

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Mapování karyotypu mšice broskvoňové
(*Myzus persicae*) metodou BAC FISH

Bakalářská práce

Miroslava Šlajsová

Školitel: RNDr. Petr Nguyen, Ph.D.
Konzultant: Leonela Z. Carabajal Paladino, Ph.D.

České Budějovice 2016

Šlajsová M (2016) Mapování karyotypu mšice broskvoňové (*Myzus persicae*) metodou BAC FISH. [Karyotype mapping of green peach aphid *Myzus persicae* by means of BAC FISH. Bc. Thesis, in Czech]. p. 24, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation:

Green peach aphid (*Myzus persicae*) is one of the most important crop pests worldwide. Excessive use of insecticides such as organophosphates or neonicotinoids led to rise of resistance, which can be associated with karyotype changes. In this thesis, BAC clones were selected and mapped to *M. persicae* chromosomes by fluorescent in situ hybridization.

Prohlášení

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.

České Budějovice 22. 4. 2016

.....
Miroslava Šlajsová

Poděkování

Můj velký dík patří Františkovi Marecovi za to, že mi umožnil stát se součástí jeho skvělého týmu a za nemalé zkušenosti, které jsem nasbírala během bakalářské praxe v jeho laboratoři. Největší poděkování si zaslouží Petr, který měl se mnou neskonalou trpělivost a vždy mi ochotně vše vysvětlil a pomohl vyřešit každý problém, který se vyskytl. Dále bych ráda poděkovala Leo, Irence, Martě, Aniče, Magdě a Jindře, které se velmi ochotně podělily o své zkušenosti a mohla jsem se na ně vždy spolehnout a obrátit s každou nesnází. Také chci poděkovat Marušce za to, s jakou péčí se stará o rostliny i hmyzí chovy. Samozřejmě nesmím opomenout obrovskou důvěru ze strany mé rodiny, která mě podporovala po všech stránkách a bez níž bych to jen těžko zvládla. Všem Vám moc děkuji.

Obsah

1 Úvod	1
1.1 Obecná charakteristika mšic.....	1
1.3 Význam mšic.....	2
1.4 Cytogenetika mšice broskvoňové.....	4
2 Cíl práce	7
3 Materiály a metody	8
3.1 Chromozomální preparáty	8
3.2 Izolace genomové DNA	8
3.3 PCR a gelová elektroforéza.....	9
3.4 Koloniová hybridizace	9
3.5 Izolace plazmidové DNA	10
3.6 Značení sond	11
3.7 BAC FISH.....	11
4 Výsledky.....	13
4.1 Ověření přítomnosti symbiontů v končetinách mšice broskvoňové.....	13
4.2 Selektce pozitivních BAC klonů	13
4.3 Mapování vybraných pozitivních BAC klonů.....	16
5 Diskuse	17
6 Souhrn	19
7 Seznam literatury	20

1 Úvod

1.1 Obecná charakteristika mšic

Mšice (Hemiptera: Aphididae) představují velmi starou skupinu, jejíž fosilní záznam sahá až do druhohorního triasu, tj. do doby před přibližně 220 miliony lety. Mšice čítají na 5 000 druhů, přičemž většinu z nich lze potkat v mírném pásu severní polokoule (Grimaldi & Engel, 2005). Ať už narazíme na okřídlenou formu či jedince bez křídel, zpravidla je nalezneme na živných rostlinách při sání jejich mízy (Hales et al., 1997).

Okřídlené formy mšic mají samozřejmě tu výhodu, že mohou přelétat na nové rostliny, jestliže je například hustota jejich populace už příliš vysoká nebo je hostitelská rostlina již vyčerpaná. Také mohou snáze unikat při případném setkání s predátorem. Na druhou stranu musejí investovat energii, kterou by jinak využily pro reprodukci, do výstavby křídel a létacích svalů (Brisson, 2010). Nymfy okřídlených mšic se vyvíjejí delší dobu, pohlavně dospívají později a i přesto, že mají delší reprodukční období a dožívají se vyššího věku, jsou méně plodné (Ogawa & Miura, 2014).

Nicméně nejen kondice hostitelské rostliny, predace a hustota populace mšic má vliv na výskyt okřídlené formy. Vznik křídel u stádií do čtvrtého instaru, ne starších, mohou potlačit např. parazitoidi. Naopak patogeny napadající mšice podporují vznik okřídlených forem u sousedních kolonií a také patogeny hostitelských rostlin zvyšují tendenci tvorby křídel (Müller et al., 2001).

1.2 Partenogeneze mšic

Výskyt okřídlených forem úzce souvisí se složitým životním, respektive ročním cyklem mšic (Müller et al., 2001), během něhož se střídají živorodé partenogenetické generace, kterých obvykle bývá 10-30, s jednou pohlavní generací kladoucí vajíčka (Ogawa & Miura, 2014). Počet partenogenetických generací, podobně jako výskyt samců v populaci, závisí na teplotě, fotoperiodě a dalších faktorech (Poupoulidou et al., 2006).

Většina mšic žijících v mírném podnebném pásmu nedokáže přežít teploty pod bodem mrazu, a proto na podzim dochází k pohlavnímu rozmnožování, jehož výsledkem jsou oplozená vajíčka schopná přečkat díky diapauze zimní období (Brisson, 2010). Na jaře se z nich poté líhnou bezkřídlé samičky dále se rozmnožující pouze nepohlavně (Hales et al., 1997), čímž se snaží maximalizovat velikost populace a její rozšíření. Asi 10% druhů mšic navíc mění svého primárního hostitele, jímž jsou dřeviny charakteristické pro jednotlivé druhy, a na kterém setrvávají od podzimu do léta. V létě se díky přítomnosti okřídlené formy přesouvají na nového bylinného hostitele (Grimaldi & Engel, 2005), kde se rozmnožují partenogeneticky a tvoří tak rychle rostoucí klonální kolonie až do podzimního období, během něhož se na základě zkracování délky dne a snižování teploty opět objeví v populaci

okřídlení samci a po návratu na primárního hostitele tak může dojít k oplození vajíček, která dokážou přežít nepříznivé podmínky (Müller et al., 2001). Tento způsob rozmnožování je nazýván cyklická partenogeneze (Hales et al., 1997). Mšice tak využívají jak výhod pohlavního rozmnožování, které umožňuje vedle již zmíněných mrazuvzdorných vajíček také vznik nových genotypů nebo opravu některých škodlivých mutací (Simon et al., 2002), tak i nepohlavního množení, které jim umožňuje rychle zvyšovat velikost populace. Partenogeneze je u mšic spojená s viviparií, tj. s rozením živých potomků (Davis, 2012) a tzv. teleskopickými generacemi, což znamená, že vnučka určité samičky se začíná vyvíjet, ještě když se vyvíjí její dcera uvnitř těla této samičky. Jestliže má navíc mšice příznivé podmínky, stačí jí od narození do první reprodukce pouze týden až deset dní (Hales et al., 1997), což jí umožňuje vyprodukovat nespočet potomků za relativně krátkou dobu (Loxdale, 2008).

Druhy mšic žijící v teplých oblastech mohou zcela postrádat pohlavní generaci a rozmnožovat se pouze partenogeneticky (Poupoulidou et al., 2006). V souvislosti s touto tzv. apomiktickou partenogenezí, tj. klonálním či nepohlavním rozmnožováním (Simon et al., 2002), se často hovoří o existenci geneticky identických klonů mšic (např. Davis, 2012). Nicméně se ukazuje, že klony, respektive asexuální linie, rychle mutují, čímž vzniká genetická variabilita umožňující přírodní selekci a adaptaci (Loxdale, 2008).

