteristické rysy dané odrůdy, např. chuť a vůně, které mohou být napadením škůdcem ovlivněny. Plody, které jsou sevrklé, vrásčité a s nepevnou konzistencí se vylučují. Zdravotní stav plodů se posuzuje vizuálně. Jádroviny napadené hmyzem, hnilobou, plísní či s velkým podílem strupovitosti jsou nepřijatelné. Samozřejmě existuje několik způsobů, jak se škůdci, jako je obaleč jablečný, bojovat. Do nepřímé ochrany se řadí (i) alespoň 100 metrová prostorová izolace od líhnišť motýlů jako jsou zahrady, sklady ovoce apod., (ii) podpora přirozeně se vyskytujících nepřátel např. lumků, lumčků, chalcidek a sýkor, nebo (iii) použití tzv. lapacích pásů, které se přikládají na kmeny stromů a slouží k odchytu dorostlých housenek (Hluchý a kol., 1997). Mezi metody přímé ochrany patří účinné chemické postřiky. Díky tlaku světového trhu ale jejich používání klesá, neboť mohou poškozovat životní prostředí a potenciálně, v podobě reziduí v plodech, také lidské zdraví. Používání insekticidů také časem vede ke vzniku rezistencí, např. vůči nejhojněji využívaným organofosfátům a pyretroidům (Varela a kol., 1993; Knight, 1994), Proto se neustále vyvíjejí nové prostředky a technologie, které by splňovaly požadavky jak zdravotní, tak ekologické. V současné době se využívá například metoda narušení páření pomocí feromonů (Moffit a Westigard, 1984). Ta je však účinná pouze za určitých podmínek a u populací s nízkým počtem jedinců. Další zajímavou technikou je vypouštění sterilního hmyzu "sterile insect technique", SIT). Tato metoda je založena na sterilizaci průmyslově pěstovaného hmyzu pomocí ionizačního záření. Hmyz je poté vypuštěn do sadů, kde se samci páří s divokými samičkami. Vzhledem k vážnému poškození DNA spermií však není jejich potomstvo životaschopné. Tím dochází k zastavení růstu populace škůdce (Azizyan a kol., 2010; Vreysen a kol., 2010; Vreysen a Robinson, 2010). Dále se aplikuje bakteriální postřik *Bacillus thuringiensis*, který je nejdůležitějším bakteriálním patogenem využívaným v biologické kontrole. Jeho účinnost je však značně snížena krátkým životem škůdce. Mezi další způsoby patří entomopatogenní hlístice, které mohou být, kvůli svým nárokům na vlhkost a omezené schopnosti disperze, použity jen pro boj proti listovým škůdcům. Podobná omezení má i využití entomopatogenních hub, jejichž perspektiva spočívá především v kontrole půdních škůdců (Cross a kol., 1999).

### 1.2.3 Metoda ochrany ovoce pomocí CpGV

Virus granulózy obaleče jablečného ("*Cydia pomonella* granulovirus", CpGV), který je sadaři využíván zejména díky své vysoké selektivitě, velké virulenci a šetrnosti k životnímu prostředí, patří mezi nejvýznamnější kontrolní bioagens obaleče jablečného v organickém farmaření (Asser-Kaiser a kol., 2009). Viry granulóz jsou skupinou virů napadající výhradně zástupce řádu Lepidoptera. Patří do čeledi Baculoviridae, pro kterou je charakteristický kulovitý tvar s kruhovou dvouvláknovou DNA, jejíž délka se pohybuje v rozmezí 100 až 180 kbp (Jehle a kol., 2006). Jednotlivá okluzní tělíska ("occlusion body", OB) uzavírají vždy jeden virion tyčinkového tvaru („occlusion derived virion“, ODV). Nově narozené larvy orálně přijmou letální koncentraci viru z povrchu kontaminovaných listů a plodů. Trávicí soustavou se virus dostane až do středního střeva, kde se granulinový obal rozpustí díky alkalickému pH (Jehle a kol., 2006). Následně uvolněné viriony projdou peritrofickou membránou a splynou s mikrovily epitelu středního střeva. Po vstupu do buňky jsou viriony transportovány k jaderné membráně. Genom viru pronikne jaderným pórem přímo do jádra, kde dochází k jeho replikaci. Viriony dále pronikají do hemocoelu přes bazální laminu (Hess a Falcon, 1987). Odtud se infekce šíří přes hemolymfu a tracheální spoje tkání do tukového tělesa, tracheálních buněk, hypodermis a malpigických trubic. Infikovaná larva je zpočátku lesklá a přestává přijímat potravu. V terminální fázi infekce má mléčné zbarvení a tělo začíná postupně kapalnět. Čas, za který CpGV způsobí smrt jedince, je ovlivněn koncentrací okluzních tělísek v přípravku a také larválním stádiem obaleče, který virus pozře (shrnuto v Lacey a kol., 2008).

Značná výhoda aplikace CpGV spočívá v jeho vysoké specifitě. Okruh hostitelů CpGV je tvořen, mimo obaleče jablečného, i jinými druhy obalečů, u kterých je však značně snížena jeho virulence. Jiné druhy hmyzu ani obratlovci tedy nejsou postřikem CpGV ohroženi (shrnuto v Lacey a kol., 2008). Určitou nevýhodou aplikace CpGV je mělký žír způsobený larvou obaleče. Jeho vznik je však nevyhnutelný, neboť u larvy musí dojít ke kontaktu s ošetřeným plodem. Po aplikaci CpGV však postupně se snižující se populací obaleče ubývá i množství žírů. Druhá nevýhoda spočívá v nutnosti častého opakování postřiku s CpGV, která je nutná kvůli populačnímu tlaku obaleče, ale také díky inaktivaci viru slunečním zářením (Lacey a kol., 2008). Aby bylo tedy dosaženo nejvyšší možné účinnosti CpGV musí být předem promyšlena velikost dávky, frekvence a načasování aplikace viru a brán v potaz počet generací obaleče jablečného a přírodní podmínky. Ročně je tímto způsobem chráněno 2 až 3 milionů hektarů obhospodařované plochy (Asser-Kaiser a kol., 2007).

K výrobě komerčních přípravků na ochranu sadových stromů je nezbytná stálá produkce značného množství CpGV. To je připravováno například zpracováním larev, které zemřely na následky infekce CpGV, a tudíž v těle obsahují virové částice, které je možné extrahovat. Druhým způsobem je replikace CpGV *in vitro* (shrnutí v Lacey a kol., 2008). V současné době je v Evropě a USA registrováno pět typů přípravků s obsahem CpGV. Koncentrace viru je ve všech komerčních přípravcích v rozmezí 1 - 3,4 x 10<sup>13</sup> OB/L. Všechny přípravky vzniklé před rokem 2000 obsahují mexický izolát viru s označením CpGV-M. Novější přípravky obsahují izoláty z Kanady, Anglie a Íránu (shrnutí v Lacey a kol., 2008).

#### **1.2.4 Rezistence obaleče jablečného proti CpGV**

CpGV byl hojně využívaným, účinným a spolehlivým prostředkem pro ochranu plodů jabloní před obalečem jablečným. Tedy až do roku 2002, kdy byl v německých sadech zaznamenán pokles jeho účinnosti. Od té doby byl stejný pokles zaznamenán i ve Francii, Itálii a dalších zemích Evropy (Berling a kol., 2009b). Mezi lety 2003–2006 byl ve třinácti organických sadech v jižním Německu, které ohlásily neuspokojivé výsledky aplikace CpGV, proveden systematický průzkum. Ten potvrdil vznik rezistence obaleče jablečného k CpGV (Asser-Kaiser a kol., 2007; Eberle a kol., 2008). Asser-Kaiser a kol. (2007) provedla biologické testy na třinácti populacích obaleče jablečného z již zmiňovaných sadů z Německa. Byly stanoveny střední letální koncentrace (L<sub>50</sub>), které u 11 populací ukázaly 1000krát a u zbylých dvou dokonce 10 000krát nižší citlivost k CpGV ve srovnání se senzitivními volně žijícími i laboratorně chovanými housenkami. Z jedné resistantní populace byla založena linie CpR se 100krát vyšší rezistencí k viru ve srovnání se senzitivní linií CpS. Ukázalo se však, že linie CpR stále obsahovala i senzitivní jedince. Proto bylo potomstvo jednotlivých párů vystaveno selekčnímu tlaku diskriminující koncentrace CpGV. Z potomstva vykazujícího nulovou mortalitu byly sestaveny jednotlivé chovné páry. Po dalším kole selekce CpGV byla z potomstva čtyř rodin s nulovou mortalitou založena rezistentní linie CpRR1. Také nezávislé studium resistantní populace ve Francii odhalilo více jak 13 000x sníženou citlivost k CpGV (Berling a kol., 2009a). Také z této populace byla získána laboratorní linie, jejíž citlivost k CpGV byla snížena 60 000x (Berling a kol., 2009a).

Dědičnost rezistence vůči CpGV byla určena křížením jednotlivých párů sestavených z linií CpS a CpRR1. Výsledky ukázaly, že rezistence je kódována jediným genem, který se nachází na pohlavním chromozomu Z obaleče jablečného. Dominance alel tohoto genu, který nebyl doposud identifikován, je závislá na koncentraci použitého CpGV. U

heterozygotních samců s konstitucí  $Z^RZ^S$  se alela chová při nízké koncentraci viru jako dominantní a při vysoké koncentraci viru jako recesivní (Asser-Kaiser a kol., 2007). Mechanismus dědičnosti rezistence je stejný bez ohledu na stupeň rezistence dané populace obaleče (Asser-Kaiser a kol., 2010). Díky tomu, že se rezistence vyskytuje na chromosomu Z, dochází k jejímu šíření v populaci rychleji, než kdyby byla lokalizována na autosomu. To je způsobeno tím, že u samic motýlů, určených chromosomální konstitucí WZ, nedochází k překrytí prospěšné recesivní mutace standardní alelou a je tudíž vystavená selekčnímu tlaku (Vicoso a Charlesworth, 2006).

Rezistentní jedinci si tedy vyvinuli mechanismus, který je před virovou letální infekcí ochrání ve všech pěti larválních instarech (Eberle a kol., 2008). Asser-Kaiser a kol. (2011) zjistila, že mechanismus rezistence spočívá v inhibici replikace viru v raném stádiu infekce. CpGV se šíří po těle obaleče, ale není schopen replikace v jakékoliv buňce. Také byla odhalena vysoká specifita mechanismu rezistence, neboť housenky linie CpRR1 byly schopné blokovat virus CpGV-M, ale ne virus z Íránského izolátu CpGV-I12 (Eberle a kol., 2008).

V současné době bylo v několika zemích Evropy zaznamenáno více než 35 sadových populací obaleče jablečného vykazujících rezistenci vůči přípravkům na bázi CpGV-M (Asser-Kaiser, 2007). Ta byla patrně způsobena častou a nadměrnou aplikací postřiků obsahujících jediný izolát viru ze severního Mexika (CpGV-M), který byl poprvé nasbírán a popsán v roce 1964 (Asser-Kaiser a kol., 2007, 2010). Z toho důvodu je zapotřebí získat alternativní izoláty viru, které zpomalí vznik a šíření rezistence v populacích obaleče jablečného. Jedním z nich je izolát získaný v Quebecu (Kanada) pojmenovaný CpGV-S, který je obsažen v komerčním přípravku VirosoftCP4 (Eberle 2010). Rezapanah a kol. (2002) charakterizoval velký počet izolátů CpGV z infikovaných housenek z Íránu. Tyto izoláty v provedených testech prokázaly biologické i genetické odlišnosti ve srovnání s CpGV-M. Některé z nich by tedy mohly sehrát důležitou roli v kontrole rezistentních populací (Rezapanah a kol., 2008).



## 2 Cíle práce

V současné době jsou známy příčiny vzniku rezistence obaleče jablečného vůči CpGV, její mechanismus i dědičnost. Doposud však přes nemalé úsilí několika vědeckých skupin nebyl přesně lokalizován a identifikován gen za rezistenci zodpovědný. Cílem této práce je především přispět k nalezení genetické podstaty rezistence vůči CpGV pomocí vazebného mapování. Dílčí cíle této práce zahrnují:

- Izolaci intronových sekvencí z genomové DNA obaleče jablečného u linie citlivé k CpGV (Krym-61) a linie vůči CpGV rezistentní (CpRR1).
- Porovnání sekvencí získaných z obou linií a identifikace polymorfismů využitelných pro vazebné mapování CpGV rezistence.
- Detekci nalezených polymorfismů pomocí denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE) a restrikčního štěpení PCR produktů.
- Návrh vazebného mapování CpGV rezistence na chromosomu Z obaleče jablečného.

