

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

**Diagnostika druhových komplexů čeledi Adelgidae
na základě molekulárních markerů**

Daniela Chundelová

Školitel : PaedDr. Martina Žurovcová, Ph.D.
Školitel specialista : Ing. Jan Havelka, Ph.D.

České Budějovice
2009

Bakalářská práce

Chundelová, D., 2009 : Diagnostika druhových komplexů čeledi Adelgidae na základě molekulárních markerů [Diagnostics of species complex in family Adelgidae by molecular markers. Bc.Thesis, in Czech]

Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic,
44 pp

Annotation

Five molecular markers (mitochondrial AT-control region and COI, nuclear ITS and markers from primary endosymbiont *Buchnera sp.* argS and rrs) were tested for use in species identification of 2 selected genera of the Adelgidae family. Markers COI, argS and rrs were successfully amplified and sequenced. Aligned sequences of those three markers were used for reconstruction of dendrogram by Neighbour-Joining method with Kimura 2-Parameter model. These markers are suitable for resolution of taxonomic relationship of genera within family Adelgidae, although further testing of these markers in conjunction with other markers (like ITS or AT-control region) will be required to delineate sister species with higher precision.

Projekt byl financován GA AVČR, č. grantu IAA600960705, ze záměru Entomologického ústavu Z 50070508 a PřF JU.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

Prohlašuji, že v souladu s paragrafem 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě Přírodovědeckou fakultou, elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetové stránce.

V Českých Budějovicích, 6.5.2009

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala především své školitelce Martině Žurovcové za odborné vedení a poskytnutí cenných rad a literatury, Janu Havelkovi za poskytnutí veškerého analyzovaného materiálu, Lucii Kučerové za velkou pomoc obzvláště v začátcích práce, ale i kdykoli později. Dále děkuji Aničce Kuřátkové, Andree Jarošové a Jirkovi Pašíkovskému za vytvoření příjemné a motivující pracovní atmosféry v laboratoři a za všechny jejich rady a připomínky.

Velký dík patří i mé rodině za jejich podporu po celou dobu studia.

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Typický životní cyklus (holocyklus).....	2
1.2. Endosymbionti a jejich úloha v životě korovnic.....	3
1.2.1. <i>Buchnera sp.</i>	3
1.2.2. Sekundární endosymbionti.....	4
1.3. Systematika a taxonomie korovnic.....	5
1.4. Molekulární metody v taxonomii korovnic.....	6
1.4.1. Molekulární markery.....	7
1.4.2. Mitochondriální markery.....	8
1.4.3. Nukleární markery.....	9
1.4.4. Markery z primárního endosymbionta <i>Buchnera sp.</i>	9
2. Cíle práce.....	10
3. Materiál a metody.....	11
3.1. Materiál.....	11
3.2. Metody.....	12
3.3. Izolace DNA	12
3.3.1. Izolace extrakčním pufrem	12
3.3.2. Izolace pomocí „Squishing Buffer“.....	12
3.3.3. Izolace pomocí kitu ZR Genomic DNA II.....	13
3.3.4. Izolace pomocí kitu Invisorb Spin Tissue mini.....	13
3.3.5. Izolace pomocí kitu DNeasy blood and tissue.....	13
3.4. Primery.....	13
3.5. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	15
3.5.1. Reakční směs.....	15
3.5.2. PCR profil k amplifikaci jedntolivých fragmentů.....	16
3.6. Gelová elektroforéza.....	16
3.7. Purifikace PCR produktu.....	17
3.7.1. DNA clean and concentrator clean-up.....	17
3.7.2. Přečišťování pomocí směsi ExoSap-IT.....	17
3.8. Sekvenační PCR reakce.....	18
3.9. Přečištění sekvenační reakce pomocí Sephadexu a aerosolových špiček.....	18
3.10. Analýza sekvencí.....	18
3.11. Statistické zpracování sekvencí.....	19
4. Výsledky.....	20
4.1. Charakteristika fragmentu genu COI.....	20
4.2. Charakteristika fragmentu pro argS.....	23
4.2.1. Rod <i>Pineus</i>	23
4.2.2. Rod <i>Dreyfusia</i>	24
4.3. Charakteristika fragmentu 16S rRNA (rrs).....	25
5. Diskuze.....	28
5.1. Izolace DNA a metodika PCR.....	28
5.2. Testování markerů.....	28
5.3. Srovnání použitých markerů.....	29
5.3.1. Marker COI.....	29