Bylo prokázáno, že se příslušníci jedné asexuální linie v rámci stejného druhu mohou lišit například barvou, počtem ovariol (a tudíž embryí), adaptacemi na hostitelskou rostlinu nebo obranyschopností vůči predátorům, patogenům, parazitům či insekticidům (Loxdale, & Lushai, 2003). Jak moc jsou odlišné či shodné lze otestovat pomocí molekulárních markerů. S použitím mikrosatelitů lze například zjistit, zda se jedná o populaci mšic s preferencí vůči určitému druhu hostitelské rostliny či generalisty, kteří mohou hostitele měnit, případně se na něj adaptovat (Loxdale, 2008). Příkladem jednoho z polyfágních druhů je mšice broskvoňová (*Myzus persicae*), jejíž hostitelské spektrum může čítat i více než 400 druhů rostlin (Bass et al., 2013).

1.3 Význam mšic

Do hostitelského spektra mšic se řadí i mnohé hospodářsky významné plodiny, a jestliže vezmeme v potaz jejich schopnost rychlé adaptace (Loxdale, 2008), krátkou generační dobu a kolonizační možnosti dané existencí okřídlených forem (Hales et al., 1997), můžeme tento mízu sající hmyz zařadit mezi jedny z nejdůležitějších škůdců na světě. K tomu je třeba připočítat fakt, že se jedná o velice významné přenašeče rostlinných virů. Mšice mohou přenášet až 197 různých virů což představuje 28 % všech rostlinných virů (Hogenhout et al., 2008).

Z těchto důvodů pochopitelně roste snaha o kontrolu populací mšic v zemědělství. Děje se tak bohužel často pomocí nadměrného používání insekticidů, což vedlo u řady druhů ke vzniku rezistencí, jejichž mechanismus závisí na druhu a množství právě používaného insekticidu (Field & Foster, 2002).

Byly pozorovány dva hlavní mechanismy rezistence vůči insekticidům. Jeden z nich je založen na zvýšení produkce metabolických enzymů schopných odbourávat chemické látky toxické pro organismus. Nejčastěji se jedná o esterázy, glutathion S-transferázy a cytochrom P450 monooxygenázy. Zvýšení produkce detoxifikačních enzymů mohou způsobovat mutace v regulačních oblastech genů kódujících tyto enzymy nebo jejich amplifikace. U druhého typu mechanismu způsobují mutace různou míru necitlivosti receptoru, na který je insekticid zacílen. Jedná se například o sodíkový kanál, GABA receptor nebo acetylcholinesterázu (Bass & Field, 2011). Kupříkladu v případě tzv. mutace kdr („knockdown resistance“) vedou bodové mutace v transmembránové doméně sodíkového kanálu k necitlivosti nervového systému rezistentních mšic vůči pyrethroidům či DDT (Martinez-Torres et al., 1999). Na nervovou soustavu mšic, přesněji řečeno na enzym acetylcholinesterázu (AChE), jsou taktéž zaměřeny organofosfáty či karbamátové insekticidy. I zde jsou příčinou necitlivosti acetylcholinesterázy vůči insekticidům představující analogy neurotransmiteru acetylcholinu, přirozeného substrátu pro AChE, bodové mutace (Moore et al., 1994, Mutero et al., 1994).

Také v druhém případě však může hrát roli amplifikace genů kódujících receptory (Bass & Field, 2011). U mšice broskvoňové byla popsána duplikace genu kódujícího podjednotku GABA receptoru, který je uváděn ve spojitosti s rezistencí vůči endosulfanu jakožto jednoho z cyklodienových insekticidů. Na rozdíl od ostatních druhů hmyzu s touto rezistencí, u kterých dochází k substituci jedné aminokyseliny, konkrétně alaninu 302 za serin popřípadě vzácněji za glycin, v podjednotce GABA receptoru, rezistentní populace mšice broskvoňové disponují dvěma lokusy, při čemž jeden nese alespoň jednu rezistentní alelu, v níž dochází k záměně alaninu za glycin. Druhý lokus, jehož obě alely obsahují serin, s rezistencí nesouvisí (Anthony et al., 1998).

Necitlivost k organofosfátovým a pyrethroidovým insekticidům je často provázena metabolickou rezistencí zprostředkovanou karboxylesterázami (Field & Foster, 2002), které hrají zásadní roli při obraně mšice broskvoňové proti insekticidům. Konkrétně se jedná o dvě sekvenčně téměř shodné esterázy označované jako E4 a FE4, které jsou schopné hydrolyzovat toxické látky, jakými jsou například organofosfáty či karbamáty (Devonshire & Moore, 1982, Field et al., 1993). Aktivita těchto esteráz je u nerezistentních jedinců velmi nízká (Devonshire & Moore, 1982). V případě mšice broskvoňové je proto příslušný gen amplifikován, což vede ke zvýšení hladiny detoxifikační esterázy E4, popřípadě FE4.

V drtivé většině případů jedinci nesou pouze jeden z těchto genů, ačkoliv byly prokázány vzácnější případy výskytu obou genů v rámci téhož klonu (Blackman et al., 1999). S rostoucím počtem kopií genů kódujících E4 a FE4 enzymy stoupá také letální dávka insekticidu, při čemž nerezistentní mšice mají pouze dvě kopie v diploidním genomu, zatímco nejodolnější populace označované jako R₃ mají v genomu až 80 kopií těchto genů (Field et al., 1999). Nově bylo zjištěno, že amplifikace genu pro cytochrom P450 přispívá k adaptaci některých populací mšice broskvoňové k nové živné rostlině, tabáku. Metabolická rezistence vůči nikotinu produkovaného tabákovými rostlinami navíc také umožňuje odbourávání hojně používaných insekticidů podobného chemického složení, tzv. neonikotinoidů (Bass et al., 2013). Na druhou stranu existuje opačný případ, kdy může již rezistentní mšice broskvoňová o tuto pro ni výhodnou vlastnost přijít. Ztráta rezistence u této mšice souvisí s metylací DNA, která může významně ovlivňovat regulaci transkripce genů (Glastad et al., 2011). Ztráta metylace amplifikovaných genů je tak u mšice broskvoňové spojena se ztrátou rezistence (Field et al., 1988).

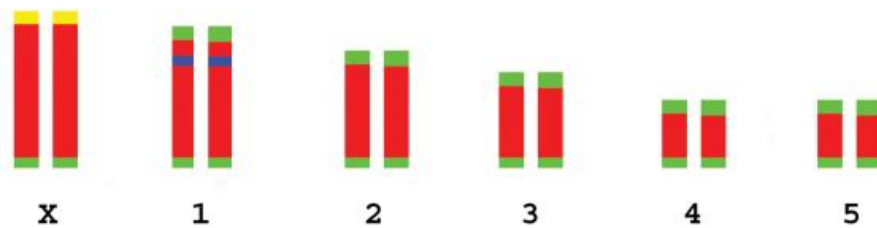
1.4 Cytogenetika mšice broskvoňové

Standardní samičí karyotyp mšice broskvoňové je $2n=12$ a skládá se z pěti párů homologních autozomů a dvou pohlavních chromozomů X. Samčí pohlaví X0 vzniká eliminací jednoho ze dvou samičích chromozomů X v průběhu modifikované mitózy a to tak, že zatímco autozomy segregují nezávisle, X chromozomy jsou spojeny navzájem konci, na rozdíl od běžné mitózy, při níž k sobě podélně přiléhají a připomínají tak písmeno C. Jeden z chromozomů je tudíž z komplementu ztracen a sesterské chromatidy druhého chromozomu X se rozcházejí do dceřiných buněk (Novotná et al., 2011).