### **3 Materiál a metody**

#### **3.1 Materiál**

Pro identifikaci a detekci polymorfismů byly použity linie obaleče jablečného CpRR1 a Krym-61. Linie CpRR1 obaleče jablečného rezistentní k CpGV-M byla poskytnuta Dr. Johannesem Jehlem (Julius Kühn-Institut, Darmstadt, Německo). Podrobnosti o linii CpRR1 viz kap. 1.2.5. Linie Krym-61 obaleče jablečného byla na našem pracovišti založena ze vzorku laboratorního chovu udržovaného v laboratoři I. Hrdého v Institutu organické chemie a biochemie AV ČR v Praze od roku 1991. Linie pochází z divoké populace nasbírané v roce 1961 na Krymském poloostrově v Rusku a adaptované na umělou výživu (Fuková a kol., 2005).

#### **3.2 Izolace DNA**

Genomová DNA byla izolována z housenek pozdějších larválních instarů a dospělých samic a samců z jednotlivých linií pomocí komerčního kitu DNeasy® Blood & Tissue kitu (Qiagen) dle návodu výrobce. Koncentrace jednotlivých vzorků DNA byla stanovena spektrofotometrem Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

#### **3.3 Polymerásová řetězová reakce**

Kódující sekvence (CDS) studovaných genů vázaných na chromosom Z byly převzaty z prací Sýkorová (2011) a Nguyen a kol. (2012) (Tab. I). Pozice intronů byla určena porovnáním CDS obaleče jablečného a genů bource morušového pomocí aplikace blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Pro izolaci intronových sekvencí z obou linií obaleče jablečného byly použity specifické primery převzaté nebo navržené pomocí volně dostupného programu Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>; Rozen a Skatelsky, 2000) (Tab. I). Specifity PCR produktů bylo dosaženo optimalizací teploty nasedání použitých primerů ( $T_A$ ).

Každá PCR reakce standartně obsahovala 25 ng gDNA, 1 x Ex *Taq* pufr, 0,2 mM dNTPs mix, 1  $\mu$ M primery a 0,05 U/ $\mu$ l Ex *Taq* Hot Star polymerázy (Takara, Otsu, Japonsko).

**Tab. I:** Přehled převzaných sekvencí obaleče jablečného vázaných na chromosom Z a použitých specifických primerů.

Gen	Název primeru	Sekvence primeru	Produkt	Intron	T <sub>A</sub>	GenBank ID <sup>a</sup>	Původ
<i>diacylglycerol kináza</i>	DGK_sts_F01	5'-ACGTATACCGCTGCCAGAAC-3'	300 bp	80 bp	59 °C	JQ771347	Dalíková, nepublikováno
	DGK_intronR1	5'-CTTCTGCAAATTGATGAGGCGG-3'					
<i>nanchung</i>	NAN_intronF1	5'-CAGAATGGTGTGGGTGACTTGC-3'	520 bp	270 bp	63°C	JQ771346	Dalíková, nepublikováno
	NAN_intronR1	5'-AGCTTCTATCTCGTGGTCGGTGC-3'					
<i>dynamín</i>	DYN_stsF01	5'-CTATTGAGGGTTCCGGCTCT-3'	630 bp	320 bp	63°C	JQ771349	Dalíková, nepublikováno
	DYN_intronR1	5'-TCTCAGTGCAGATGCGGACGAC-3'					
<i>thioredoxin</i>	TRX_intronF1	5'-ACTCTGTGAAGATCAAGGGTCC-3'	750 bp	460 bp	59°C	JQ771345	Dalíková, nepublikováno
	TRX_intronR1	5'-TGAACTCGCCCATGTTGGTAGTGG-3'					
<i>ribosomální protein S23</i>	RpS23_intronF1	5'-TGGTGCATCACACGCTAAGGGCA-3'	2500 bp	2400 bp	63°C	JQ771359	Dalíková, nepublikováno
	RpS23_intronR1	5'-GGATGGCGGAGTTGGGCTGTTTGG-3'					
<i>růstový faktor Idgf</i>	CpIDGFint2_F1	5'-TGGTGTAAAGGACCAGCTTCA-3'	<2000 bp	<2000 bp	59°C	n/a	tato práce
	CpIDGFint2_R1	5'-GATTACACCGCCCAATCTA-3'					
<i>shaker</i>	CpShkrInt1_F1	5'-CCTTCGACGCAATCCTCTAC-3'	400 bp	200 bp	66°C	JQ771337	tato práce
	CpShkrInt1_R1	5'-GTCGTTTCGTTTGAAGGGAGA-3'					
<i>shaker</i>	CpShkrInt2_F1	5'-GGGACGAACATGAAAGCAT-3'	<2500 bp	<2500 bp	63°C	JQ771337	tato práce
	CpShkrInt2_R1	5'-TGAAGTTGGAGACGATGACG-3'					
<i>GABAreceptor</i>	CmGABAr_sts2F	5'-GTCCATGGGATACTACCTAATCCA-3'	530 bp	330 bp	57°C	JQ771335	Nguyen a kol., 2012
	CmGABAr_st2R	5'-CTACACCATGCGGGACATC-3'					
<i>L-laktát dehydrogenáza ABC</i>	CmLDH_sts1F	5'-GCAAGTCCATCATCTCGCCCT-3'	550 bp	400 bp	63°C	JQ771341	Nguyen a kol., 2012
	CmLDH_sts1R	5'-AGTACATCGGTGTTGCGCTG-3'					
<i>transportér F2</i>	CmATPbc_sts1F	5'-CTCAAGACCAGCTAATGGACGTG-3'	1000 bp	750 bp	67°C	JQ771334	Nguyen a kol., 2012
	CmATPbc_sts1R	5'-CCACACTTGCTACTGCTGGACGA-3'					

<sup>a</sup> Identifikační číslo částečených sekvencí genů obaleče jablečného zveřejněných ve veřejné databázi GenBank. **n/a** - sekvence dosud nebyla zveřejněna.

Geny byly amplifikovány v termocyklérech Mastercycler ep gradientS (Eppendorf), XP Thermal cycler (Bioer Technology Co., Ltd) a Biometra® Tpersonal (Scholler instruments s.r.o.). Teplotní profil sestával z počáteční denaturace při teplotě 94 °C trvající 3 minuty a třiceti cyklů denaturace při 94 °C o délce 30 sekund, nasedání primerů trvající 30s (teplota nasedání pro jednotlivé páry primerů viz Tab. I) a syntézy při teplotě 72°C. Doba syntézy byla závislá na očekávané délce produktu. Závěrečná syntéza probíhala 5 minut při teplotě 72°C.

### 3.4 Gelová elektroforéza

Na 1,5% agarózový gel v 1x TAE bylo naneseno 1 µg markeru 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, Carlsbad, USA) v 4x nanášecím pufru (50% glycerol, 0,4% bromfenolblue, 250 mM EDTA) a po 10 µl PCR produktů v 1x nanášecím pufru. Gel byl obarven v roztoku 1x GelRed (Biotium, Hayward, USA) v 1x TAE a vizualizován pomocí elektronického UV transluminátoru Alphamager MINI Cell Bioscientis (Ultra Lum, Inc.) napojeného na digitální kameru. V případě přítomnosti jediného produktu byl zbytek PCR reakce přečištěn pomocí kitu Wizard® SV Gelard PCR Clean-Up Systém (Promega, Madison WI, USA) dle návodu výrobce. Pokud byly přítomny nespecifické produkty, byl příslušný DNA fragment vyříznut z gelu a extrahován pomocí kitu Wizard® SV Gelard PCR Clean-Up Systém (Promega, Madison, WI, USA) dle návodu výrobce. Výsledné koncentrace vzorků byly stanoveny na spektrofotometru Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

### 3.5 Klonování

Jednotlivé geny byly ligovány do vektoru Promega pGEM T Easy Vector (Promega, Madison, WI, USA) dle doporučení výrobce. Jednotlivé ligační směsi obsahovaly 50 - 150 ng PCR produktu, 50 ng vektoru, 3 U/µl T4 ligázy a 1 x ligační pufr. Objem reakce se pohyboval v rozmezí 10 - 30 µl podle koncentrace daných produktů. Ligace probíhala při teplotě 4 °C přibližně 14 hodin. Poté byla provedena transformace chemicky kompetentních buněk *E. coli* kmene DH5α teplotním šokem (tzv. "heat shock") dle doporučení výrobce. Transformované buňky byly vysety na plotnu s 1,5% LB agarem s 100 µg/ml ampicilinu, 350 µM IPTG a 35 mg/ml X-Gal. Narostlé kolonie nesoucí insert byly přeočkovány na novou plotnu. Přítomnost plasmidů s požadovaným insertem byla

ověřena pomocí PCR s M13 univerzálními primery. Pozitivní klony byly inokulovány do 5 ml tekutého LB média se 100 µg/ml ampicilinu a inkubovány po dobu 15 hodin v třepačce za teploty 37 °C. Izolace plasmidů byla provedena pomocí kitu NucleoSpinPlasmid (Macherey – Nagel, Düren, Německo) podle návodu výrobce. Koncentrace vzorků byla změřena na spektrofotometru Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

### 3.6 Sekvencování

Získaná plasmidová DNA byla osekvenována v Laboratoři genomiky Biologického centra AV ČR s použitím M13R a M13F univerzálních primerů. Sekvence vektoru byly detekovány ve volně dostupné aplikaci NCBI VecScreen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) a následně odstraněny. Jejich identita byla potvrzena pomocí nástroje blastn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sekvence byly upraveny a zpracovány v programu BioEdit Sequence Alignment Editor (Ibis Biosciences, Carlsbad) a programu MagAlign (DNASTAR, Wisconsin, USA). Přítomnost polymorfismů byla odhalena porovnáním sekvencí daného produktu z linií Krym – 61 a CpRR1 také v programu BioEdit.

### 3.7 Restrikční štěpení PCR produktů

V programu BioEdit byly vytvořeny pro sekvence jednotlivých linií restrikční mapy. Porovnáním těchto map byly vybrány SNP v cílových místech restrikčních enzymů. Restrikční enzymy byly zvoleny tak, aby štěpily odlišně u obou linií a aby výsledné fragmenty bylo možno rozpoznat na agarózovém gelu. Použité restrikční enzymy s charakteristickou cílovou sekvencí a příslušným pufrem jsou uvedeny v Tab. II.

Jednotlivé štěpící reakce obsahovaly 500 ng PCR produktu, 1x pufř a 10 U/µl restrikčního enzymu. K vybraným enzymům bylo přidáno 100 µg/ml bovine serum albumin dle doporučení výrobce (viz Tab. II). Štěpící reakce standardně probíhala 1 hodinu při teplotě 37 °C u všech enzymů. Výjimkou byl enzym *FatI*, jehož teplotní optimum je 55 °C. Výsledek byl vizualizován na 2% agarózového gelu.

**Tab. II:** Přehled použitých restriktčních enzymů a jejich charakteristických znaků.

Gen	Restriktáza	Štěpící místo	Pufř
<i>thioredoxin</i>	<i>BspHI</i>	5' TGATCA 3'	1x NEBuffer 4
<i>nanchung</i>	<i>HpaII</i>	5' CCGG 3'	1x Tango
<i>dynamin</i>	<i>NruI</i>	5' TCGCGA 3'	1x Buffer O
<i>ABC transportér F2</i>	<i>FatI</i>	5' CATG 3'	1x NEBuffer 2

### 3.8 Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

Pro detekci polymorfismů pomocí DGGE byl vybrán gen *thioredoxin* na základě výskytu několika SNP a možné přítomnosti krátké inserce či delece v sekvencích rezistentní a citlivé linie a gen *dynamin* na základě přítomnosti několika SNP a vhodné délce sekvence. Primery pro DGGE byly navrhovány v programu FastPCR (Kalendar a kol., 2011). Forwardové primery se vyznačovaly přítomností tzv. "CG svorky" (5'-CGCCCCG-CGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCCG-3'), jejíž funkce spočívá v udržení DNA ve dvouřetězcové formě díky velkému množství vodíkových můstků mezi CG páry. Dvojice použitých forwardových a reverzních primerů jsou zaznamenány v Tab. III.