5.3.2. Marker argS.....	31
5.3.3. Marker rrs.....	33
6. Závěr.....	35
7. Literatura.....	36
8. Přílohy.....	43

1. Úvod

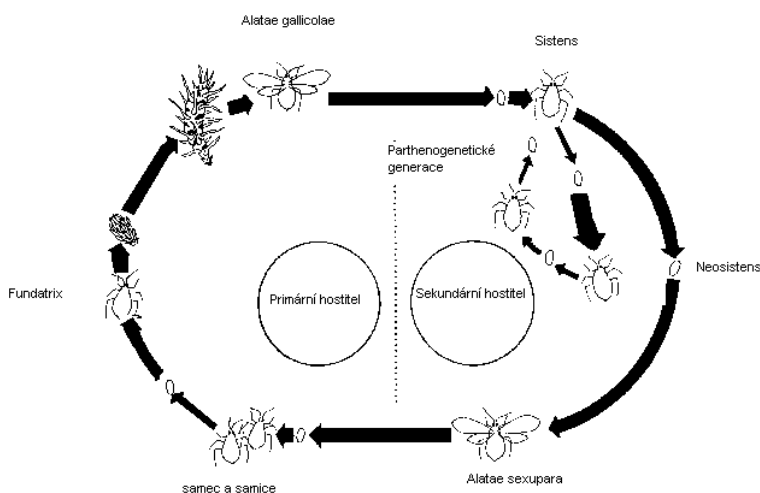
Mšice čeledi korovnicovití (Sternorrhyncha, Aphidini, Adelgidae) jsou samostatnou skupinou mšic. V našich podmínkách tvoří nejvýznamnější skupinu savého hmyzu vyskytujícího se na jehličnanech. Škodí především na mladých výhonech, kde sají mízu a dochází tak k tvorbě hálek, deformaci výhonů či tvorbě voskovitých povlaků. Při silném napadení může dojít k odumření stromu (Lesnické práce č.6/2000). Celková světová biodiverzita obsahuje přibližně 70 druhů (Havill and Footit, 2007). Na území České republiky se vyskytuje 17 druhů (Havelka, pers.kom.). Existuje však mnoho nejasností při rozlišování na základě morfologických znaků, možný je i výskyt kryptických druhů (Havill and Footit, 2007).

Jejich hlavním poznávacím znamením je především komplexní mnogogenerační polymorfní životní cyklus. Jsou buď holocyklické se sexuální generací a střídáním hostitelů nebo anholocyklické s asexuálním rozmnožováním a bez střídání hostitelů. Oba cykly jsou morfologicky stejné a taxonomové se lišili v názorech, zda se mají jednotlivé skupiny popisovat jako odlišné druhy jen na základě odlišností v životním cyklu (Börner, 1907; Steffan, 1963; Steffan, 1964). Výsledkem jejich diskuzí je závěr, že jsou popisovány jako samostatné druhy v případě, že ztratí schopnost migrovat a měnit hostitele a dojde k předpokládané genetické izolaci či v případě, že se objeví morfologické odlišnosti (Steffan, 1962; Eichhorn, 1989). V typickém holocyklu se vyskytuje 5 generací – 3 jsou produkovány na primárním hostiteli, dochází zde k sexuálnímu rozmnožování a tvorbě hálek. Další 2 generace se nacházejí na hostiteli sekundárním. Celý holocyklus trvá 2 roky. Anholocyklické korovnice se vyskytují pouze na 1 z hostitelů, jejich okřídlené formy se mohou přemístit na stejného hostitele v okolí, či zůstávají v blízkosti háčky, ze které se vyvinuly. Primárním hostitelem pro všechny druhy korovnic je vždy smrk (*Picea sp.*), sekundárním hostitelem je pak jehličnan jiného druhu (*Abies*, *Larix*, *Pseudotsuga*, *Tsuga*, *Pinus*) (Lesnické práce č.6/2000). Příkladem holocyklické a anholocyklické korovnice, které jsou navzájem morfologicky nerozlišitelné, je korovnice kavkazská (*Dreyfusia nordmanniana*e Eckstein 1890) alternující mezi smrkem (*Picea*) a jedlím (*Abies*) a korovnice jedlová (*Dreyfusia piceae* Ratzeburg 1844) (Havill and Footit, 2007). Tento příklad je vybrán

na základě zadání mé práce zaměřené na druhové komplexy *Dreyfusia* a *Pineus*. Tyto dva rody byly v předchozí práci (Steffan, 1968) řazeny do stejné podčeledi *Pineinae*.