Nicméně v populacích mšice broskvoňové byly nalezeny karyotypy s počtem chromozomů pohybujícím se od 12 až po 17 (Monti et al., 2012b). Rozdíly v počtu chromozomů i v jejich struktuře (Mandrioli et al., 2014) byly přitom zaznamenány nejen mezi embryi různých jedinců stejné populace, ale i mezi jednotlivými embryi jednoho jedince a dokonce i v rámci jednoho embrya (Monti et al., 2012b). Tento fenomén je způsoben opakujícími se zlomy v určitých místech zejména na chromozomech X ale také na autozomech 1 a 3 (Monti et al., 2012a). Fragmentace chromozomů je přitom usnadněna jejich holokinetickou organizací, tj. absencí centromery. Mikrotubuly dělicího vřetenka se během dělení buňky připojují po celé délce chromozomu, což umožňuje řádnou segregaci chromozomálních fragmentů a jejich přenos do další generace (Manicardi et al., 2015b). Studium telomer mšice broskvoňové navíc ukázalo, že jedinci s variabilním karyotypem mají telomerázu schopnou *de novo* syntézy telomer, která fragmenty stabilizuje (Monti et al.,

2011). Udržování variability je dále zajištěno apomiktickou partenogenezí (Monti et al., 2012a).

Absence centromery komplikuje identifikaci jednotlivých chromozomů, která je u mšice broskvoňové možná pouze na základě jejich délky a přítomnosti specifických chromozomálních markerů detekovaných pomocí fluorescenční in situ hybridizace (FISH). V praxi se využívá 169 bp dlouhá tandemová repetice lokalizovaná v subtelomerických oblastech všech chromozomů mšice broskvoňové s výjimkou jednoho konce chromozomu X (Spence et al, 1998), který nese tzv. organizátor jadérka („nucleolar organizing regions“, NOR), sestávajícího z tandemově opakované transkripční jednotky genů pro hlavní ribozomální RNA (rRNA), tj. 18S, 5.8S a 28S rRNA (Manicardi et al., 2015a). U mšice broskvoňové byly použity i další chromozomální markery, jako například 5S rRNA geny či geny kódující histony. Ukázalo se, že histonový klastr, stejně tak jako 5S geny, byl lokalizován na největším z autozomů, na chromozomu 1 (Mandrioli & Manicardi, 2013) (Obr. 1). Dalším příkladem používaných DNA markerů jsou vysoce repetitivní sekvence tvořící specifický vzor v heterochromatinu intersticiální oblasti chromozomu X (Mandrioli et al., 1999).



Obr. 1. Schématické znázornění standardního samičího karyotypu mšice broskvoňové. Karyotyp sestává z pěti párů autozomů (1-5) a páru pohlavních chromozomů X. Barevně jsou vyznačeny některé z používaných chromozomálních markerů, jakými jsou např. subtelomerická repetice (zeleně), geny pro hlavní ribozomální RNA (žlutě) a histonové geny (modře). Geny pro 5S rRNA nejsou uvedeny. Převzato a upraveno Mandrioli et al. (2014).

Stojí za povšimnutí, že fragmentace týkající se pohlavního chromozomu X mají patrně souvislost s oblastmi heterochromatinu obsahujícího satelitní DNA. Takovéto změny jsou považovány převážně za selekčně neutrální a nevedou k významným fenotypovým změnám (Blackman et al, 2000). Pokud ovšem přestavba zasáhne genové oblasti, může dojít ke zvýšení exprese přítomných genů. To je právě případ genu kódujícího E4 esterázu, která, jak již bylo uvedeno, hraje klíčovou úlohu v rezistenci mšice broskvoňové vůči řadě insekticidů (Monti et al., 2012b). E4 geny se nejčastěji nalézají v subtelomerické oblasti středně velkého chromozomu 3 označované jako 3^T (Blackman et al., 1999). V tomto místě dochází

k translokaci mezi chromozomy 1 a 3, která je spojena s amplifikací E4 genů (Blackman et al., 1995). Naproti tomu u mšic, u kterých nedošlo k 1,3 translokaci, je amplifikována esteráza FE4. K amplifikaci v takových případech může docházet v poloze cis i trans (Blackman et al., 1995), zpravidla však v subtelomerických oblastech chromozomu 1 (Blackman et al., 1999). Prokázaná spojitost mezi chromozomálními přestavbami a rezistencí vůči insekticidům u mšice broskvoňové vedla k intenzivnímu studiu chromozomálních přestaveb.

2 Cíl práce

Negativní dopady mšice broskvoňové, jakožto jednoho z hlavních celosvětově rozšířených škůdců, vedou ke snaze o její efektivní kontrolu. Vůči většině v zemědělství používaných insekticidů si však již řada populací mšice broskvoňové vyvinula rezistenci.

Jak již bylo uvedeno, některé z těchto rezistencí jsou spojeny se změnami v karyotypu mšice broskvoňové. Její karyotypová analýza je však značně limitována výše zmíněnou chromozomální nestabilitou a absencí vhodných cytogenetických markerů pro většinu chromozomů. U motýlů (řád Lepidoptera), kteří představují další skupinu s holokinetickými chromozomy, se při výzkumu chromozomálních přestaveb osvědčilo fyzické mapování chromozomů metodou fluorescenční in situ hybridizace s bakteriálními umělými chromozomy (BAC FISH) (Yoshido et al., 2005, Nguyen et al. 2013).

Cílem této práce bylo (i) vybrat z dostupných umělých bakteriálních chromozomů (BAC) klony nesoucí inzert pocházející z genomu mšice broskvoňové, (ii) ověřit možné využití metody BAC FISH při mapování karyotypu mšice broskvoňové a (iii) zamapovat identifikované klony na jejích chromozomech.

3 Materiály a metody

3.1 Chromozomální preparáty

Mšice *Myzus persicae*, byly udržovány v plastových krabičkách na jednotlivých listech zelí pekinského (*Brassica rapa*) a naklíčených rostlinkách hrachu setého (*Pisum sativum*) v 19 °C a denním režimu 15 h světlo, 9 h tma.

Chromozomální preparáty byly připraveny z italského klonu 1X mšice broskvoňové poskytnutým Emanuelem Mazzonim (Università Cattolica di Piacenza, Itálie) se standardním a zároveň stabilním počtem chromozomů $2n=12$. Rozvolněné mitotické chromozomy vhodné pro BAC FISH byly získávány z embryí partenogeneticky se rozmnožujících mšic dle Mediouni et al. (2004). Vypreparovaná embrya byla vložena na 10 minut do hypotonického (0,075M KCl) a poté do fixačního roztoku (etanol, chloroform, kyselina octová; 6:3:1) taktéž na 10 minut. Nakonec byla jednotlivá embrya macerována v 10 μ l 60% kyseliny octové a buněčná suspenze byla rozetřena po podložním sklíčku na plotýnce předehřáté na 45 °C. Takto připravené chromozomální preparáty byly odvodněny v etanolové řadě (70%, 80% a 100%) a uloženy v -20 °C pro pozdější využití.

3.2 Izolace genomové DNA

Byly použity různé metody izolace DNA, které byly vybrány na základě množství a typu získané tkáně a účelu izolace.

Pro izolaci genomové DNA z celých jedinců, byla použita metoda izolace fenol-chloroformem, při níž byla nejprve tkáň homogenizována ve zkumavkách se 700 μ l extrakčního pufru (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 50 mM EDTA pH 8,0, 100 μ g/ml Proteináza K, 0,5 % sarkosyl), ve kterém byla inkubována přes noc při 37 °C. Druhý den byla přidána RNáza A (10 μ g/ml) a vzorek byl dále inkubován při 37 °C 1 h za mírného třepání. Poté byl k vzorku přidán stejný objem fenolu a takto připravené vzorky byly promíchávány po dobu 30 minut. Po promíchání bylo nutné oddělit jednotlivé fáze od sebe centrifugací (5 000 g, 20 min, 4 °C). Horní fáze obsahující DNA byla přenesena do nové zkumavky. Celkem byl tento proces opakován třikrát s fenolem a jednou s fenolem a chloroformem smíchanými v poměru 1:1. Nakonec byla vodná fáze protřepána s chloroformem opět v poměru 1:1. Po další centrifugaci byla DNA ze získané svrchní fáze vysrážena přidáním 0,1 objemu 3 M NaAc (pH 5,2) a 0,7 objemu izopropanolu. Po promytí DNA 70% etanolem byl pelet rozpuštěn ve vodě.