**Tab. III:** Přehled primerů použitých pro DGGE.

Gen	Název primeru	Sekvence primeru	Produkt	T <sub>A</sub>
<i>thioredoxin</i>	TrxDGGEF1*	5'-GTCTGTGAAGATCAAGGGTCCCGCT-3'	400 bp	57°C
	TrxDGGER1	5'-CCGAGAGGTTTGACTGCCCATATTTG-3'		
	TrxDGGEF2*	5'-GGAAACATGCATATCATCACAACACCTC-3'	500 bp	
	TrxDGGER2	5'-TGAACCTCGCCCATGTTGGTAGTGG-3'		
<i>dynamin</i>	CpDGGE_Dyn_F1*	5'-GTCCACGCACTTGAGGCACG-3'	520 bp	61°C
	CpDGGE_Dyn_R1	5'-CAAGATGGAGTTCGACGAGAAGG-3'		

\*CG – svorka, 5'-CGCCCCGCGCCCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCCG-3'

Intronové sekvence *thioredoxinu* a *dynaminu* byly amplifikovány pomocí PCR (viz kap. 3.3.2). Pro zvýšení specifity reakce do ní bylo přidáno 0,01 mg/ml 100x BSA.

Dále byly smíchány amplikóny z rezistentní i citlivé linie v poměru 1:1. Pro vytvoření heteroduplexu byla DNA denaturována 5 minut při 94°C a renaturována: (i) při 55 °C 50 minut (Dalíková M, Blažková B; ústní sdělení), (ii) při 4 °C 60 minut (Beaufils a kol., 2012). Těmito způsoby byl vytvořen heteroduplex pro analýzu polymorfismů metodou DGGE.

Pro přípravu gradientového polyakrylamidového gelu byly připraveny zásobní roztoky I (0,15 g/ml akrylamid, 0,02 g/ml bisakrylamid v 1x TAE) a II (0,15 g/ml akrylamid, 0,02 g/ml bisakrylamid, 0,336 g/ml močovina a 0,32 % formamid v 1x TAE). Ty byly poté

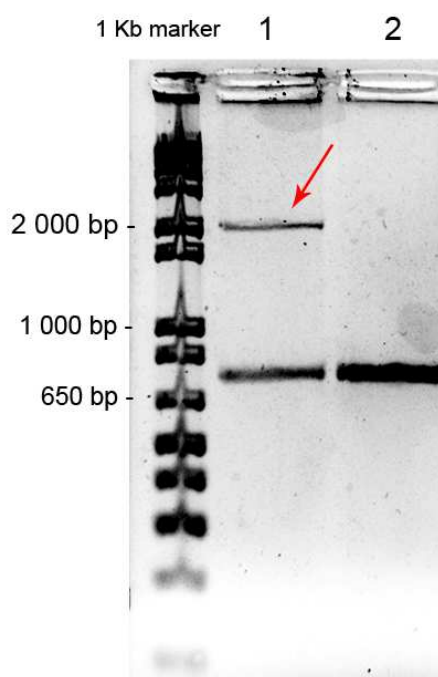
použity k vytvoření různých koncentračních gradientů polyakrylamidového gelu. Ke každému z těchto roztoků byly přidány polymerizující látky a to 5,72 mM N,N,N',N'-tetramethylethylendiaminu a 2,25  $\mu$ M persulfátu amonného.

Separace probíhala v elektroforéze TV400-DGGE (SCIE-PLAS) v 1x TAE pufru při teplotě 60 °C při napětí 230 V přibližně 4,5 hodiny. Poté byl gel barven pomocí 0,2 ng/ml ethidium bromidu v 1x TAE pufru. Dokumentace byla provedena pomocí elektronického UV transluminátoru Alphamager MINI Cell Bioscientis (Ultra Lum, Inc.) napojeného na digitální kameru.

## 4 Výsledky

### 4.1 Izolace intronových sekvencí

V této práci byly použity dvě linie obaleče jablečného, linie Krym-61 senzitivní k CpGV a rezistentní linie CpRR1 vykazující 100x sníženou citlivost k CpGV (Asser-Kaiser a kol., 2007). Z vyizolované genomové DNA jedinců obou linií bylo celkem získáno 11 intronových sekvencí (viz Příloha 1). Po vzájemném porovnání byly identifikovány jednonukleotidové polymorfismy u 10 dvojic intronových sekvencí. Sekvence genu *diacylglycerol kinázy* byly zcela identické. V sekvenci genu *thioredoxinu* byla vedle SNP odhalena přítomnost inserce/delece o velikosti 8 bází. Z linie CpRR1 byl amplifikován další produkt o velikosti 2000 bp, jehož původ bude dále testován. Může se jednat o nespecifický produkt, paralog či polymorfismus v délce intronové sekvence (Obr. 4). Také v sekvenci genu *L-laktát dehydrogenázy* byly vedle SNP detekovány dvě inserce/delece o velikosti 3 bp a 4 bp.



**Obr. 4:** PCR amplifikace genu *thioredoxin* linií CpRR1 a Krym-61 obaleče jablečného. **1** - CpRR1, nadbytečný produkt označena šipkou. **2**- Krym-61.

### 4.2 Restrikční štěpení PCR produktů

Pro sekvence obou linií byly *in silico* vytvořeny restrikční mapy, které byly vzájemně porovnány. Následně byly vybrány restrikční endonukleázy pro detekci vybraných SNP



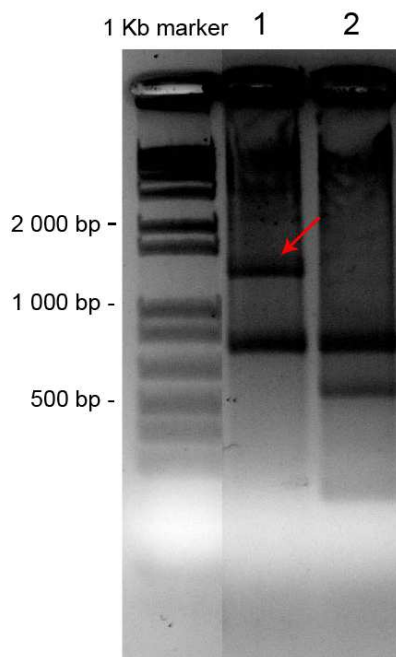
(Tab. IV). Po štěpící reakci byly získané fragmenty separovány na 2 % agarózového gelu. Tímto způsobem byla ověřena přítomnost sledovaných jednonukleotidových polymorfismů v intronových sekvencích.

V případě genu *thioredoxin* štěpil enzym *BspHI* fragment dle očekávání, čímž potvrdil přítomnost sledovaného SNP mezi liniemi CpRR1 a Krym-61. V případě linie CpRR1 došlo také ke štěpení druhého produktu v neznámém cílovém místě (Obr. 5). PCR produkty *ABC transportéru F2* obou linií byly enzymem *FatI* naštěpeny jen částečně. Výsledné fragmenty se však mezi liniemi liší a odpovídají očekávaným velikostem, čímž potvrzují přítomnost sledovaného SNP (Obr. 6).

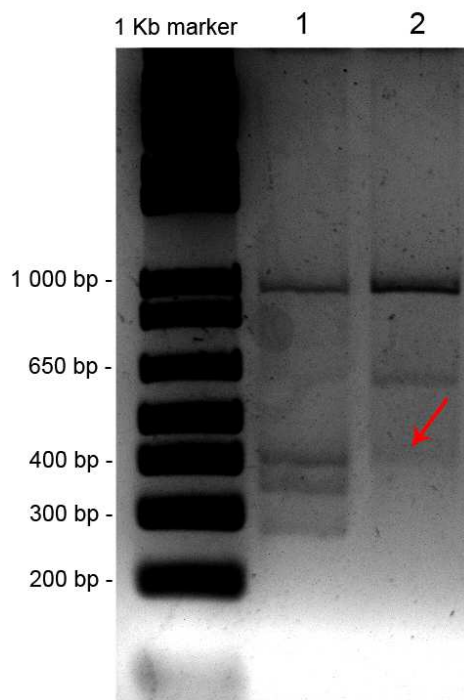
Enzym *NruI* oproti očekávání neštěpil fragment genu *dynamin* ani u jedné z linií (Obr. 7) Enzym *HpaII* u genu *nanchung* štěpil bez rozdílu v obou liniích (Obr.7). To naznačuje, že zjištěný rozdíl v intronových sekvencích byl způsoben chybou polymerázy při PCR amplifikaci či sekvenaci.

**Tab. IV:** Přehled použitých restričních endonukleáz, počet očekávaných a pozorovaných štěpných míst.

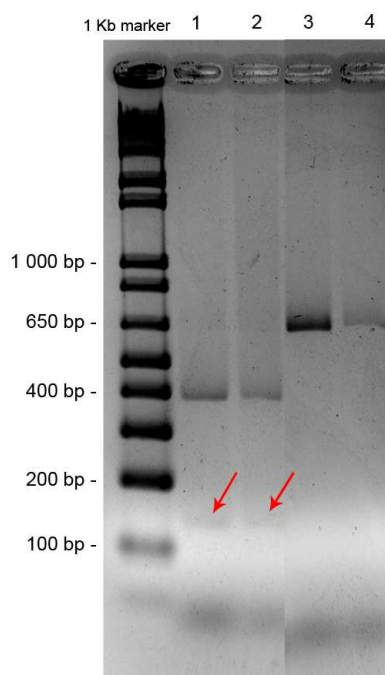
Gen	Restriktáza	Očekávané fragmenty CpRR1/Krym-61	Výsledek
<i>Thioredoxin</i>	<i>BspHI</i>	750 /220 bp, 530 bp	SNP ověřen, nespecifický produkt
<i>Dynamin</i>	<i>NruI</i>	530 bp, 100 bp/ 630	neštěpí, SNP nepotvrzen
<i>Nanchung</i>	<i>HpaII</i>	380 bp, 140 bp/150 bp, 180 bp, 140 bp	štěpí bez rozdílu, SNP nepotvrzen 1/1
<i>ABC transportér F2</i>	<i>FatI</i>	250 bp, 330 bp, 420 bp/580 bp, 420 bp	SNP ověřen, částečné štěpení 2/3



**Obr 5.:** Štěpení fragmentu genu *thioredoxin* (750 bp) linií CpRR1 a Krym-61 restriktázou *BspHI* (1, 2). **1** –CpRR1. **2** –Krym-61. Druhý produkt linie CPRR1 štěpený v neznámém místě označen šipkou.



**Obr. 6:** Štěpení fragmentu genu *ABC transportér F2* (1000 bp) linií CpRR1 a Krym-61 restriktázou *FatI* (1, 2). **1** –CpRR1. **2** –Krym-61. Slabě viditelný fagment (400 bp) linie Krym-61 označen šipkou.



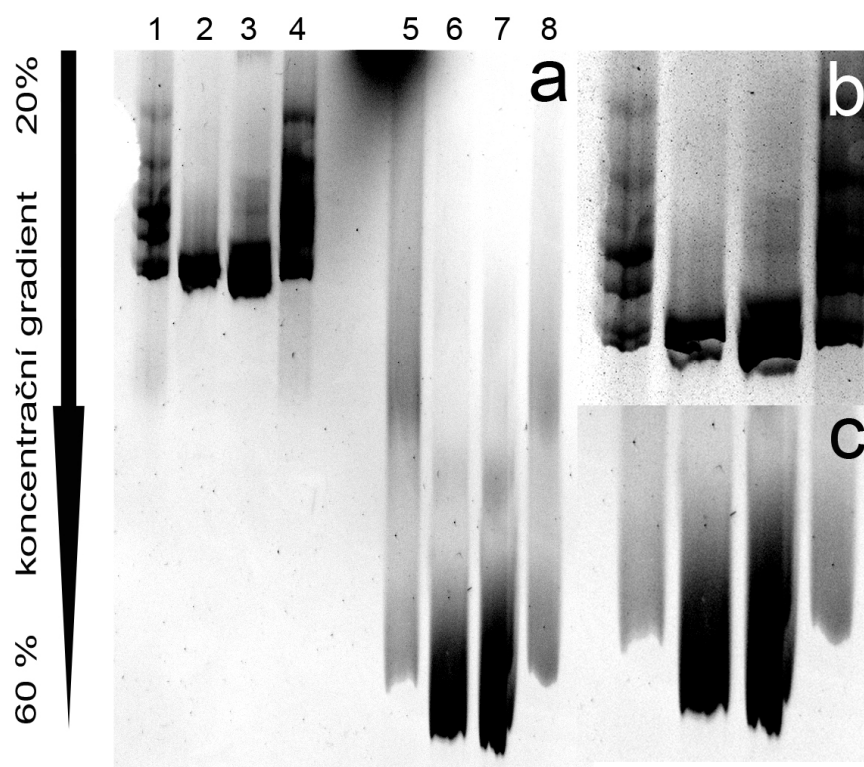
**Obr. 7:** Restrikční štěpení fragmentu genů *nanchung* (520 bp) a *dynamin* (630 bp) linií CpRR1 a Krym-61. **1** - *Hpa*II štěpení genu *nanchung* linie CpRR1. **2** – *Hpa*II štěpení genu *nanchung* linie Krym-61. Slabě viditelné fragmenty (140 bp) genu *nanchung* linií CpRR1 a Krym-61 označeny šipkami. **3** – *Nru*I štěpení genu *dynamin* linie CpRR1. **4** - *Nru*I štěpení genu *dynamin* linie Krym-61.