1.1. Typický životní cyklus (holocyklus)

Okřídlení jedinci (*alatae sexupara*) migrují na jaře ze sekundárního hostitele zpět na primárního, kde snesou vajíčka a zemřou. Z vajíček se vylíhne sexuálně se množící generace samců a samic, kteří během vývoje snášejí malá vajíčka. Po dospění snesou 1 velké vajíčko, ze kterého se stane zakladatelka (*fundatrix*). Ta se usídí blízko pupenu, kde přezimuje jako nymfa. Na jaře začne sát mizu a tím indukuje tvorbu hálky, kde probíhá její vývoj. Dospělá zakladatelka snese velký shluk vajíček, které se vyvíjejí v hálce přes 4 nymfální instary a nakonec se z nich vylíhnou okřídlené samice (*alatae gallicolae*). Uprostřed léta hálky uschnou, otevřou se, okřídlené samice prodělají závěrečnou přeměnu a migrují na sekundárního hostitele. Zde ihned začínají snášet vajíčka a do několika hodin umírají. Jejich potomky jsou bezkřídlé samice množící se parthenogeneticky (*sistens*). Někteří z jejich potomků se stanou larvami přezimujícími na sekundárním hostiteli (*neosistens*). Na jaře se z těchto larev stávají okřídlení jedinci (*alatae sexupara*) migrující zpět na primárního hostitele a cyklus se uzavírá (Lampel, 1968; Steffan, 1972; Carter, 1971; Eichhorn 1989; Blackman and Eastop, 1994; Havill and Footitt, 2007). Schematicky je životní cyklus znázorněn na obr. 1



Obr. 1 Životní cyklus korovnic (schematický náčrt - upraveno) (Trees & Shrubs no. 5.534, Colorado State University Extension)

1.2. Endosymbionti a jejich úloha v životě korovnic

Symbiotické organismy jsou na hmyzu živícím se na floému či xylému, jakým jsou mšice či korovnice, celkem obvyklé (Sandström et al., 2001). Mezi nejzajímavější patří endosymbiotické bakterie. Tyto se rozdělují na 2 hlavní skupiny. Jednu tvoří endosymbionti primární, kteří se v těle hostitele vyskytují ve specializovaných buňkách označovaných jako bakteriocyty, které uvnitř těla vytvářejí volně organizovanou strukturu zvanou bakteriom (Buchner, 1965; Bauman et al., 2000). Do dalších generací jsou předávány matkou přes vajíčka. Sekundární endosymbionti se vyskytují v syncytiálních buňkách připojených na bakteriomy (Buchner, 1965; Fukatsu et al., 1998).

Primárním endosymbiontem je ve všech zkoumaných mšicích a korovnicích bakterie *Buchnera sp.*, zatímco sekundárních endosymbiontů je několik druhů.

1.2.1. *Buchnera sp.*

Tato Gram negativní bakterie patří fylogeneticky ke γ podjednotce Proteobakterií (Unterman et al., 1989; Munson et al., 1991). Je blízce příbuzná bakteriím *E. coli* a *Haemophilus influenzae*. V buňce se vyskytuje zhruba ve 100 kopiích (Shigenobu et al., 2000). Fylogenetické stromy hostitelů a jejich symbiontů se shodují, což naznačuje dávnou infekci a následný vertikální přenos po 150-250 milionů let (Moran et al., 1993; Clark et al., 2000). Hostitelský organismus není schopen samostatného života bez primárních endosymbiontů. Ti totiž pro hostitele syntetizují esenciální aminokyseliny a vitamíny. Endosymbiont naopak ztrácí geny pro transkripci, translaci či reparaci. (Lai et al., 1994; Douglas, 1998; Bauman et al., 2000). *Buchnera sp.* obsahuje pouze 1 kopii od každé rRNA (5S, 16S, 23S) a tyto geny jsou rozděleny na 2 transkripční jednotky (16S rRNA – rrs a 5S+23S – rrf, rrl) (Unterman et al., 1989), zatímco u většiny ostatních eubakterií je gen pro 16S rRNA spojen s 23S rRNA (Sandström et al., 2001). Její genom je také bohatý na AT, obsah GC je pouze 26% (Shigenobu et al., 2000). Většina studií týkající se primárního endosymbionta *Buchnera sp.* a jeho hostitele byla prováděna na mšici kyjatce hrachové (*Acyrtosiphon pisum*) (Via et al., 2000; Simon et al., 2003; Leonardo and Muir, 2003), ale byly také osekvenovány i genomy *Buchnera sp.* z dalších mšic (*Schizaphis graminum*, *Bemisia*