V případě izolace genomové DNA z končetin mšice broskvoňové byla použita souprava NucleoSpin Tissue XS kit (MachereyNagel, GmbH & Co KG, Düren, Německo). Postupováno bylo podle protokolu doporučeného výrobcem. Vzhledem k malému výtěžku byla získaná DNA dále amplifikována za pomoci soupravy GenomiPhi HY DNA

Amplification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, Velká Británie) na základě protokolu doporučeného výrobcem.

3.3 PCR a gelová elektroforéza

Pro ověření přítomnosti DNA symbiotických bakterií mšic v získaných vzorcích gDNA byla použita polymerázová řetězová reakce (PCR) se specifickými primery. Každá PCR reakce obsahovala 80 ng templátové DNA, 1 x Ex *Taq* pufr, 0,2 mM dNTPs mix, 1 µM specifické primery F40 (5'-GCGGCAAGCCTAACACAT-3') a R1060 (5'-CTTAACCCAACATTTCTCAACACGAG-3') (Hypša & Křížek, 2007) a 0,05 U/µl Ex *Taq* polymerázy. Takto připravené vzorky byly inkubovány v termocykléru Biometra® Tpersonal (Scholler instruments s.r.o.) s teplotním profilem sestávajícím z počáteční denaturace při 94 °C 5 min následované 25 cykly obsahujícími 30s denaturaci při 94 °C, 30s nasedání primerů při 52 °C a 30s syntézy při 72 °C. Následně byly získané produkty separovány na 1 % agarozovém gelu v TAE pufru a po obarvení ethidium bromidem vizualizovány pod UV lampou.

3.4 Koloniová hybridizace

Pro účely fyzického mapování bylo k dispozici 96 náhodně vybraných klonů nesoucích bakteriální umělé chromozomy („bacterial artificial chromosomes“, BAC) s inzerty pocházejícími z genomu mšice broskvoňové zkonstruovaných firmou Bio S&T Inc. (Quebec, Kanada). Klony byly laskavě poskytnuty Dr. Chrisem Bassem (University of Exeter, Velká Británie). Vzhledem k tomu, že mšice obsahují symbiotické bakterie, jejichž DNA může být v genomové knihovně vysoce zastoupena (Dr. Nancy Moran, osobní sdělení), bylo třeba ověřit přítomnost DNA mšice ve studovaných BAC klonech. Přítomnost fragmentů genomu *M. persicae* v BAC klonech byla ověřena metodou koloniové hybridizace, užívané právě při selekci pozitivních klonů z velkého množství vzorků, se sodnou připravenou z gDNA izolované z končetin, které neobsahují specializované buňky obsahující symbiotické bakterie.

V našem případě bylo nejprve všech 96 bakteriálních klonů vyseto na plotnu s 1,5% LB agarem obsahujícím chloramfenikol (25 µg/ml) a necháno růst přes noc při 37 °C. Druhý den byly narostlé kolonie obtisknuty na membránu a následně lyzovány v denaturačním roztoku (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) po dobu 5 minut. Poté byla membrána inkubována 5 min v neutralizačním roztoku (0,5 M Tris-HCl, 3 M NaCl, pH 7,5) a nakonec opláchnuta 5 min v 2x SSC (3 M NaCl, 0,3 M citrát sodný, pH 7). DNA uvolněná z buněk byla poté přichycena k membráně pomocí UV záření a přebytečná buněčná hmota byla odstraněna přitisknutím kolonií na čistý filtrační papír. Membrána se zafixovanou DNA byla prehybridizována v 18 ml DIG Easy Hyb roztoku předeřhátého na 42 °C po dobu 30 minut

v hybridizační píce (SciGene, model 2 000). Mezitím bylo 10 ml hybridizačního roztoku smícháno s 1 µg denaturované sondy (5 min při 95 °C). Jako sonda byla použita gDNA vyizolovaná z končetin mšice broskvoňové značená digoxigeninem metodou „nick translace“ (viz kapitola 3.6). Po odstranění prehybridizačního roztoku byla membrána ponořena do hybridizačního roztoku a inkubována 3 hodiny (alternativně přes noc) při 42 °C. Poté byl hybridizační roztok odstraněn a membrána byla dvakrát promyta v dostatečném množství 2x SSC, 0,1% SDS 5 minut při pokojové teplotě. Dále byla dvakrát promyta 0,2x SSC, 0,1% SDS při 68 °C po dobu 20 minut. Následovalo promývání v 0,3% Tween v 1x TBS při pokojové teplotě 5 minut a dále inkubace ve 40 ml blokovacího roztoku [5% sušené odtučněné mléko (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA) v 1x TBE] také při pokojové teplotě po dobu 30 minut. Membrána byla poté inkubována 30 minut při pokojové teplotě s protilátkou konjugovanou s alkalickou fosfatázou („Anti-Digoxigenin-A“; Roche Diagnostics, Basilej, Švýcarsko) ředěnou blokovacím roztokem v poměru 1:1000. Membrána byla poté dvakrát promyta 15 minut ve 40 ml 0,3% Tween v 1x TBS při pokojové teplotě. Poslední promývání proběhla v dostatečném množství 1 M Tris-HCl, 1 M NaCl po dobu 5 minut v pokojové teplotě. Po odstranění tohoto pufru byla membrána položena na uzavíratelnou fólii a ihned byl na ní nanesen 1 ml substrátu 1x NBT/BCIP (Roche Diagnostics, Mannheim, Německo). BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát) je barvivo, které na vzduchu oxiduje a po odštěpení fosfátu samovolně přechází na nerozpustné modré barvivo indigo. Často je používán v kombinaci právě s NBT („nitroblue tetrazolium“), jenž mění barvu indiga na černou a tím ji zvýrazňuje. Překrytím svrchní stranou fólie byl substrát rovnoměrně rozptýlen po membráně a po 10 minutové inkubaci bylo možné na základě enzymatické reakce pozorovat tmavé zabarvení různé intenzity v místě, kde se nacházela pozitivní kolonie. Alternativně byl také použit substrát CDP-Star Ready to use (Roche Diagnostics), který umožňuje vizualizovat pozitivní klony pomocí chemiluminiscence. Výsledky byly pozorovány a vyfoceny CCD kamerou systému LumiImager LAS-3000 (Fujifilm Life Science, Stanford, CT, USA).

3.5 Izolace plazmidové DNA

Klony bakterií byly nejprve inokulovány do 100 ml LB média obsahujícího chloramfenikol (25 µg/ml) a za stálého třepání inkubovány při 37°C po dobu 17 hodin. Narostlé kultury byly ihned zchlazeny na ledu a použity pro izolaci BAC DNA pomocí soupravy QIAGEN Plasmid Midi Kit dle doporučení výrobce s drobnými změnami. Nejprve byly buňky zcentrifugovány (5 000 rpm, 10 min, 4 °C) a rozpuštěny v 6,5 ml pufru P1 (50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNáza A). Poté bylo přidáno 6,5 ml lyzačního pufru P2 (200 mM NaOH, 1% SDS), celý obsah byl opatrně promísen a inkubován 5 minut při

pokožkové teplotě. Po přidání 6,5 ml neutralizačního pufru P3 (3 M octan draselný pH 5,5) byly vzorky inkubovány 15 minut na ledu. Vzniklá sraženina obsahující bakteriální DNA, proteiny a SDS byla následně zcentrifugována (20 000g, 30 min, 4 °C). Získaný supernatant byl poté nanesen na kolonky promyté 4 ml QBT pufru (750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH 7, 15% izopropanol, 0,15% Triton X-100). Kolonky byly dvakrát promyty 10 ml promývacího pufru QC (1 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7, 15% izopropanol). Pak byly umístěny do čistých zkumavek a plazmidová DNA z nich byla vymyta 5 ml elučního pufru (1,25 M NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8,5, 15% izopropanol) přehřátého na 65 °C. Plazmidová DNA byla přesrážena přidáním 3,5 ml izopropanolu, zcentrifugována (15 000g, 30 min, 4 °C) a promyta 70% etanolem. Přesrážená DNA byla rozpuštěna ve vodě a kvantifikována na spektrofotometru Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