### 4.3 Denaturační gradientová gelová elektroforéza

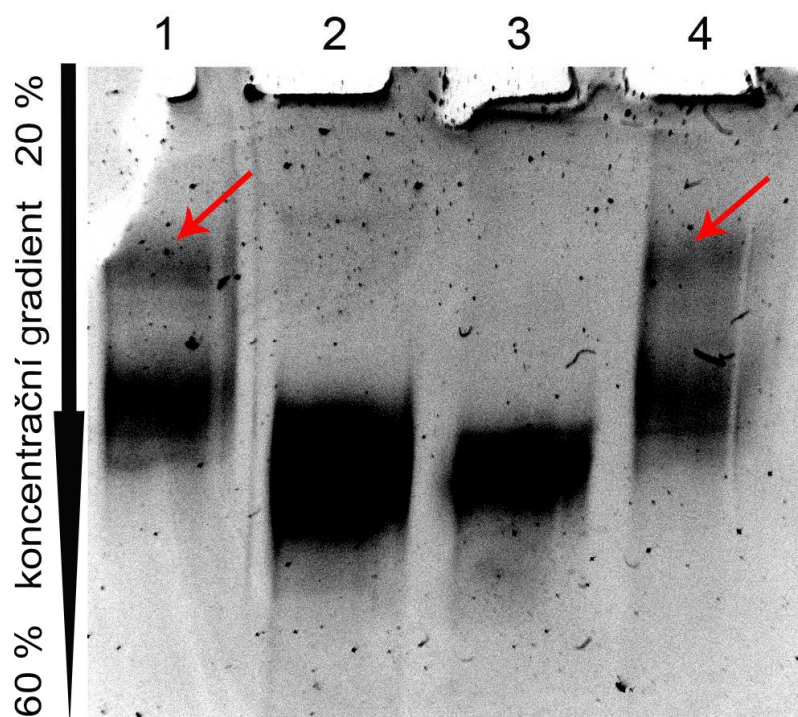
DGGE využívá toho, že denaturace dvoušroubovice DNA je silně ovlivněna jejím sekvencním složením, dokonce i pouhými jednonukleotidovými změnami (Nollau a kol., 1997). Heteroduplexová vlákna DNA se začnou disociovat již při nízké koncentraci denaturačního činidla, zatímco vlákna homoduplexu až při koncentraci vyšší. Na denaturačním gradientovém gelu by tedy mělo být možné po obarvení rozlišit heterozygotní i oba homozygotní genotypy na základě jejich různé mobility (Kwok a Chen, 2003).

Pro metodu DGGE bylo nutné amplifikovat sekvence o maximální velikosti 550 bp. Za tímto účelem byly navrženy dva páry specifických primerů v sekvenci genu *thioredoxin* (730 bp) a jeden pár pro gen *dynamin*. Forwardové primery obsahovaly tzv. „CG svorku“ (sekvence bohatá na CG páry). Koncentrační gradient denaturujících látek byl vytvořen pomocí formamidu a močoviny a pohyboval se v rozmezí 10 – 80 %. Pomocí PCR reakce byly amplifikovány homoduplexy sekvencí genu *Trx* a *Dyn* obou linií. Následně byly

vytvořeny heteroduplexy, které v našem experimentu představují genotyp heterozygota. Na polyakrylamidovém gelu bylo možné rozlišit homoduplexy od heteroduplexů, neboť vlákna homoduplexů disociovala až při vyšší koncentraci denaturujících látek díky správnému spárování bází na rozdíl od heteroduplexu, u kterého proběhla disociace dříve následkem přítomnosti nespárovaných bází ("mismatches") (Obr. 8, 9). Teplota reasociace neměla na výsledek vliv (Obr. 8, 9). K rozlišení homozygotů bude třeba další optimalizace metody. Odlišná mobilita heteroduplexu na denaturační gradientové gelové elektroforéze však potvrzuje přítomnost polymorfismů mezi oběma liniemi. Analýza dvou fragmentů genu *Trx* umožňuje porovnání mobility heteroduplexu obsahujícího pouze SNP (Obr. 8b) nebo také krátkou inzerci/deleci (Obr. 8c). Ze srovnání je patrné, že přítomnost inzerce/delece výrazně zvyšuje rozlišovací schopnost DGGE. Jak je však vidět na příkladu genu *Dyn* samotné SNP k úspěšnému rozlišení heterozygotů stačí (Obr. 9).



**Obr. 8:** DGGE fragmentu genu *thioredoxin* izolovaného z linií CpRR1 a Krym61 obaleče jablečného. Fragменты byly amplifikovány pomocí primerů TrxDGGE F1 a R1 (fragment I, 1-4) a F2 a R2 (fragment II, 5-8). **a)** Fragment I: **1**- heteroduplex DNA linií CpRR1+Krym-61 renaturovaný při teplotě 55 °C, **2** – homoduplex DNA linie CpRR1. **3** – homoduplex DNA linie Krym-61. **4** - heteroduplex DNA linií CpRR1+Krym-61 renaturovaný při teplotě 4 °C. Fragment II: **5**- heteroduplex DNA linií CpRR1+Krym-61 renaturovaný při teplotě 55 °C, **6** – homoduplex DNA linie CpRR1. **7** – homoduplex DNA linie Krym-61. **8** - heteroduplex DNA linií CpRR1+Krym-61 renaturovaný při teplotě 4 °C. **b)** Detail DGGE fragmentu I. **c)** Detail DGGE fragmentu II. Fragment II obsahuje inserci/deleci, která snižuje mobilitu jeho heteroduplexu na denaturačním gradientu.



**Obr. 9:** DGGE fragmentu genu *dynamin* izolovaného z linií CpRR1 a Krym61 obaleče jablečného. **1**- heteroduplex DNA linií CpRR1+Krym-61 renaturovaný při teplotě 55 °C, **2** – homoduplex DNA linie CpRR1. **3** – homoduplex DNA linie Krym-61. **4** - heteroduplex DNA linií CpRR1+Krym-61 renaturovaný při teplotě 4 °C. Heteroduplexy označeny šipkami.

## 5 Diskuze

Obaleč jablečný, *Cydia pomonella*, je jedním z nejvýznamnějších škůdců jádrového ovoce, u kterého se vyvinula rezistence k široké škále chemických i biologických insekticidů. Doposud byly zaznamenány rezistence k arsenátům, DDT, karbamátům, organofosfátům, pyrethroidům, diflubenzuronu, některým mikrobiálním insekticidům a CpGV (shrnutí v Reyes a kol., 2011). Virus granulózy obaleče jablečného (CpGV) je sadaři hojně využíván díky své vysoké virulenci, selektivitě a šetrnosti k životnímu prostředí. Od roku 2002 jsou však zaznamenávány poklesy účinnosti způsobené vznikem rezistence obaleče jablečného k CpGV (Asser-Kaiser a kol., 2007). Mezi hlavní příčiny vzniku rezistence patří příliš častá aplikace CpGV a homogenita dostupných přípravků, které zpravidla obsahují stejný izolát původem z Mexika (CpGV-M). Bylo prokázáno, že za vznik rezistence zodpovídá jediný gen s dominancí závislou na koncentraci viru a její rychlé šíření v populaci je způsobeno jeho vazbou na chromosom Z (Asser-Kaiser a kol., 2007; Asser-Kaiser a kol., 2010). Vzhledem k tomu, že postřiky s obsahem CpGV patří mezi nejvýznamější prostředky kontroly obaleče jablečného v organickém zemědělství, je pochopení genetické podstaty rezistence k CpGV klíčové pro jeho efektivní kontrolu.

Za původní areál rozšíření obaleče jablečného je považována jihovýchodní Evropa (Barnes, 1991; Franck a Timm, 2009), odkud se rozšířil do celé Evropy a dále na africký a americký kontinent. Úspěch takto rozsáhlého rozšíření obaleče jablečného spočívá v jeho schopnosti adaptace na různé klimatické podmínky a nové živné rostliny, jak dokládají jím způsobené škody na meruňkách a vlašských ořechách (Thaler a kol., 2008). Rychlé rozšíření tohoto škůdce téměř do celého světa je spojeno s aktivní migrací jedinců (krátké vzdálenosti) a recentním exportem infikovaného ovoce do celého světa (pasivní transport na velké vzdálenosti) (Franck a Timm, 2009), což může být jednou z příčin nízké genetické diference populací obaleče.

Genetická uniformita populací obaleče jablečného byla potvrzena mnoha výzkumy. Fuentes-Contreras a kol. (2008) provedli výzkum 11 populací obaleče jablečného ve dvou hlavních sadařských oblastech v Chile založený na analýze pomocí mikrosatelitů. Výsledky odhalily nízkou genetickou variabilitu mezi populacemi (~0,2 %). Nízká genetická rozdílnost byla prokázána i u 33 populací z různých geografických oblastí Evropy analýzou mikrosatelitů a mtDNA markery (Gund a kol., 2012). Mikrosatelity jsou vhodné k těmto analýzám, neboť jsou neutrálními markery reprezentující procesy genetického driftu a mutací (Franck a kol., 2007). Na druhou stranu, při použití markerů

pro rezistence vůči pesticidům, které naopak odráží selekční procesy, při studiu genetické struktury populací obaleče jablečného, byla odhalena vysoká variabilita (14,44%) mezi zkoumanými populacemi v Íránu (Khaghaninia a kol., 2009) i 27 sadech ve Francii, Itálii, Arménii a Chile (Franck a kol., 2007). Genetickou variabilitu ovlivňuje i geografická vzdálenost populací, klimatické podmínky (relativní vlhkost, teplota, nadmořská výška) (Khaghaninia a kol., 2009) a lidský faktor, např. aplikace insekticidů (Thaler a kol., 2008). Tato práce se zabývá hledáním polymorfismů mezi rezistentní linií obaleče jablečného, CpRR1, a senzitivní linií, Krym-61. Zvolená linie Krym-61 pochází z materiálu získaného v roce 1961 na Krymském poloostrově, a je tedy patrně geneticky odlišná od současných evropských populací. Jako molekulární markery byly v této studii zvoleny SNP, neboť jsou v genomu velmi frekventované a jsou stabilně děděny v populaci (Brookes, 1999).

Dále byly testovány metody pro detekci získaných SNP, restrikční štěpení PCR produktů (RFLP-PCR) a denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE). Získané výsledky ukazují, že metoda DGGE dokáže na denaturačním gradientovém gelu odlišit heterozygotní genotypy od homozygotních díky jejich výrazně odlišné rychlosti disociace. Rozdíly mezi intronovými sekvencemi však nejsou, zdá se, dostatečně velké, k odlišení samotných homoduplexů. Zvýšení citlivosti metody, např. použitím kratších fragmentů, bude předmětem dalšího studia.

Také metoda restrikčního štěpení PCR produktů v místech nesoucích SNP (RFLP-PCR) dokázala potvrdit přítomnost vybraných SNP. Použití této metody je však limitováno několika faktory, jako je například nízký počet vhodných SNP nebo finanční náročnost některých restrikčních enzymů. Detekce SNP tímto způsobem mohou komplikovat i chyby polymerázy při amplifikaci a sekvenaci nebo polymorfismus sledovaného SNP nejen mezi ale také uvnitř jednotlivých linií. Nicméně použité metody potvrdily dostatečnou genetickou diferenciaci mezi liniemi Krym-61 a CpRR1 a po potřebné optimalizaci je bude možné použít při genetickém mapování rezistence k CpGV.