tabaci). Porovnáním velikostí genomů se zjistilo, že velikost genomu se liší v závislosti na tom z jakého hostitele symbiont pochází.

1.2.2. Sekundární endosymbionti

U sekundárních endosymbiontů není jejich význam v biologii mšic a korovnic tak jasný jako byl v případě *Buchnera sp.* Nejpravděpodobnější je jejich úloha v ochraně před patogeny a parasitoidy (Oliver et al., 2003; Scarborough et al., 2005). Další studie demonstruje jejich vliv na růst a rozmnožování (Chen et al., 2000). Jejich první charakteristika byla provedena na základě sekvenování 16S rRNA ve stejné práci, ve které byla prvně charakterizována *Buchnera sp.* (Unterman et al., 1989). I u sekundárních symbiontů se většina pozornosti upíná ke kyjatce hrachové (*Acyrtosiphon pisum*). Tam bylo nalezeno 5 sekundárních endosymbiontů. První blízce příbuzný bakterii *Serratia sp.* byl nazván PASS (z anglického pea aphid secondary symbiont) (Chen and Purcell 1997; Chen et al., 2000) nebo R-typ (Sandström et al., 2001), druhý příbuzný PASS symbiontu molici bavlníkové (*Bemisia tabaci*) nazvaný PABS (= pea aphid *Bemisia* type symbiont) (Darby et al., 2001) či T-typ (Sandström et al., 2001). Třetí náleží do rodu *Rickettsia* s názvem PAR (= pea aphid *Rickettsia*) (Chen et al., 1996, 2000) nebo *Rickettsia* symbiont (Tsuchida et al., 2002). Identifikace čtvrté bakterie je založena pouze na sekvenci 16S rRNA náleží do γ Proteobakterií nazvaná PAUS (= pea aphid U-type symbiont) (Tsuchida et al., 2002) či U-typ (Sandström et al., 2001). Posledním symbiontem je bakterie z rodu *Spiroplasma* nazvaná *Spiroplasma* symbiont (Fukatsu et al., 2001). U *Schizaphis graminum* a *Diuraphis noxiae* nebyli žádní sekundární endosymbionti nalezeni (Sandström et al., 2001).

Vzhledem k tomuto složitému endosymbiotickému systému, který se skládá z povinného primárního endosymbionta a jednoho až několika, v některých případech však žádného, sekundárního endosymbionta, je velice pravděpodobné, že hostitel musí mít několik úrovní interakce mezi primárním a sekundárním endosymbiontem a svým organismem (Chen et al., 2000; Fukatsu et al., 2001).

1.3. Systematika a taxonomie korovnic

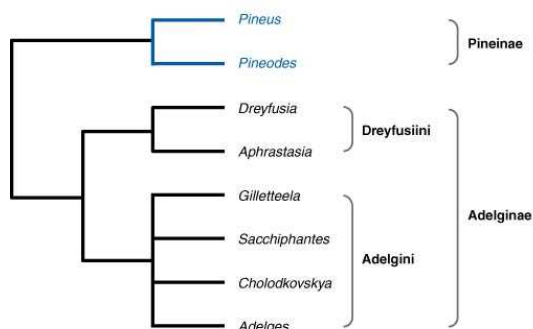
Práce na systematice korovnic má dlouhou a bohatou historii. Cyklický životní cyklus a střídání hostitelů bylo objeveno již na konci 19. století (Havill and Footitt, 2007). Záhy se začaly objevovat práce věnující se jejich terminologii a morfologickým znakům sloužícím taxonomii (Cholodkovsky, 1896; Burdon, 1908; Börner, 1908; Marchal, 1913; Annand, 1928). Později se objevily práce zabývající se populační dynamikou, interakcemi mezi predátorem a kořistí (Eichhorn, 1968, 1969) či práce studující systematiku a životní cyklus (Steffan, 1968, 1972). Nechybí ani práce věnované korovnicím z jednotlivých zemí (Inouye, 1945; Carter 1971; Covassi and Binazzi, 1981, 1991; Binazzi, 2000).