3.6 Značení sond

Z vyizolované plazmidové DNA bylo 0,5 µg DNA naznačeno pomocí soupravy Nick Translation Kit (Abbott Molecular Inc., Des Plaines, IL, USA). Reakce o objemu 25 µl obsahovala kromě DNA 40 µM dATP, 40 µM dCTP, 40 µM dGTP, 14,4 µM dTTP, 25,6 µM značené nukleotidy Fluorescein-12-dUTP nebo Cy3-12-dUTP (Jena Bioscience, Jena, Německo), 1x nick translační pufr a 5 µl enzymatické směsi. V případě přípravy sond pro koloniovou hybridizaci byl pomocí téže soupravy a digoxigenin-11-dUTP (Roche Diagnostics, Basilej, Švýcarsko) naznačen 1 µg genomové DNA z končetin mšice broskvoňové. Finální objem reakce byl v tomto případě 50 µl.

3.7 BAC FISH

Fluorescenční in situ hybridizace s bakteriálními umělými chromozomy byla provedena dle Nguyen et al. (2013). Nejprve byla připravena hybridizační směs, která byla složena z 25 µg lososí DNA, 1 µg sonikovaná genomová DNA mšic, 240 ng sondy značené Cy3 a 500 ng sondy značené fluoresceinem. Tato směs byla přesrážena přidáním 1/10 objemu reakce 3M NaAc a 2,5x objem 100% vychlazeného etanolu a rozpuštěna v 50% deionizovaném formamidu a 10% dextran sulfátu v 2x SSC. Takto připravená hybridizační směs byla nakonec denaturována 5 min při 90 °C.

Chromozomální preparáty byly odvodněny v etanolové řadě (70%, 80% a 100% etanol, v každém 30 s). Po uschnutí byl chromozomální preparát blokován 30 minut při 37 °C v 5x Denhardtovo roztoku (0,1% polyvinylpyrolidol, 0,1% BSA, 0,1% Ficoll 400) v 2x SSC. Poté byl preparát denaturován v 70% formamidu v 2x SSC při 68 °C po dobu 3,5 minuty. Ihned poté byl preparát odvodněn v etanolové řadě.

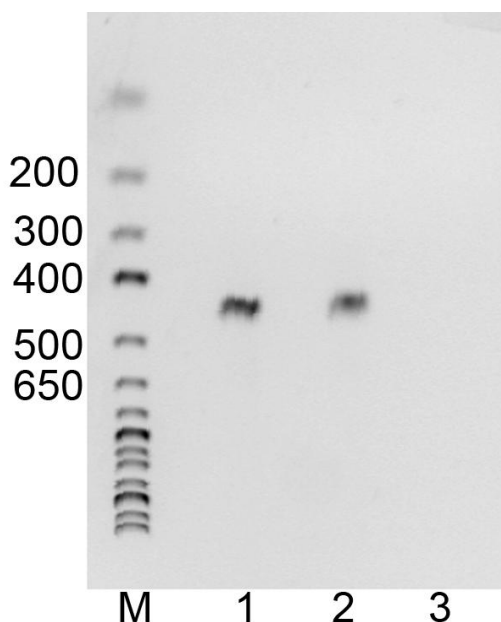
Na každý preparát byla nakápnuta příslušná hybridizační směs, která byla přikryta krycím sklíčkem uzavřeným pomocí lepidla fixogum. Takto připravené preparáty byly inkubovány ve vlhké komůrce 3 dny při 37 °C.

Po třech dnech bylo odstraněno lepidlo a preparáty byly odmyty sérií pracích roztoků: 1% Triton X-100 v 0,1x SSC (5 min, 25 °C), 1% Triton X-100 v 0,1x SSC (5 min, 62 °C), 1% Triton X-100 v 2x SSC (5 min, 25 °C), 1% Triton X-100 v 2x SSC + DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol, 0,5 µl/ml; 15 min, 25 °C), 1% Kodak PhotoFlo v 2x SSC (5 min, 25°C) a nakonec byl preparát ponořen do 1% Kodak PhotoFlo v miliQ H₂O. Po vyjmutí z posledního roztoku bylo na preparát napipetováno 20 µl DABCO (1,4-diazabicyklo[2.2.2]octan). Nakonec bylo na preparát umístěno krycí sklíčko, které bylo zafixováno lakem na nehty a skladováno ve 4°C. Chromozomy pak byly pozorovány mikroskopem Zeiss Axioplan 2 microscope (Carl Zeiss Jena, Germany) vybaveným vhodnými filtry. Černobílé fotografie byly pořízeny pomocí kamery Olympus CCD XM10 vybavené softwarem cellSens 1.9 (Olympus Europa Holding, Hamburg, Germany) a posléze upraveny a obarveny v programu Adobe Photoshop CS6.

4 Výsledky

4.1 Ověření přítomnosti symbiontů v končetinách mšice broskvoňové

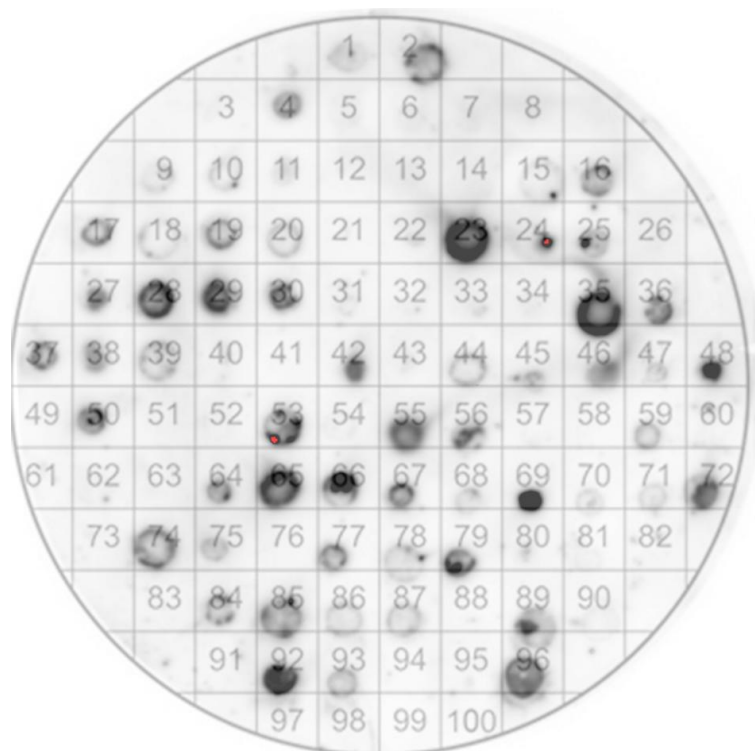
Vzhledem k tomu, že jediná knihovna dosud zkonstruovaná u mšic byla kontaminována DNA pocházející z jejich symbiotických bakterií (Dr. Nancy Moran, osobní sdělení), bylo třeba identifikovat BAC klony nesoucí DNA mšice broskvoňové. Primárními symbionty mšic jsou bakterie rodu *Buchnera* žijící výhradně uvnitř specializovaných buněk nazývaných bakteriocyty, které se nachází v abdomenu mšic (Douglas 1998). K identifikaci BAC klonů nesoucích DNA mšice broskvoňové bylo zapotřebí nejprve získat její čistou gDNA, která by mohla být použita ke konstrukci sondy pro selekci klonů metodou koloniové hybridizace. K izolaci byly tudíž použity končetiny mšice broskvoňové, které by endosymbiotické bakterie obsahovat neměly. Bohužel PCR s bakteriálními specifickými primery ukázala, že i gDNA získaná z končetin obsahuje bakteriální kontaminaci (Obr. 2).