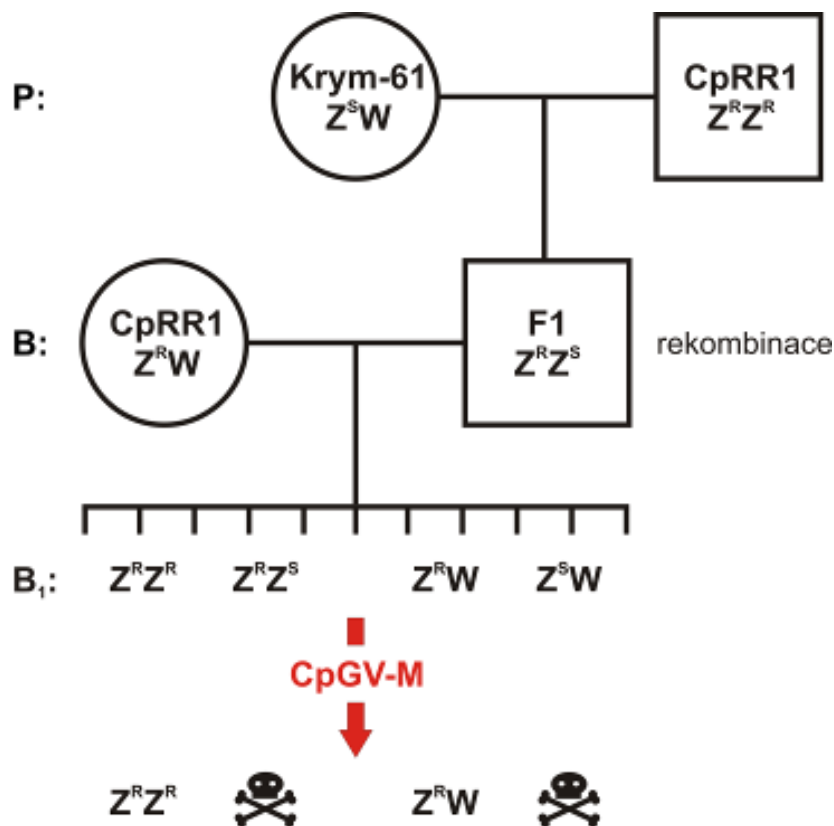
Rezistence k různým chemickým látkám již byla úspěšně mapována u několika motýlích druhů. První vazebné mapování genu zodpovědného za rezistenci u motýlů provedl Heckel a kol. (1998). Pomocí allozynomových markerů se jim podařilo u můry *Heliothis virescens* zamapovat acetylcholinesterázu zodpovědnou za rezistenci k organofosfátům. S pomocí AFLP markerů pak bylo provedeno vazebné mapování rezistence k Bt toxinu u zářezníčka polního, *Plutella xylostella*, (Heckel a kol. 1999) a můry *Trichoplusia ni* (Baxter a kol., 2010), rezistence k fenvalerátu u můry *Helicoverpa*



*armigera* (Wee a kol., 2008) nebo rezistence ke spinosadu u *P. xylostella* (Baxter a kol. 2010a). Mapování rezistence ke spinosadu u *P. xylostella* bylo pak recentně použito k demonstraci nového přístupu založeného na nových sekvenačních metodách, tzv. RAD sekvenování ("restriction-site associated DNA") (Baxter a kol., 2011b).

Na základě těchto prací bylo navrženo křížení rezistentní linie CpRR1 a citlivé Krym-61 dle schématu na Obr. 11, jehož vlastní provedení bude předmětem mé diplomové práce. Budou vytvořeny páry skládající se ze samice linie Krym-61 a samce linie CpRR1. Vylíhlé housenky jednotlivých párů se budou skládat z heterozygotních samců a hemizygotních samic. Následovat budou zpětná křížení rezistentních heterozygotních samců z F1 generace s rezistentní hemizygotní samicí z linie CpRR1. Zpětná křížení samic z F1 generace nebudou prováděna. Vzhledem k samičí achiasmatické meiose by nebyla informativní (Traut, 1977). Potomstvo zpětného křížení se bude skládat z homozygotních samců a hemizygotních samic rezistentních k diskriminující koncentraci CpGV-M a heterozygotních samců a hemizygotních samic k této koncentraci senzitivních. Diskriminující koncentrace CpGV-M, při které je rezistence recesivní, byla Asser-Kaiser a kol. (2007) stanovena na  $L_{50} = 5,8 \times 10^4$  OB/mL. Z jednotlivých parentálních párů a z přeživšího potomstva bude vyizolována genomová DNA, ze které budou dále pomocí PCR amplifikovány krátké polymorfnní úseky. Jednonukleotidové polymorfismy a případné inserce/delece budou poté detekovány pomocí metod DGGE a RFLP-PCR (viz výše). Následně bude provedena vazebná analýza, na jejímž základě bude možné vymezit oblast, kde se gen zodpovědný za rezistenci obaleče jablečného k CpGV vyskytuje.

V této práci se podařilo zjistit polymorfismy v 10 z 11 studovaných intronových sekvencích linií CpRR1 a Krym-61 obaleče jablečného. Dále byly testovány metody RFLP-PCR a DGGE schopné identifikovat SNP a inserce/delece v získaných sekvencích. Získané poznatky umožní vazebnou analýzu rezistence CpGV. S její pomocí bude možné vymezit oblast nesoucí gen zodpovídající za rezistenci k CpGV. Genetické zamapování rezistence k CpGV umožní, společně s dostupným referenčním genomem bource morušového, identifikaci kandidátních genů pro další výzkum. Jejich studium umožní pochopení vzniku rezistence k CpGV na molekulární úrovni a v konečném důsledku přispěje k dlouhodobě udržitelné kontrole obaleče jablečného.



**Obr. 11:** Návrh křížení po genetické mapování rezistence k CpGV-M. Samec obaleče jablečného  $Z^R Z^R$  z rezistentní linie **CpRR1** bude křížen se samicí obaleče jablečného  $Z^S W$  z citlivé linie **Krym-61** (**P**). Následně bude provedeno zpětné křížení (**B**) heterozygotního samce  $Z^R Z^S$  z F1 generace s rezistentní samicí  $Z^R W$  z linie CpRR1. Potomstvo zpětného křížení (**B<sub>1</sub>**) se skládá z homozygotních samic  $Z^R Z^R$  a hemizygotních samic  $Z^R W$  rezistentních k diskriminující koncentraci CpGV-M a heterozygotních samců a hemizygotních samic k této koncentraci viru sensitivních. Posledně jmenovaní po aplikaci diskriminující koncentrace **CpGV-M** (červená šipka) umírají nebo nejsou schopni kuklení. Imaga B<sub>1</sub> generace, tj. samci genotypu  $Z^R Z^R$  a samice genotypu  $Z^R W$  budou zamražena pro pozdější detekci SNP.

## 6 Souhrn

Obaleč jablečný, *Cydia pomonella*, je hospodářsky velmi významný škůdce především jádrového ovoce, ale také meruněk a vlašských ořechů. K zamezení vysokých ekonomických ztrát používají sadaři široké spektrum insekticidů. Jednou z alternativních metod k chemickým látkám je aplikace postřiku na bázi viru granulózy obaleče jablečného (CpGV), jehož výhody spočívají ve velké virulenci, vysoké selektivitě a šetrnosti k životnímu prostředí. Od roku 2002 byly v Evropě zaznamenány případy rezistence obaleče jablečného vůči CpGV, za kterou je zodpovědný jediný gen vázaný na chromosomu Z. V této práci bylo získáno 11 intronových sekvencí genů vázaných na chromosom Z obaleče jablečného z linií Krym-61 a linie CpRR1, která je k CpGV rezistentní. I přes značnou uniformitu genetické struktury evropských populací obaleče byly v těchto sekvencích identifikovány četné polymorfismy. Dále byly testovány metody detekce získaných polymorfismů, RFLP-PCR a DGGE. Bylo navrženo křížení jedinců obou linií, na jehož základě bude možné vymezit oblast, kde se nachází gen zodpovědný za rezistenci obaleče jablečného vůči CpGV a tím významně přispět k poznání genetické podstaty této rezistence.

## 7 Literatura

- Abe H, Mita K, Yasukochi Y, Oshiki T, Shimada T (2005) Retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Cytogenetic and Genome Research* 110, 144–151.
- d'Alençon E, Sezutsu H, Legeai F, Permal E, Bernard-Samain S a kol. (2010) Extensive synteny conservation of holocentric chromosomes in Lepidoptera despite high rates of local genome rearrangements. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 7680–7685.
- Asser-Kaiser S, Fritsch E, Undorf-Spahn K, Kienzle J, Eberke K E a kol. (2007) Rapid emergence of baculovirus resistance in codling Mmth due to dominant, sex-linked inheritance. *Science*, 317, 1916–1918.
- Asser-Kaiser S, Heckel DG, Jehle JA (2010) Sex linkage of CpGV resistance in a heterogeneous field strain of the codling moth *Cydia pomonella* (L.). *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, 59–64.
- Asser-Kaiser S, Radtke P, El-Salamouny S, Winstanley D, Jehle JA (2011) Baculovirus resistance in codling moth (*Cydia pomonella* L.) caused by early block of virus replication. *Virology*, 410, 360–367.
- Bakri A, Mehta K, Lance DR (2005) Sterilizing insects with ionizing radiation. In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS (Eds.) *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, 233–268.
- Barnes MM (1991) Codling moth occurrence, host race formation, and damage. In: Van der Geest L P S, Evenhuis H H (Eds) *Tortricid pests: their biology, natural enemies and control*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 313–327.
- Baxter SW, Chen M, Dawson A, Zhao J-Z, Vogel H, et al. (2010) Mis-Spliced Transcripts of Nicotinic Acetylcholine Receptor  $\alpha 6$  Are Associated with Field Evolved Spinosad Resistance in *Plutella xylostella* (L.). *PLoS Genetics* 6,e1000802
- Baxter SW, Badenes-Peréz FR, Morrison A, Vogel H, Crickmore N (2011a) Parallel evolution of *Bacillus thuringiensis* toxin resistance in Lepidoptera. *Genetics*, 189, 675-679.
- Baxter SW, Davey JW, Johnston JS, Shelton AM, Heckel DG a kol. (2011b) Linkage mapping and comparative genomics using next-generation RAD sequencing of a non-model organism. *Plos One*, 6, e19315.
- Beaufils N, Lassoued AB, Essaydi A, Dales JP, Formisano-Tréziny C a kol. (2012) Analysis of T-cell receptor- $\gamma$  gene rearrangements using heteroduplex analysis by high-resolution microcapillary electrophoresis. *Leukemia Research*, 36, 1119-1123.
- Beldade P, Saenko SV, Pul N, Long AD (2009) A gene-based linkage map for *Bicyclus anynana* butterflies allows for a comprehensive analysis of synteny with the lepidopteran reference genome. *PLoS Genetics*, 5, e1000366.
- Berling M, Blachere-Lopez C, Soubabere O, Lery X, Bonhomme A a kol. (2009a) *Cydia pomonella* granulovirus genotypes overcome virus resistance in the codling moth and improve virus efficiency by selection against resistant hosts. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 925–930.