Korovnicím z území České republiky se nejvíce věnovala práce Paška (1954), v současné době plní informační funkci časopis Lesnické práce, který obsahuje základní informace, fotografie a informační letáky (č.6, ročník 2000).

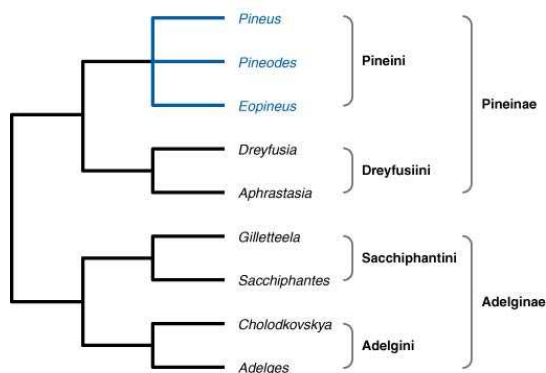
Složitě vývojové cykly a malé morfologické rozdíly mezi druhy vedly ke vzniku nejednotné nomenklatury, proto se dnes můžeme setkat s používáním tří hlavních systémů (Annand, 1928; Börner and Heinze, 1957; Steffan, 1968). Tyto systémy jsou znázorněny na obrázku 2.


První určovací klíče ke správnému druhovému zařazení korovnic se soustředily pouze na morfologické odlišnosti – uspořádání průduchů a voskových žláz – u larev prvního instaru. Tak byly korovnice rozděleny na druhy *Pineus* se 4 břišními průduchy a *Adelges* (se 6 poddruhy) s 5 břišními průduchy (Annand 1928; Börner and Heinze 1957). Toto rozdělení bylo později doplněno o počet chromozomů a přítomnost a umístění symbiotických bakterií (Steffan, 1968). V praxi se však determinace založená jen na larválních stadiích příliš neosvědčila. Z tohoto důvodu byla v Británii na přelomu 60. a 70.let minulého století provedena morfologická studie všech okřídlených forem britských druhů korovnic, na jejímž základě byl sestaven nový klíč (Carter, 1971). Toto zpracování bylo východiskem pro vytvoření podobného klíče v Itálii (Binazzi, 2000). I v těchto pracích se však vyskytují určité nesrovnalosti mezi druhy rozlišitelnými na základě morfologie a druhy morfologicky shodnými, ovšem s odlišnými vývojovými cykly. Velké problémy při druhové determinaci způsobuje také redukce životních cyklů korovnic při jejich importu do nových zoogeografických areálů (Havelka, pers.kom.).

Börner and Heinze 1957



Steffan 1968



 Havill NP, Foottit RG. 2007. Annu. Rev. Entomol. 52:325–49

Obr.2 Hlavní používané systémy v taxonomii korovnic, nahoře systém dle Börner and Heinze (1957), dole systém dle Steffan (1968). Modré větve náleží druhu *Pineus* a černé druhu *Adelges* dle Annanda (1928). (Havill and Foottit, 2007).

1.4. Molekulární metody v taxonomii korovnic

I přes mnohé snahy k vytvoření spolehlivých určovacích klíčů pro správné zařazení zkoumaného druhu je druhová determinace korovnic na základě morfologie stále obtížná a nepřesná. Velký význam pro přesné druhové určení a vyjasnění životních cyklů by mohly mít molekulárně-biologické metody.

Současné analýzy mšic na úrovni DNA sekvencí se soustředí především na fylogenetické DNA markery, přičemž většina studií je zaměřena na čeleď *Aphididae* (Moran et al., 1999; von Dohlen, Teulon, 2003).