Obr. 2. Elektroforetická separace PCR produktů (~450 bp) amplifikovaných pomocí bakteriálních specifických primerů. **M** - velikostní marker. **1** – jako templát pro PCR použita genomová DNA z celých jedinců mšice broskvoňové. **2** – jako templát pro PCR použita genomová DNA z končetin mšice. **3** – negativní kontrola.

4.2 Selektce pozitivních BAC klonů

I přes pozitivní výsledek PCR se specifickými bakteriálními primery byla gDNA z končetin použita k přípravě hybridizační sondy pro koloniovou hybridizaci, protože se dá předpokládat, že zastoupení bakteriální DNA je v tomto vzorku mnohem nižší než v gDNA izolované z celých mšic. (Obr. 3).



Obr. 3. Selekcce pozitivních BAC klonů pomocí metody koloniové hybridizace.

Z celkem 96 testovaných klonů se A8, B9, C9, D5, D7, E1, E3, G10 a H11 klon nepodařilo ani po opakovaných pokusech nakultivovat. Sonda nehybridizovala k 29 klonům. To může naznačovat přítomnost insertu bakteriálního původu. Nelze však ani vyloučit přítomnost falešně negativních výsledků způsobených špatným přetisknutím kolonií. Pozitivní klony jsou uvedeny v Tab. 1. spolu s relativní intenzitou hybridizačního signálu. Na základě získaných výsledků bylo možné zvolit klony vhodné pro izolaci plazmidové DNA a následnou BAC FISH.

Tab. 1. Pozitivní BAC klony identifikované metodou koloniové hybridizace.

Klon	Označení na gridu	Koloniová hybridizace ^a	Plazmidová DNA	BAC FISH	Chromozom ^b
A1	1	+	ano	ano	L
A2	2	++	ano	ano	L
A4	4	++	ano	ano	L
A9	9	+	ano	-	
A10	10	+	ano	-	
A11	11	+	ano	-	
B3	15	+	-	-	
B4	16	++	ano	ano	L
B5	17	++	-	-	
B6	18	+	-	-	
B7	19	++	ano	ano	L
B8	20	+	-	-	
B11	23	+++	-	-	
B12	24	++	-	-	

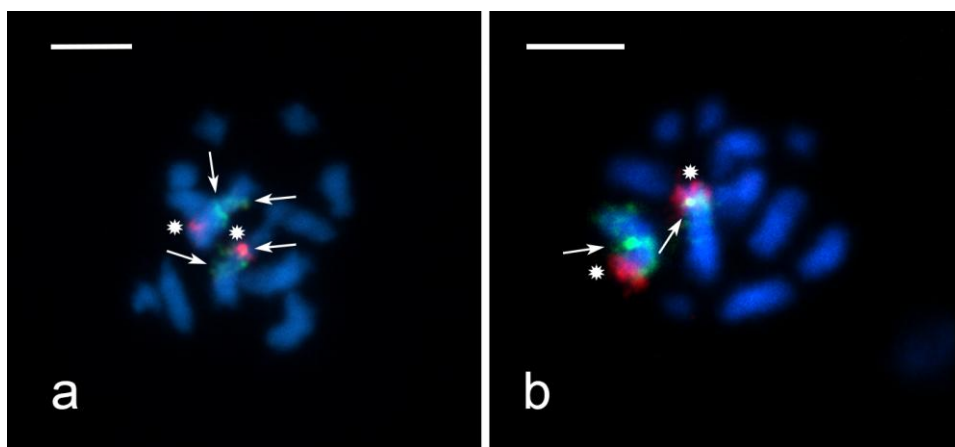
C1	25	++	ano	-	
C3	27	+	-	-	
C4	28	+++	-	-	
C5	29	+++	ano	ano	L
C6	30	++	ano	ano	L
C11	35	+++	-	-	
C12	36	++	-	-	
D1	37	++	ano	ano	L
D2	38	+	-	-	
D3	39	+	-	-	
D6	42	++	-	-	
D8	44	+	-	-	
D9	45	+	-	-	
D10	46	+	-	-	
D11	47	+	ano	ano	L
D12	48	+++	-	-	
E2	50	++	ano	ano	L
E5	53	+++	-	-	
E7	55	++	-	-	
E8	56	++	-	-	
E11	59	+	-	-	
F4	64	++	ano	ano	L
F5	65	+++	-	-	
F6	66	+++	-	-	
F7	67	++	ano	-	
F8	68	+	ano	ano	L
F9	69	+++	-	-	
F10	70	+	-	-	
F11	71	+	-	-	
F12	72	++	-	-	
G2	74	++	-	-	
G3	75	+	ano	-	
G5	77	++	ano	ano	L
G6	78	+	ano	-	
G7	79	++	ano	ano	L
G12	84	++	ano	ano	L
H1	85	++	-	-	
H2	86	+	-	-	
H3	87	+	-	-	
H5	89	++	ano	-	
H8	92	+++	ano	ano	L
H9	93	+	-	-	
H12	96	++	ano	ano	L

^a Intenzita signálu pozorovaná během koloniové hybridizace. + slabý, ale viditelný signál; ++ středně silný signál; +++ silný signál. ^b Označení velikosti chromozomu, na kterém byl daný klon lokalizován. L – největší chromozomy, tj. pohlavní chromozom X a autozom 1.

4.3 Mapování vybraných pozitivních BAC klonů

Z pozitivních klonů vybraných na základě síly signálů, kterou vykazovaly během koloniové hybridizace, byla izolována plazmidová DNA (Tab. 1), která byla použita ke konstrukci sond pro fluorescenční in situ hybridizaci s umělými bakteriálními chromozomy (BAC FISH). Přednostně přitom byly hybridizovány klony vykazující při koloniové hybridizaci středně silný až silný signál. Díky možnosti užití dvou rozdílných fluorochromů mohly být klony k chromozomům hybridizovány po dvojicích. Celkem bylo úspěšně hybridizováno 17 klonů (Tab. 1). Dvojice klonů překvapivě zpravidla hybridizovaly společně k jednomu z největších chromozomů, tj. pohlavnímu chromozomu X či autozomu 1. Například dvojice klonů C6 a F8 nebo A2 a A4 hybridizovaly k jednomu páru velkých chromozomů (Obr. 4). Podobný hybridizační signál byl pozorován také u klonů A1, B7, C5, E2, G5, G7, G12, H8 (neukázáno).

Dalším trendem pozorovaným během BAC FISH bylo, že některé klony hybridizovaly k několika oblastem daného chromozomu (Obr 4a). U některých klonů, jako např. u klonu D1 či H12, byl signál dokonce rozptýlen po celé délce chromozomu (viz A2 na Obr. 4b) nebo tvořily souvislejší shluk signálů, což bylo patrné u klonů B4 či F4 (neukázáno). Zajímavý výsledek byl pozorován u klonu D11, který jako jediný hybridizoval na jiný chromozom než druhý hybridizovaný klon B7 (neukázáno).



Obr. 4. Mapování BAC klonů mšice broskvoňové metodou BAC FISH na samičích mitotických chromozomech. **(a)** Hybridizace klonu C6 (zelené signály označené šipkami) spolu s klonem F8 (červené signály označené hvězdičkami) k jednomu z největších chromozomálních párů komplementu; za povšimnutí stojí, že signál C6 tvoří dva diskrétní proužky (viz šipky). **(b)** Hybridizace klonu A2 (zelené signály označené šipkami) a klonu A4 (červené signály označené hvězdičkami) k největšímu chromozomálnímu páru celého komplementu, tj. pravděpodobně chromozomu X; zelený signál je roztroušen po chromozomu. Chromozomy byly podbarveny DAPI (modrá). Měřítko 5 μ m.