- Berling M, Rey JB, Ondet SJ, Tallot Y, Soubabère O a kol. (2009b) Field trials of CpGV virus isolates overcoming resistance to CpGV-M. *Virologica Sinica*, 24, 470–477.
- Brookes AJ (1999) The essence of SNPs. *Gene*, 234, 177-186.
- Brown KSJ, von Schoultz B, Suomalainen E (2004) Chromosome evolution in Neotropical Danainae and Ithomiinae (Lepidoptera). *Hereditas*, 141, 216–36.
- Carpenter JE, Bloem S, Marec F (2005) Inherited sterility in insects. In: Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS (Eds.) *Sterile Insect Technique. Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Springer, Dordrecht, The Netherlands, pp. 115-146.
- Cross JV, Solomon MG, Chandler D, Jarrett P, Richardson PN a kol. (1999) Biocontrol of pests of apples and pears in northern and central Europe: 1. microbial agents and nematodes. *Biocontrol Science and Technology*, 9, 125–149.
- Dalíková M (2009) Využití BAC klonů při studiu pohlavního chromosomu W obaleče jablečného *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). Magisterská práce, v češtině, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Česká republika.
- Dasmahapatra KK, Walters JR, Briscoe AD, Davey JW, Whibley A a kol. (2012) Butterfly genome reveals promiscuous exchange of mimicry adaptations among species. *Nature*, 487, 94-98.
- De Prins J, Saitoh K (2003) Karyology and sex determination. In: Kristensen N P (Ed.) *Lepidoptera, Moths and Butterflies: Morphology, Physiology, and Sevelopment*. Berlin: Walter de Gruyter.
- Eberle KE (2010) Novel isolates of *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV): deciphering the molecular mechanism for overcoming CpGV resistance in codling moth *Cydia pomonella*. Dissertation. Johannes Gutenberg Universität Mainz, Germany.
- Eberle KE, Asser-Kaisser S, Sayed SM, Nguyen HT, Jehle JA (2008) Overcoming the resistance of codling moth against conventional *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV-M) by a new isolate CpGV-I12. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98, 293–298.
- Eberle KE, Jehle JA (2006) Field resistance of codling moth against *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV) is autosomal and incompletely dominant inherited. *Journal of Invertebrate Pathology*, 93, 201-206.
- Franck P, Reyes M, Olivares J, Sauphanor B (2007) Genetic architecture in codling moth populations: comparison between microsatellite and insecticide resistance markers. *Molecular Ecology*, 16, 3554-3564.
- Franck P, Timm AE (2009) Population genetic structure of *Cydia pomonella*: a review and case study comparing spatiotemporal variation. *Journal od Applied Entomology*, 134, 191-200.
- Fuentes-Contreras E, Espinoza JL, Lavandero B, Ramírez CC (2008) Population genetic structure of codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) from apple orchards in central Chile. *Journal of Economic Etomology*, 101, 190-198.
- Fuková I, Neven LG, Bárcenas NM, Gund NA, Dalíková M, Marec F (2009) Rapid assessment of the sex of codling moth *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera: Tortricidae) eggs and larvae. *Journal of Applied Entomology*, 133, 249–261.
- Fuková I, Nguyen P, Marec F (2005) Codling moth cytogenetics: karyotype, chromosomal location of rDNA, and molecular differentiation of sex chromosomes. *Genome*, 48(6), 1083–1092.

- Fuková I, Traut W, Vítková M, Nguyen P, Kubíčková S, Marec F (2007) Probing the W chromosome of the codling moth, *Cydia pomonella*, with sequences from microdissected sex chromatin *Chromosoma*, 116, 135–145.
- Goldsmith MR (2010) Recent progress in silkworm genetics and genomics. In: Goldsmith MR, Marec F (Eds.) *Molecular biology and genetics of the Lepidoptera*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Gund NA, Wagner A, Timm AE, Schulze-Bopp S, Jehle JA a kol. (2012) Genetic analysis of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) populations with different levels of sensitivity toward the *Cydia pomonella* granulovirus (CpGV). *Genetica*, 140, 235–247.
- Heckel DG, Bryson PK, Brown TM (1998) Linkage analysis of insecticide-resistant acetylcholinesterase in *Heliothis virescens*. *Journal of Heredity*, 89, 71–78.
- Heckel DG, Gahan LJ, Liu YB, Tabaschnik BE (1999) Genetic mapping of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in diamondback moth using biphasic linkage analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 8373–8377.
- Hess RT, Falcon LA (1987) Temporal events in the invasion of the codling moth, *Cydia pomonella*, by a granulosis virus: An electron microscope study. *Journal of Invertebrate Pathology*, 50, 85–105.
- Hluchý M, Ackermann P, Zacharda M, Bagar M, Jetmarová E, Vanek G (1997) *Obrazový atlas chorob a škůdců ovocných dřevin a révy vinné*. Biocont Laboratory s.r.o., Brno.
- Jehle JA, Blissard GW, Bonning BC, Cory JS, Herniou EA a kol. (2006) On the classification and nomenclature of baculoviruses: A proposal for revision. *Archives of Virology*, 151, 1257–1266.
- Jiggins C, Mavarez J, Beltrán M, McMillan O, Johnston J S, Bermingham E (2005) A genetic linkage map of the mimetic butterfly *Heliconius melpomene*. *Genetics*, 171, 557–570.
- Joron M, Papa R, Beltrán M, Chamberlain N, Mavárez J a kol. (2006) A conserved supergene locus controls colour pattern diversity in *Heliconius* butterflies. *PLoS Biology*, 4, 303.
- Kalendar R, Lee D, Schulman AH (2011) Java web tools for PCR, in silico PCR, and oligonucleotide assembly and analysis. *Genomics*, 98: 137–144.
- Kawamura N (1988) The egg size determining gene, *Esd*, is a unique morphological marker on the W-chromosome of *Bombyx mori*. *Genetica*, 76, 195–201.
- Kawamura N (1990) Is the egg size determining gene, *Esd*, on the W-chromosome identical with the sex-linked giant egg gene, *ge*, in the silkworm? *Genetica*, 81, 205–210.
- Kehl T, Fischer K (2012) Larval starvation reduces responsiveness to feeding stimuli and does not affect feeding preferences in a butterfly. *Journal of Insect Physiology*, 58, 1028–1035.
- Khaghaninia S, Mohammadi SA, Sarafrazi AM, Nejad KHI (2009) Population variation of codling moth *Cydia pomonella* (Lep.; Tortricidae) based on molecular data from northwestern Iran. *TUBITAK*, 35, 571–578.
- Knight AL, Brunner JF, Alston D (1994) Survey of azinphosmethyl resistance in codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in Washington and Utah. *Journal of Economic Entomology*, 87, 285–292.
- Kristensen NP, Scoble, MJ, Karsholt O (2008) Lepidoptera phylogeny and systematics: the state of inventorying moth and butterfly diversity. *Zootaxa*, 1725, 67–68.

- Kroemer JA, Coates BS, Nusawardani T, Rider SD Jr, Fraser LM, Hellmich RL (2011) A rearrangement of the Z chromosome topology influences the sex-linked gene display in the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*. *Molecular Genetics and Genomics*, 286, 37–56.
- 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.
- Kwok PY, Chen X (2003) Detection of single nucleotide polymorphisms. *Current Issues in Molecular Biology*, 5, 43–60.
- Lacey LA, Thomson D, Vincent C, Arthurs SP (2008) Codling moth granulovirus: a comprehensive review. *Biocontrol Science and Technology*, 18, 639–663.
- Laštůvka Z, Liška J (2005) Checklist of Lepidoptera of the Czech Republic (Insecta: Lepidoptera). <http://www.lepidoptera.wz.cz/>.
- Lukhtanov V (2000) Sex chromatin and sex chromosome systems in nonditrysian Lepidoptera (Insecta). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 38, 73–79.
- Malheiros N, de Castro D, Camara A (1947) Chromosomas sem centromero localizado. O caso da *Luzula purpurea*. *Agronomia Lusitana* 9, 51–74.
- Mank JE, Vicoso B, Berlin S, Charlesworth B (2010) Effective population size and the Faster-X effect: empirical results and their interpretation. *Evolution* (64), 663–674.
- Marec F, Neven LG, Fuková I (2007) Developing transgenic sexing strains for the release of non-transgenic sterile male codling moths *Cydia pomonella*. In: Vreysen M J B, Robinson A S, Hendrichs J (Eds.) Area-wide control of insect pests. From research to field implementation. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Marec F, Sahara K, Traut W (2010) Rise and fall of the W chromosome in Lepidoptera. In: Goldsmith M. R., Marec F. (Eds.) Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera. CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 49–63.
- Marec F, Tothová A, Sahara K, Traut W (2001) Meiotic pairing of sex chromosome fragments and its relation to atypical transmission of a sex-linked marker in *Ephesia kuehniella* (Insecta: Lepidoptera). *Heredity*, 87, 659–671.
- Marec F, Traut W (1994) Sex chromosome pairing and sex chromatin bodies in W-Z translocation strains of *Ephesia kuehniella* (Lepidoptera). *Genome*, 37, 426–435.
- Mita K, Kasahara M, Sakasi S, Nagayasu Y, Yamada T a kol. (2004) The Genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Research*, 11, 27–35.
- Moffit H R, Westigard P H (1984) Suppression of the codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) population on pears in southern Oregon through mating disruption with sex pheromone. *Journal of Economic Entomology*, 77, 1513–1519.
- Nguyen P (2009) Studium syntenie chromosomu Z obaleče jablečného, *Cydia pomonella*, metodou BAC-FISH. Diplomová práce, v češtině, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Česká republika.
- Nguyen P, Sýkorová M, Šichová J, Kůta V, Dalíková M, Čapková-Frydrychová R, Neven LG, Sahara K, Marec F (2012) Neo-sex chromosomes and adaptive potential in tortricid pests. (v oponentním řízení)
- Nollau P, Wagener C (1997) Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. *Clinical Chemistry*, 43, 1114–1128.

- Novák I, Severa F (2002) Motýli. Aventium, Praha.
- Ohbayashi F, Suzuki M, Shimada T (2002) Sex determination in *Bombyx mori*. *Current Science*, 83, 466–471.
- Ortiz E, Templado J (1976) Los cromosomas de tres especies de tortricidos (Lep. Tortricidae). *Eos, Revista Española de Entomología*, 51, 77–84.
- Parmesan C, Yohe G (2003) A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature*, 421, 37–42.
- Pemsel, M, Schwab S, Scheurer A, Freitag D, Schatz R, Schlücker E (2010) Advanced PGSS process for the encapsulation of the biopesticide *Cydia pomonella* granulovirus. *The Journal of Supercritical Fluids*, 53, 174–178.
- Pringle EG, Baxter SW, Webster CL, Papanicolaou A, Lee SF, Jiggins CD (2007) Synteny and chromosome evolution in the lepidoptera: Evidence from mapping in *Heliconius melpomene*. *Genetics*, 177, 417–426.
- Prugar J (2008) Kvalita rostlinných produktů na prahu 3. tisíciletí: Zahradnické rostlinné produkty a lesní plody. Výzkumný ústav pivovarský a sladařský, a.s., Praha.
- Rezapanah M, Estabragh-Shojai S, Huber J, Jehle JA (2008) Molecular and biological characterization of new isolates of *Cydia pomonella* granulovirus from Iran. *Journal of Pest Science*, 81, 187–191.
- Rezapanah M, Kharrazi-Pakdel A, Kamali K, Huber J (2002) Survey on natural occurrence of *Cydia pomonella* granulovirus in apple orchards of Iran. *Journal of Applied Entomology and Phytopathology*. 69, 49–56.
- Reyes M, Collange B, Rault M, Casanelli S, Sauphanor B (2011) Combined detoxification mechanism and target mutation fail to confer a high level of resistance to organophosphates in *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 99, 25–32.
- Robinson R (1971) Lepidoptera Genetics. Pergamon Press, Oxford, England.
- Robinson GE, Hackett KJ, Purcell-Miramontes M, Brown SJ, Ewans JD a kol. (2011) Creating a buzz about insect genomes. *Science*, 331, 1386–1386.
- Sahara K, Marec F, Eikhoff U, Traut W (2003a) Moth sex chromatin probed by comparative genomic hybridization (CGH). *Genome*, 46, 339–342.
- Sahara K, Yoshido A, Kawamura N, Ohnuma A, Abe H a kol. (2003b) W-derived BAC probes as a new tool for identification of the W chromosome and its aberrations in *Bombyx mori*. *Chromosoma*, 112, 48–55.
- Sahara K, Yoshido A, Traut W (2012) Sex chromosome evolution in moths and butterflies. *Chromosome Research*, 20, 83–94.
- Scriber J M (2011) Impacts of climate warming on hybrid zone movement: Geographically diffuse and biologically porous "species borders". *Insect Science*, 18, 121–159.
- Sýkorová M (2011) Izolace a chromosomální lokalizace genů pro acetylcholinesterázu u obaleče jablečného, *Cydia pomonella*. Diplomová práce, v češtině, Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Česká republika.
- Sýkorová M, Nguyen P, Šichová J, Kůta V, Dalíková M, Čapková-Frydrychová R, Neven LG, Sahara K, Marec F (2011) Synteny mapping revealed a Z-chromosome-autosome fusion in the karyotype evolution tortricid moths. In: Jackson D, Griffin D (Eds.) Delegate Book,



18th International Chromosome Conference, 29 August-2 September 2011, Manchester, UK.