Čeledi *Adelgidae* se v posledních letech věnovalo jen několik studií. V první (Mantovani et al., 2002) jsou použity úseky 2 mitochondriálních genů – *cytb* a *NDH4* k definování druhové příslušnosti uvnitř druhu *Adelges* (*Dreyfusia*). Výsledná data nedokázala na molekulární úrovni rozlišit 2 druhy korovnic (*Dreyfusia nordmanniana* a *Dreyfusia merkeri*) a prokázala pouze malé odlišnosti mezi ostatními analyzovanými druhy na území Itálie a Dánska. Tato práce ovšem především prokázala použitelnost molekulárních metod pro analýzu druhové příslušnosti u vybrané skupiny živočichů. Druhá práce (Havill et al. 2006a) zkoumala mezipopulační rozdíly u korovnice jedlovcové (*Adelges tsugae*), která způsobuje velké škody na jedlovcu kanadském (*Tsuga canadensis*). Byly použity 3 úseky mitochondriálního genomu : *COII*, *cytb* a oblast obsahující část genu pro 1. podjednotku *NADH* dehydrogenasy, *tRNA-leu* a část velké ribosomální podjednotky (16S). Výsledkem bylo určení geografického původu druhu *A.tsugae*. Třetí studie zaměřená na vztahy v čeledi *Adelgidae* (Havill et al., 2006b) používala 3 mitochondriální markery z oblastí *COI*, *COII*, *cytb* a nukleární elongační faktor *EF1 α* . Výsledkem bylo zmapování vztahů čeledi *Adelgidae* a jejich hostitelských dřevin, ale i příslušnost skupin do podčeledí *Adelginae* a *Pineinae*.

1.4.1. Molekulární markery

Molekulární markery se staly důležitým biologickým hybatelem, který může být použit při řešení problémů týkajících se fylogenetiky, ekologie a evoluce u rychle se vyvíjejících skupin organismů, kde je problematické přesné morfologické určení. Tyto markery mají řadu výhod, např. jejich použití není omezeno na určitá stadia vývoje či na množství studovaného materiálu, a lze je také, za určitých podmínek, použít k analýze suchých či starých vzorků. Rozdělují se na dvě hlavní skupiny, kterými jsou proteinové (alozymy) a DNA markery. DNA markery se dále dělí na nukleární a mitochondriální, markerem může být v obou případech gen i nekódující oblast (Loxdale and Lushai, 1998).

Mitochondriální DNA má vyšší mutační rychlost – zhruba 20x – než DNA nukleární. Má také vysokou mezidruhovou variabilitu a vyskytuje se v buňkách ve velkém množství kopií (stovky – tisíce), dědí se v maternální linii (má hemizygotní konstituci) a nevyskytují se v ní introny. Mezi nejčastější úseky pro tvorbu markerů

patří v mtDNA cytochrom oxidáza podjednotka I a II (COI, COII) patřící mezi variabilnější úseky a dále konzervované úseky 16S rRNA, 12S rRNA (Loxdale and Lushai, 1998; Caterino et al., 2000).

Nukleární DNA se v buňce diploidních organismů vyskytuje pouze ve 2 kopiích. U starších vzorků je méně dostupná neboť rychleji degraduje. Výhodou může být přítomnost intronů, které zvyšují variabilitu. Nejčastějšími oblastmi pro tvorbu markerů jsou nekódující oblast Internal Transcribed Spacer (ITS) a kódující oblast elongační faktor 1 α (EF 1 α) (Loxdale and Lushai, 1998; Caterino et al., 2000).

Pro identifikaci druhových komplexů korovnic byly na základě informací z literatury (Loxdale and Lushai, 1998; Caterino et al., 2000; Leonardo and Muiru, 2003) a předchozího výzkumu (Věchtová, P., 2008) vybrány 2 mitochondriální markery, 1 marker nukleární a 2 markery z primárního endosymbionta *Buchnera sp.*

1.4.2. Mitochondriální markery

Cytochrom oxidáza – podjednotka I (DNA „barcoding“)

DNA „barcoding“ je nový projekt s velkým rozsahem uplatnění nejen v živočišné, ale i v rostlinné říši. Je založen na poznatku, že pokud je vybrána krátká sekvence ze standardizované oblasti genomu může být použita jako DNA marker pro přesné určení druhů, ale i k identifikaci druhů nových či kryptických. V živočišné říši je touto krátkou sekvencí 658 bp dlouhá oblast v blízkosti 5' konce COI. Základním předpokladem této techniky je skutečnost, že vnitrodruhová variabilita je přibližně 10x menší než variabilita mezidruhová (konkrétně u COI je vnitrodruhová variabilita menší než 1%, vzácně více než 2% a mezidruhová je větší než 10%) (Hebert et al., 2004; Smith et al., 2006; Shearer and Cofforth, 2007).