5 Diskuse

Mšice broskvoňová (*Myzus persicae*) je drobný hmyz, se kterým se lze setkat takřka po celém světě (Grimaldi & Engel, 2005). Jde o představitelku jedinečné kombinace složitého životního cyklu, fenotypové plasticity, rychlé adaptace na měnící se podmínky vnějšího prostředí a velké genetické variability (Manicardi 2015a).

Unikátní střídání jedné pohlavní s mnoha nepohlavními partenogenetickými generacemi mšice broskvoňové umožňuje nejen přežití nepříznivých vlivů podnebí (Simon et al., 2002), ale také využití příznivých podmínek k efektivnímu zvětšování a šíření své populace za relativně krátkou dobu (Loxdale 2008). Na negativní podněty působící na ni z okolního prostředí dokáže flexibilně reagovat tvorbou okřídlených potomků, kteří jsou schopni kolonizovat okolní vegetaci (Brisson 2010). Mšice je také schopná rychlé adaptace k novým živným rostlinám dané genetickou variabilitou způsobenou vysokou mutační rychlostí (Loxdale 2008, Bass et al. 2013).

Spektrum živných rostlin mšice broskvoňové je poměrně široké a zahrnuje mnohé hospodářsky významné plodiny (Bass et al., 2013), a ačkoliv se jedná o hmyz nevelkého vzrůstu, dokáže napáchat velké škody. Proto zejména v zemědělství dochází častokrát k nadměrnému užívání insekticidů, což vedlo u mnohých populací mšice broskvoňové ke vzniku rezistencí (viz kapitola 1.3) podmíněných mutacemi v regulačních oblastech detoxifikačních enzymů či v receptorech, jež jsou cílem insekticidů, nebo amplifikací těchto genů (Bass & Field, 2010).

Na základě cytogenetických metod bylo zjištěno, že vznik rezistence též úzce souvisí s chromozomálními přestavbami (Monti et al., 2012a). Těmito změnami v karyotypu mšice broskvoňové dochází ke zvýšení variability, kterou je schopna přenášet napříč generacemi díky holokinetické aktivitě svých chromozomů (Manicardi 2015b). Nicméně tato variabilita spolu s nedostatkem vhodných chromozomálních markerů pro jednotlivé chromozomy značně komplikuje studium chromozomálních přestaveb u *Myzus persicae*. Ve snaze přispět k usnadnění výzkumu takovýchto změn v karyotypu mšice broskvoňové si tato práce kladla za svůj cíl vybrat bakteriální umělé chromozomy (BAC) vhodné pro karyotypové mapování této mšice metodou fluorescenční in situ hybridizace. Ze 17 klonů mapovaných metodou BAC FISH jich většina překvapivě hybridizovala společně k jednomu z největších chromozomů, tj. pohlavnímu chromozomu X nebo chromozomu 1.

Nemalý podíl na nenáhodné hybridizaci použitých BAC klonů by mohla mít velikost pohlavního chromozomu X, který ve standardním karyotypu představuje cca. 25 % z celkové délky komplementu. Druhý největší element v karyotypu mšice broskvoňové, chromozom 1, pak zaujímá cca. 22 % genomu (Monti et al., 2012b). Fakt, že většina vybraných klonů hybridizovala k největším chromozomům, tj. pohlavnímu chromozomu X popřípadě

autozomu 1, tedy není tak překvapivý, jak se na první pohled zdá. Nicméně to nevysvětluje častou kolokalizaci dvojic BAC klonů na jediném chromozomu.

Vysvětlení může spočívat ve výběru klonů použitých pro BAC FISH. Na základě výsledků koloniové hybridizace byly přednostně vybrány klony vykazující středně silný až silný hybridizační signál. Výběr klonů tedy nebyl zcela náhodný. Silný signál při koloniové hybridizaci mohl být známkou dlouhého inzertu, který daný klon nesl. S přihlédnutím k mnohočetným nebo rozptýleným signálům při BAC FISH (Obr. 4) se však zdá pravděpodobnější, že je intenzita signálu při koloniové hybridizaci dána přítomností repetitivních sekvencí ve vybraných klonech. Bylo prokázáno, že pohlavní chromozomy X a Z mají mnohem vyšší zastoupení repetitivních sekvencí (Bellott et al., 2010). Tomu odpovídá i přítomnost specifických tandemových repetitivních sekvencí na chromozomu X mšice broskvoňové (Mandrioli et al., 1999). Přestože se zatím jedná o předběžné výsledky, ukazuje se, že by zde mohla být spojitost mezi intenzitou signálu, kterou klony vykazovaly během jejich selekce a přednostní lokalizací většiny klonů na pohlavním chromozomu X.

Přednostní lokalizace těchto klonů na chromozomu X může být přitom ověřena jejich hybridizací společně se sondou pro hlavní rRNA geny. Při budoucím hledání BAC klonů specifických pro středně velké a malé autozomy by navíc bylo lepší, zaměřit se pouze na klony, které během koloniové hybridizace vykazovaly slabý signál a dle výše formulované hypotézy by tedy měly nést více unikátních sekvencí. Tyto BAC klony snad umožní vytvoření fyzické mapy chromozomů mšice broskvoňové. Ta nás přiblíží k pochopení podstaty její genetické variability a karyotypových změn, které jsou často spjaté s adaptivní evolucí a rezistencí této mšice vůči insekticidům.

6 Souhrn

Mšice broskvoňová (*Myzus persicae*) je drobný mízu sající hmyz rozšířený po celém světě a jedním z nejdůležitějších škůdců hospodářských plodin. Nadměrným užíváním insekticidů především v zemědělství vedlo u mnohých populací mšice broskvoňové ke vzniku rezistencí. Bylo prokázáno, že rezistence jsou u této mšice často spojeny mimo jiné s chromozomálními přestavbami. Jejich studium je však značně komplikováno holokinetickou aktivitou jejich chromozomů a vysokou nestabilitou genomu mšice broskvoňové.

V této práci bylo testováno možné použití metody fluorescenční in situ hybridizace s bakteriálními umělými chromozomy (BAC FISH) při mapování karyotypu mšice broskvoňové. Byly vybrány BAC klony nesoucí inzert pocházející z genomu mšice broskvoňové a za pomoci metody fluorescentní in situ hybridizace byly mapovány na její chromozomální preparáty. Výsledky ukazují, že fyzické mapování chromozomů metodou BAC FISH je u *M. persicae* možné. Bohužel většina použitých BAC klonů hybridizovala k největším chromozomům z celého komplementu, tj. chromozomu X nebo 1. To může být dáno nenáhodným výběrem BAC klonů nebo velikostí těchto chromozomů, které představují téměř polovinu celého genomu mšice broskvoňové. Nalezení markerů pro všechny chromozomy tak může být i vzhledem k malému počtu dostupných klonů značně problematické.

7 Seznam literatury

Anthony N., Unruh T., Ganser D., Ffrench-Constant R. H. (1998), Duplication of the Rdl GABA receptor subunit gene in an insecticide-resistant aphid, *Myzus persicae*, Mol Gen Genet 260: 165-175.

Bass C., Field L. M. (2011), Gene amplification and insecticide resistance, Pest Manag Sci 67: 886-890.

Bass C., Zimmer Ch. T., Riveron J. M., Wilding C. S., Wondji C. S., Kausmann M., Field L. M., Williamson M. S., Nauen R. (2013), Gene amplification and microsatellite polymorphism underlie a recent insect host shift, PNAS 110: 19460–19465.

Bellott D. W., Skaletsky H., Pyntikova T., Mardis E. R., Graves T., Kremitzki C., Brown L. G., Rozen S., Warren W. C., Wilson R. K., Page D. C. (2010), Convergent evolution of chicken Z and human X chromosomes by expansion and gene acquisition, Nature 466: 612–616.