- Tatematsu K, Koabayashi I, Uchino K, Sezutsu H, Iizuka T a kol.(2010) Construction of a binary transgenic gene expression system for recombinant protein production in the middle silk gland of the silkworm *Bombyx mori*. *Transgenic Research*, 19, 473–487.
- Thaler R, Brandstätter A, Meraner A, Chabicovski M Parson W a kol. (2008) Molecular phylogeny and population structure of the codling moth (*Cydia pomonella*) in Central Europe: II. AFLP analysis reflects human-aided local adaptation of a global pest species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48, 8838-849.
- Tomita M, Munetsuna H, Sato T, Adachi T, Hino R a kol. (2002) Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nature Biotechnology*, 21, 52–56.
- Traut W (1977) A study of recombination, formation of chiasmata and synaptonemal complex in female and male meiosis of *Ephestia kuehnilla* (Lepidoptera). *Genetica*, 47, 135-142.
- Traut W, Marec F (1996) Sex chromatin in Lepidoptera. *The Quarterly Review of Biology*, 71, 239–256.
- Traut W, Marec F (1997) Sex chromosome differentiation in some species of Lepidoptera (Insecta). *Chromosome Research*, 5, 283–291.
- Traut W, Sahara K, Otto TD, Marec F (1999) Molecular differentiation of sex chromosomes probed by comparative genomic hybridization. *Chromosoma*, 108, 173–180.
- Varela LG, Welter SC, Welter SC, Jones VP, Brunner JF, Riedl H (1993) Monitoring and characterization of insecticide resistance codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) in four western states. *Journal of Economic Entomology*, 86, 1–10.
- Vicoso B, Charlesworth B (2006) Evolution on the X chromosome: unusual patterns and processes. *Nature Reviews Genetics*, 7, 645–653.
- Vítková M, Fuková I, Kubíčková S, Marec F (2007) Molecular divergence of the W chromosomes in pyralid moths (Lepidoptera). *Chromosome Research*, 15, 917–930.
- Vogel H, Altincicek B, Glöckner G, Vilcinskas A (2011) A comprehensive transcriptome and immune-gene repertoire of the lepidopteran model host *Galleria mellonella*. *BMC Genomics*, 12, 308.
- Voudouris CC, Sauphanor B, Franck P, Reyes M, Mamuris Z a kol. (2011) Insecticide resistance status of the codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) from Greece. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100, 229–238.
- Vreysen MJB, Carpenter JE, Marec F (2010) Improvement of the sterile insect technique for codling moth *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Lepidoptera Tortricidae) to facilitate expansion of field application. *Journal of Applied Entomology*, 134, 165–181.
- Vreysen MJB, Robinson AS (2010) Ionising radiation and area-wide management of insect pests to promote sustainable agriculture. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 31, 233-250.
- Weith A, Traut W (1986) Synaptic adjustment, non-homologous pairing, and non-pairing of homologous segments in sexchromosome mutants of *Ephestia kuehniella* (Insecta, Lepidoptera). *Chromosoma*, 94, 125–131.

- Wee CW, Lee SF, Robin C, Heckel DG (2008) Identification of candidate genes for fenvalerate resistance in *Helicoverpa armigera* using cDNA-AFLP. *Insect Molecular Biology*, 17, 351-360.
- Wolf KW (1996) The structure of condensed chromosomes in mitosis and meiosis of insects. *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 25, 37-62.
- Wurm FM (2003) Human therapeutic proteins from silkworms. *Nature Biotechnology*, 21, 34-35.
- Xia QY, Zhou ZY, Lu C, Cheng DJ, Dai FY a kol. (2004) A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 306, 1937-1940.
- Yamamoto K, Nohata J, Kadono-Okuda K, Narukawa J, Sasanuma M, Sasanuma S a kol. (2008) A BAC-based integrated linkage map of the silkworm *Bombyx mori*. *Genome Biology*, 9, R21.
- Yasukochi Y, Ashakumary L, Baba K, Yoshido A, Sahara K (2006) A second-generation integrated map of the silkworm reveals synteny and conserved gene order between lepidopteran insects. *Genetics*, 173, 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, 7465.
- Yoshido A, Bando H, Yasukochi Y, Sahara K (2005a) The *Bombyx mori* Karyotype and the assignment of linkage groups. *Genetics*, 170, 675-685.
- Yoshido A, Marec F, Sahara K (2005b) Resolution of sex chromosome constitution by genomic in situ hybridization and fluorescence in situ hybridization with (TTAGG)<sub>n</sub> telomeric probe in some species of Lepidoptera. *Chromosoma*, 114, 193-202.
- Yoshido A, Yasukochi Y, Sahara K (2011) *Samia cynthia* versus *Bombyx mori*: Comparative gene mapping between a species with a low-number karyotype and the model species of Lepidoptera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41, 370-377.
- Zhan S, Merlin C, Boore JL, Reppert JM (2011) The monarch butterfly genome yields insights into long-distance migration. *Cell*, 147, 1171-1185.

**8. Příloha 1:** Sekvence s vyznačenými SNP a insercemi/delecemi. Intronové sekvence jsou tučně zvýrazněny.

>Dynamin\_Cydia pomonella\_CpRR1/Krym-61

CTATTGAGGGTTCCGGCTCTGCACAAATCAACACCAATGAGTTGTCTGGGCGGGCGCCAAGATC  
AACCGGCTCTTCCACGAGAGGTTCCCTTCGAGATCGTCAAGATGGAGTTCGACGAGAAGGA  
GCTGCGGCGCGAGAT[ C/T] **GCCTTCGCTATCCGGAATATCCACGGTATCAGGGTACGTGGA**  
**CGTTAGGAAACTGAAATGGGGTTGATTGGAGAACTAGCTTAAGAGGCTACAAAAGCCTGTC**  
**ACGAAACGGGTGACGTACAGCGAGCTGTGAAATTGCATGAATTCATTCATGAATACAGCTA**  
**TTAGAAGCATTCTAATCACTTGCAATACAAA [ AC/CA ] TTTCTAGGTGTCCTTAATCGGAC**  
**CTCAGCACTCTTACTTGGTACAATCGTAGATTCAGTTAACTGAA [ T/C ] TTCCGAAAAT [ C/**  
**T ] TTATTGTAAAGAGATACCTGCTGATGGTCATTTAACCATTTATAAGGCAAAATGAAATGG**  
**TTCCATATT [ G/T ] TTGCAGGTGGGGTTGTTACACGCCTGACATGGCGTTCGAGGCCATCG [ C**  
**/T ] GAAGAAGCAGATCGGGCGGCTGAAGGAGCCGTGCCTCAAGTGCGTGGATCTCGTCGTGC**  
AGGAGCTCTCCAACGTCGTCCGCATCTGCACTGAG

>DGK\_Cydia pomonella\_CpRR1/Krym-61

CTTCTGCAAATTGATGAGGCGGGACGCGGCCATTTGTGCTGATCCAAATACTGCCACCACCT  
**GCATATATCCGTAGCAAGTTTTTTATTTAATTAGGTCCCTTTTGCACATCTAACATACAGGTT**  
**TGAGTGTTCGCACGTTACCTCTAGGATACGGTCATCGAAAGATGGGGCTAAGAAAATATCA**  
TCGCCCCTGGTTCCTCCCCAAAATTCGTCCCACCCATGAATGATGATATGTTAAGTACGAC  
AATCCCCTGCAGTTCTGGCAGCGGTA

>Nanchung\_Cydia pomonella\_CpRR1/Krym-61

AGCTTCTATCTCGTGGTCCGGTCCGATCAAATGCGCCATAATAGTCGGAGAAGGACGTAAGCG  
ACATGAGGAACATGGCCATGATGCTCTCCATGGGCGACGGCATAGGGTTGGACACCGAGTCC  
TCCACGCCCTCTGG [ C/T ] GTGT [ T/C ] **CGGATTGTCGAACGACAGGAAGATTATGTAATAC**  
**GCTGAAAATATTTACAAGCTCTATCAGACTCGGATCAAATTTTTTATACC [ T/- ] AGCATCG**  
**ACACACGTTATTTACGTAATATTTACGATGGGTACTAGCTATTTTTAAAAATCCTCATACT**  
**CAGT [ A/G ] AACTATAAGTTCATCCATGGATAAATCCAAAACAGTTAAAGACAAATAGTA**  
**AAAGATTGATTGCAAATTAATTTGTTAACCGGTGTTAGTTAACATTTTATATAAACAATAT**  
**CGAGCATAATATTAGCCGTAATGAGACGTACCTTGAGAAAAGCCCATCACAA [ C/A ] CACTA**  
GATAAATGCAGACGAACCGCAGCAAGTCACCCATCACCATTCTG

>GABAr\_Cydia pomonella\_CpRR1/Krym-61

TGGATTAGGTAGTATCCCATGGACCGAACAAATTGTATCTCGCAGGCCAACCGAGAATAATT  
TCCTGTGGAAAATATTCAAATATACATTAATTTAGTCCTGCAGAAGTGAGGTAGATATAAAC  
TTTAATTGCAATCACAAATCAAATTTCAATAAAATCGATCTTATAATGAAAACTTCAAACG  
AATTGTATG [ C/T ] TTTGCTATGTTTATATGATTTTAATAGACAGCATAACGAGTGTTAATTA  
CATTAACTAGTATAATCACACCCTCTATCGTGTTTTTTTTTTGTGCAATGATACAAAAGCA  
GGACGTGAAAAGAATCGTGACTGTTTTTTGTCCAGTGTTAAAGGTAGTGGTCTTTTCACTTGT  
TATTTATGGGTTAATCCCCGCAATACCTGTTCGTGAGGGAGATCTCCATGGCTCGCTGGCG  
ATGGCCGAGGACCTTGAAGTGCAGGACGACTTCACTCGACACGCCACCGAGTTGGGGC  
CCTCGTTCATTTGTATCGGATGTCCCGCATGGTGTAG

>LDH\_Cydia pomonella\_CpRR1/Krym-61

AGGGCGAGATGATGGACTTGC [ A/G ] GCACGGCTCCGCCTTCATGAGGAACGCCAAGATACA  
AGCCAGCAAGGGTGAGATCAAACACTTGCTAACGTTTACATTAACAGCATGCTTCTGATTT  
CATCCAATTTGGGTTGGTTCGAATTTAATATGTTTTGTGTTATGTTGGCAATTGGCCTGAAC  
CACAAACTGAGTTCAGACTT [ GTG/A-- ] AT [ G/A ] ATATGGGCAACTAGGTCAGTTTATT  
GCTGACGTGGACGACCATCATGTCATCTTTACACAATACTGAATTCAGTAACTTTAAGTA  
TTTTACCCGTAACAATATAGAGGTA [ ----  
/CCTA ] ATAATTTTCATCAAAGGCCATCTTCGTCTTAAATCTTTGAAATACATTTTTAGAATA  
GGTAGTTTTTATGAGGCCTAAAATTTACTTAATATCATTTTGAACAGGC [ A/G ] AATTTAA  
AGTAGGTACCTAGTTATTAATATGTTGTAATGAT [ C/T ] ATCATAACAGATTATTCGATATCG  
GCGGGATCGAAGATCTGCATCGTGACGGCGGGCGTGCAGGACGCGAGGGAGAGACACGCCT  
CGACCTGGTGCAGCGCAACACCGATGTACT

>ShakerIntron1\_Cydia pomonella\_CpRR1/Krym-61

GTCGTTTCGTTTGAAGGGAGAGGTTTCTCTTCTTCCTTTATGAAACCTTCATCCTCACTGTAA  
TAGACGTTATATAAAATTTGTTCAATATTCCTATAAAGTAACTACAAATTAAGACACTATTTT  
TACAAAATCATGAACAGGCAATTTCTCAGTAATTTCTAAACACACTAAGTGTGCCTATGTTGTT  
CTTGAAAAATGGAATA [ C/T ] TTATAAAAAAATATATATATAGGTATATAAAATGCCAAAA  
TTTGGTGTGTACCGGAATTTGTTGGTGGCTTGCTCGCCAAGTTCGTAAACTTAATTTCTC  
CGAGAATACGTCCAGCGGAACATTGACCGGACGCCGCAGTCGTCCGCC

>Thioredoxin\_Cydia pomonella\_CpRR1/Krym-61

CTCTGTGAAGATCAAGGGTCCCGC[ C/T ]GACAAGGGCCCCAAGTCCGTGAAGCTGTTTCATC  
AACCAGCCGCGCACGTTGGACTTCGACCAGGCCTCTGGGAACACCTCCGTGCAGGA[ T/C ]T  
TGGAGTGAGTACTTCTAGTCAACTACGCTGTTGGACATATGTCCCCCAAATTATT[ G/A ]A  
GAACTGC[ G/A ]AACTCCTAGTATGCTGCACTCCATTGCTTGCTGGCAAATC[ A/T ]TGAGT  
TGGGA[ C/T ]TTCTGGGCTTCCGTTATGTACAGACTTAT[ T/C ]ACTAAATAATTACTAAGG  
CAGCTATTTCTATTCTAGAAGTACCTAAATAATAAGTACTT[ C/T ]TAGAAACATGCATATC  
ATCACAACACCTCAAATATGGGCAGTCAAACCTCTCGG[ T/C ]AATCAAACGC[ ATCTCTCT  
/----- ]CGG[ CA/-- ]AT[ CAAA/TGG- ]TTTGGGGTTGGGGGGACTATAAAGGAGCC  
CACTGGTTAACCGTCCGCTATCGGCTTGTCAATTAGAACAAAAAGTTGACAGTTC[ T/C ]GA  
ACTGACAGGCCGATACCGTCCAGTGGACTGTAATCAGTGGGCCCTTAACTCG[ C/T ]AATA  
CATTAACTAACATTCCCACCTCCAGGCTCACTCCAAACGACGTGGAAGGCAACCCGATCC  
CCCTCAAGTTCGTAAAGTTCCAAAGCGTCCAGAACATCCAGCTGTTTCATCAAAGACAACCAG  
TC[ G/T ]GGCGGCGACGTGACGCAGATCGACCACCTGGCGTTCTATGGCA[ C/T ]GCCGGTC  
[ C/G ]CCACTACCAACATGGGCGAGTTC

>ATPbc\_Cydia pomonella\_CpRR1/Krym-61

CTCAAGACCAGCTAATGGACGTGTACGAGCGCCTGGACGAGCTGAGCGCGGACACGGCGCAA  
GCCCCGCGCGGCCAACATCCTGAACGGTCTCGGCTTACCAAGGAGATGCAGCAGAAGGCCAC  
CAAAGACTTCTCCGGAGGTAACACTTTTAAGGCGCCATTCATTTATTACATAAGCCGATTTA  
GTTCGACGGTGT[ T/C ]TTATTTTTTCTTACAAGAGAGTGGGACAGGTTGATAGTTCTTACGT  
AATATCACAAACA[ C/T ]GCACAAAGTTAAGATTATGCTTTGGAAAAGCGCGAGCATTCTTC  
ACTTCTTTTCGGCTTGGTCAAACCTATTATTGTAACAACACATTTTCATATTTACTCGAGCTGT  
TTTCAC[ G/A ]CTTTAAATATCAAGTTCCCTCCAAGGCTGTGGAATATGCTACCTGCCGAGAT  
TTTCTC[ G/T ]AGGGTCTACAGTATGAGTTTCTGCAAAAAACCGGACAAGTG[ T/C ]GAATC  
GGACTCGCCCACCGAGGGTTCCGTACTTTTTAGTATTTGTTGTTATAGCGGCAACAGAAATA  
CATCATCTGTGAAAATTTCAACTGTCTAGCTACCACGGTTCATGAGATACAACCTGGTGACA  
GAC[ A/G ]GACGGACGGACAGCGAAGTCTTAGTAATAGGGTCCCGTTTTACCTTTGGGTAC  
GG[ C/A ]ACCCTAAAAAGGAGTGTACAGATTTATAAAGG[ C/T ]GAGCCGTA[ T/C ]GCTTG  
TG[ G/T ]TGCCA[ T/A ]CGTCGTGGTAAAAAAAATGTGTTGTGTGTTGATATCAACTTGAA  
ATTTCTAACTCTACTTTAAATTTATATACTGATTACTGATGCACTGCGAGTAAGATCAAGTC  
ATTTTCAACTCG[ G/A ]GAGATTTTCGAGGTTTGAATGTGGGTTCTAACTCTAACTATAACGT  
ATCATTTTGTAA[ -/A ]CAGGGTGGCGTATGCGTATAGCGTTAGCACGCGCGCTGTACGTGA  
[ -/A ]GC[ -/C ]ACACTTGCTACTGCTGGACG

>RpS23\_Cydia pomonella\_částečná sekvence\_CpRR1/Krym-61

TG[T/C]TW[A/T]ATTCATTACTAAACGAATGGC[C/T]CGACTTTCACTTCAAATAAGGT  
TAAAAAACTGACTTTCGAGGCA[A/T]GGCCAACAATTGATTTTAAATAAAAAATGATTTTGA  
TACATTTTAAAGTTTACATTTAGAGAAGACAAGTAACCTCAATAATATAATGGTAACAATTAA  
GAGTCACACGACGAACACAAAAGAGGATTTGTGTGATTCTCAAGTAACTAGTGATATGGTGA  
GATAGTACAACCTGTTTTAGTCCTATCAAAAAAAGACCATATAATCATGTGACCAAACATGT  
T[A/T]AGCCATTAACGCCCATCACATACAAAGCGATAATATACCAAAGATATTATATTA  
GGAATCTTAAGATAATATATAGTTTGGTATACTACAATTTTAGTATATTTAGTCTTTTTTCAC  
AATGTATATGCTATACAGACAGCGATATATATTTTGGTAATGTTGACGTGTGTGGTGTCTCAA  
CTATACTATTGGTACATATATTAATATATATTTTCACTCTGTGAAGAGCTAAGGCAGTAGGT  
AATGGAGAAATCAGATACACAACATAGGTACTAAGGTTGACATTCCTAAAAATTTAAGAACT  
TCTGTCTTGTTTCAGGTTAAATGAATTTACTGCCGGTGTTTAATACAAAACTGACCTCGAGC  
AAATTTCTTA/CAT]A[AAAG/TCTA]AG[A/G]TGTAATCCATGCTTCGTGAAATAACA  
GCATGGTTGAAAATGTCCACCATGGTTG[A/G]AA[A/C]TGACAAGACATGGTTATTAGAA  
GATAAAGAGAAAACCTAAAAAATATGTGTGCTACATTAATATTGTCACAATTTCTCTGTGA  
TGATGACAAAGAGAGTAATATTGGGTTTAATGATTTTATCCAACATCAATTTTATTCAACAT  
TATTTAACAGGTCACTTACATAACTATTGGCAATTATTTAACCCAATACAGGAGATTACAGA  
TGCATAGCTAACAGCTAAGTAAATAATTTTCGCATTGGTTAATATAAAGCAAACAGAGATAT  
GAAATATATAAAATAAAGTG[T/G]TTTAAGTAACAACAAGCATATTTTCAGCTGTACATTCC  
AGTCGTCCTCAAAGTTACTG[G/A]ACTACTACTTTTAAACAGTAATGCCACAGCAGGTAAAA  
TCCAACACAATAGTTTCAGCTACAGTTGAACCTGACCATAAATTGGTATTAAAAAAAGG[C  
/T]

>Shaker\_Intron2\_Cydia pomonella\_CpRR1/Krym-61

GTCATCATTAGCTTCCCGTCACTTAAT[W/-  
]AAAATAGCTTTTACACCATTTTCGATAGAGAAAGTTCCAGTTTTTTTTTTTCGGCGATGTTT  
AGGCATGATTGCAATATGTTGAATCACGTCGTAGTGTCCATGTCGTAGCAACCTCTTCACTC  
TGTAGGTTTTCTGTTACGTATTAAGTATTACTTTTCAGTTCAACTTGACCTAACTACATTGAT  
TAAAGTGCAAGA[A/G]CCGAGAAGAGATGTGTTGTTTATCTTTATATTGTTTGGATCTCCG  
TAGTTTATGTCACTCTAAACGATTATAAGATGGCCAATGCGTTTTAACATGTTTTGCACTTA  
AACTGCATGTAGTTGCTGGCGCTAAACTCAATATGCAACGCGATAAATTGCAATGCTGAATT  
TCAGAAACAATAAAAAGCTAGCGAGTGTGAAAGGTGATGAATGAAATTGTTATTATTTAATA  
ATCTTATTTTGTCTCTGCGAATGGTC[C/T]TCTATACGATAATAACTATTTCTTATGAGAAC  
GTTATATTGGTTTTAATAATTATGTTATGTAGGAGTATGTGCAAGTAGACGTATTTTTATTA  
GGTATGTACATGAATACATCAATCGAGTAACGCATGTTACCCGTCACGGCGTTCATCTTTTT  
CATTACCTACATCATAGATTGATCTTTCAATCGTAGCTTAATCTTGTCTTATTTAAATGTTA  
CGCGTAGATACAATCGGTAATAAAGTAATGAATATGGTTGTCTAATGA[T/A]TGCGTGTTC  
TCGTTAGGCCGTTGGAGTGTGGGGGAAAATTGTCGGTTCGCTGTGTGCGATCGCCGGTGTG  
CTCACCATCGCGCTGCCGGTGCCCGTCATCGTCTCAACTTCA

>IDGF\_Cydia pomonella\_částečná sekvence\_CpRR1/Krym-61

CCGCCCAATCTACGCCCCACAGAACCGCAATCCCCTGTTGAACGCTGATTCTGCTGTTTCT  
TACTGGTGAGTCTCTCCTCGTGGGTTTACGAGTACTTGCACTCTACAAGTTGATCGTACACA  
GCCCTTTCTACGCCGAATAGAACCGAGATCCCTTTTTTAATGTCCACTCTGCTTTTGGA  
AGGTGCATATTCTACTTAGAGATTGAATAACCCTTTAAGATGCC[ T/A ]GCTACACCGCTCC  
CCATCTTTACATGCACAATGGGGATGTCCCTGTATTTAAAATAAGTTATTTACACCATTCA  
CGAAATGAAGCAGTAGACCAGCAGCAC[ -  
/A ]CACAAAATATTACAAAACCTAGACCGCAGTTATTTTCAGACACAATTTCTATTTAATA  
AATCCGAAAGAACTACATATGTATAAAGAGTAGGTAATTTGTTTTGTTTTTCATATAGATTT  
CATAGTGGCTAATACAGTTCGAAAAAGAATTTGACTGTGATTTGACTAGTCAGTAACTAC  
CCTATTTGTATTATTCTCACATGGTGTGCTGCAAACGGAGCTATGCGGTGAAACTGACAACACC  
AACTACCAACGTGAAAAGCAGGACCGATTACAATTTGTGAACTATTTACCAGCGAGTTTCGG  
AGGAGTCTTTTGCTTACCGAAAAAGAAAAGAAGGAAAAATTACCAAGGCCTCCAGTATTCAG  
AGCTGTTATCGAACAGCACCCCTCTGTTACATATGCCTAGACCGCTCGGCCATCCGGTCAC[ A  
/G ]GTGGCATGGGTCGAA[ TGC/ATT ]TCC[ C/T ]AAGTATATGGCAAGGCTTCCTCAAAGC  
TTGGGCCGCCACTGAGCCCAGAGGATACTGGTTCGATTCCTAGCTCTGGACACTGGACGCCT  
TGGTCATTTTTCTTCGTATATAACATTCTTTTCGGTTTATGGTTTACATAATAGTGTCTAC  
TTGAAATAATACATATTTAAATATTTTCATTGAGAGTAATTTAATGTGTTCTTAGTTTTTTT  
TCAAGTTGGTTTTTTTTGTAGATTTTTTTTGAGAGTTCCCCAGGTCATAAACTTTCCCTATGAT  
ATTCCGTCAGGCTTCAGCATGGCGCCGCCAGCACCAAGATTGTTCTCGGCATCGCCACCTAC  
GCCCGCACCTGGAAGCTTGATAGTGACAGCGAAATCTCAGGCGTGCCCTCCCCTCCACGCAGA  
CGGAGCCGGTGAAGCTGGTCCTTACACCA