Blackman R. L., Spence J. M., Field L. M., Devonshire A. L. (1995), Chromosomal location of the amplified esterase genes conferring resistance to insecticides in *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae), Heredity 75: 297-302.

Blackman R. L., Spence J. M., Field L. M., Devonshire A. L. (1999), Variation in the chromosomal distribution of amplified esterase (FE4) genes in Greek field populations of *Myzus persicae* (Sulzer), Heredity 82: 180-186.

Blackman R. L., Spence J. M., Normark B. B. (2000), High diversity of structurally heterozygous karyotypes and rDNA arrays in parthenogenetic aphids of the genus *Trama* (Aphididae: Lachninae), Heredity 84: 254-260.

Brisson J. A. (2010), Aphid wing dimorphisms: linking environmental and genetic control of trait variation, Phil Trans R Soc B 365: 605–616.

Davis G. K. (2012), Cyclical Parthenogenesis and Viviparity in Aphids as Evolutionary Novelties, J Exp Zool 318: 448–459.

- Devonshire A. L., Moores G. D. (1982), A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*), *Pestic Biochem Physiol* 18: 235-246.
- Douglas A. E. (1998), Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: Aphids and their symbiotic bacteria buchnera, *Annu Rev Entomol* 43: 17–37.
- Field L. M., Blackman R. L., Tyler-Smith C., Devonshire A. L. (1999), Relationship between amount of esterase and gene copy number in insecticide-resistant *Myzus persicae* (Sulzer), *Biochem J* 339: 737-742.
- Field L. M., Devonshire A. L., Ffrench-Constant R. H., Forde B. G. (1989), Changes in DNA methylation are associated with loss of insecticide resistance in the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Sulz.), *FEBS* 243: 323-327.
- Field L. M., Foster S. P. (2002), Amplified esterase genes and their relationship with other insecticide resistance mechanisms in English field populations of the aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), *Pest Manag Sci* 58: 889-894.
- Field L. M., Williamson M. S., Moores G. D., Devonshire A. L. (1993), Cloning and analysis of the esterase genes conferring insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), *Biochem J* 294: 569-574.
- Glastad K. M., Hunt B. G., Yi S. V., Goodisman M. A. D. (2011), DNA methylation in insects: on the brink of the epigenomic era, *Insect Mol Biol* 20: 553–565.
- Grimaldi D., Engel M. S. (2005), *Evolution of the Insects, The Paraneopteran Orders*, Cambridge University Press, New York (USA), 290-294.
- Hales D. F., Tomiuk J., Wöhrmann K., Sunnucks P. (1997), Evolutionary and genetic aspects of aphid biology: A review, *Eur J Entomol* 94: 1-55.
- Hogenhout S. A., Ammar E. – D., Whitfield A. E., Redinbaugh M. G. (2008), Insect vector interactions with persistently transmitted viruses, *Annu Rev Phytopathol* 46: 327–59.

Hypša V., Křížek J. (2007), Molecular Evidence for Polyphyletic Origin of the Primary Symbionts of Sucking Lice (Phthiraptera, Anoplura), *Microb Ecol* 54: 242-251.

Loxdale H. D. (2008), The nature and reality of the aphid clone: genetic variation, adaptation and evolution, *Agric For Entomol* 10: 81-90.

Loxdale H.D. (2010), Rapid genetic changes in natural insect populations, *Ecol Entomol* 35: 155-164.

Loxdale H. D., Lushai G. (2003), Rapid changes in clonal lines: the death of a 'sacred cow', *Biol J Linn Soc Lond* 79: 3-16.

Mandrioli M., Bizzaro D., Manicardi G. C., Gionghi D., Bassoli L., Bianchi U. (1999), Cytogenetic and molecular characterization of a highly repeated DNA sequence in the peach potato aphid *Myzus persicae*, *Chromosoma* 108: 436–442.

Mandrioli M., Manicardi G. C. (2013), Chromosomal mapping reveals a dynamic organization of the histone genes in aphids (Hemiptera: Aphididae), *Entomologia* 1: 2-10.

Mandrioli M., Zanasi F., Manicardi G. C. (2014), Karyotype rearrangements and telomere analysis in *Myzus persicae* (Hemiptera, Aphididae) strains collected on *Lavandula* sp. plants, *CompCytogen* 8(4): 259–274.

Manicardi G. C., Mandrioli M., Blackman R. L. (2015a), The cytogenetic architecture of the aphid genome, *Biol Rev* 90: 112-125.

Manicardi G. C., Nardelli A., Mandrioli M. (2015b), Fast chromosomal evolution and karyotype instability: recurrent chromosomal rearrangements in the peach potato aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), *Biol J Linn Soc Lond* 116: 519-529.

Martinez-Torres D., Foster S. P., Field L. M., Devonshire A. L., Williamson M. S. (1999), A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), *Insect Mol Biol* 8: 339-346.

- Mediouni J., Fuková I., Frydrychová R., Dhouibi M. H., Marec F. (2004), Karyotype, sex chromatin and sex chromosome differentiation in the carob moth, *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae), *Caryologia* 57: 184-194.
- Monti V., Giusti M., Bizzaro D., Manicardi G. C., Mandrioli M. (2011), Presence of a functional (TTAGG)_n telomere-telomerase system in aphids, *Chromosome Res* 19: 625-633.
- Monti V., Lombardo G., Loxdale H. D., Manicardi G. C., Mandrioli M. (2012a), Continuous occurrence of intra-individual chromosome rearrangements in the peach potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), *Genetica* 140: 93-103.
- Monti V., Mandrioli M., Rivi M., Manicardi G. C. (2012b), The vanishing clone: karyotypic evidence for extensive intraclonal genetic variation in the peach potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae), *Biol J Linn Soc Lond* 105: 350-358.
- Moore G. D., Devine G. J., Devonshire A. L. (1994), Insecticide-insensitive acetylcholinesterase can enhance esterase-based resistance in *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae*, *Pestic Biochem Physiol* 49: 114-120.
- Müller C. B., Williams I. S., Hardie J. (2001), The role of nutrition, crowding and interspecific interactions in the development of winged aphids, *Ecol Entomol* 26: 330-340.
- Mutero A., Pralavorio M., Bride J. - M., Fournier D. (1994), Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase, *Genetics* 91: 5922-5926.
- Novotná J., Havelka J., Starý P., Koutecký P., Vítková M. (2011), Karyotype analysis of Russian beat aphid, *Diuraphis noxia* (Kurdjumov) (Hemiptera: Aphididae) reveals a large X chromosome with rRNA and histone gene families, *Genetica* 139: 281-289.
- Ogawa K., Miura T. (2014), Aphid polyphenisms: trans-generational developmental regulation through viviparity, *Front Physiol* 5: 1-11.
- Poupoulidou D., Margaritopoulos J. T., Kephalogianni T. E., Zarpas K. D., Tsitsipis J. A. (2006), Effect of temperature and photoperiod on the life cycle in lineages of *Myzus*

persicae nicotianae and *Myzus persicae* s. str. (Hemiptera: Aphididae), Eur J Entomol 103: 337-346.

Simon J. - C., Rispe C., Sunnucks P. (2002), Ecology and evolution of sex in aphids, Trends Ecol Evol 17: 34-39.

Spence J. M., Blackman R. L., Testa J. M., Ready P. D. (1998), A 169-base pair tandem repeat DNA marker for subtelomeric heterochromatin and chromosomal rearrangements in aphids of the *Myzus persicae* group, Chromosome Res 6: 167-175.

Van't Hof A. E., Nguyen P., Dalíková M., Edmonds N., Marec F., Saccheri I. J. (2013), Linkage map of the peppered moth, *Biston betularia* (Lepidoptera, Geometridae): a model of industrial melanism, Heredity 110: 283–295.

Yoshido A., Bando H., Yasukochi Y., Sahara K. (2005), The *Bombyx mori* Karyotype and the Assignment of Linkage Groups, Genetics 170: 675-685.