AT – control region

AT oblast je hlavní nekódující oblastí v mitochondriálním genomu. Obsahuje velký počet A+T nukleotidů (to je patrně fylogenetickým znakem hmyzu) a tandemové repetice, které podstoupily synchronizovanou evoluci a počet jejich kopií ukazuje na velkou mutační rychlost. Oblast má u bezobratlých i obratlovců velice variabilní délku i sekvenci. I u hmyzu samotného má velmi variabilní polohu v závislosti na přeskupení

tRNA během evoluce. Není to však nejvariabilnější oblast genomu a proto je vhodná jako marker pro analýzy blízkce příbuzných taxonů (Zhang et al., 1997).

1.4.3. Nukleární markery

Internal transcribed spacer (ITS)

ITS je nekódující oblast nacházející se mezi velmi konzervovanými kódujícími oblastmi 18S a 28S rRNA. Vyvíjí se rychleji než většina jiných genů, z čehož plyne, že se může velmi lišit i mezi úzce příbuznými druhy a může být proto dobrým markerem. Je rozdělena na podjednotky ITS1 mezi 18S a 5,8S a ITS2 mezi 5,8S a 28S, přičemž ITS2 je variabilnější než ITS1. Oblast ITS se vyskytuje pouze na transkripčním prekurzoru, po transkripci dochází k excizi a rychlé degradaci (Schlötterer et al., 1994; Loxdale and Lushai, 1998; Bargues et al., 2000; Douglas et al., 2001).

1.4.4. Markery z primárního endosymbionta *Buchnera sp.*

argS a rrs

Fylogenetické vztahy mezi prokaryoty byly ustanoveny na základě porovnávání sekvencí rrs (porovnávala byla jedinečná sekvence pro 16S rRNA), tato porovnání ukázala, že tyto sekvence jsou vhodné k jejich druhové determinaci. U *Buchnera sp.* je navíc ribosomální gen ve 2 odlišných transkripčních jednotkách rrs (16S rRNA) a rrl+rrf (23S+5S rRNA) a v genomu má pouze 1 kopii rrs, která je navíc vždy předcházena genem argS kódujícím arginyl-tRNA synthasou.

Vzhledem k těmto skutečnostem a prokázaným různým velikostem genomu *Buchnera sp.* u různých druhů mšic předpokládáme velkou variabilitu genů a intergenových úseků mezi argS a 16S rRNA a proto byly tyto úseky, na základě údajů z literatury (Munson et al., 1991b; Pang and Winkler 1993; Munson et al., 1993; Olsen et al., 1994), vybrány jako potenciálně vhodné markery.

2. Cíle práce

1. Vybrat markery pro rozlišení jednotlivých druhů u druhových komplexů *Dreyfusia* a *Pineus*.
2. Otestovat vhodnost těchto markerů ke zjištění vnitrodruhové a mezidruhové variability u zmíněných druhových komplexů.
3. Po sekvenaci úspěšně naamplifikovaných úseků statisticky zpracovat a vyhodnotit získaná data.

3. Materiál a metody

Materiál

Všechny vzorky k analýze poskytl Ing. Jan Havelka (Biologické centrum AV ČR, Entomologický ústav), který prováděl jejich terénní sběr i druhovou determinaci. Vzorky byly před analýzou buď uchovávány v 98% ethanolu nebo zmražené na -82°C. Vzorky pocházejí z lokalit na území České republiky, jejich seznam je uveden v tabulce 1.

Tab. 1 Seznam analyzovaných druhů

Číslo vzorku	Druh	Lokalita	Instar	Zp.uchovávání
3059	<i>Pineus strobi</i>	Lednice	<i>sistens, ovo,larva</i>	98% ethanol
3098	<i>Pineus strobi</i>	Nový Dvůr	<i>progređiens, ovo,larva</i>	98% ethanol
3572	<i>Pineus strobi</i>	České Budějovice	<i>progređiens, ovo,larva</i>	98% ethanol
3062	<i>Pineus pini</i>	Chvalčov	<i>sistens, ovo,larva</i>	98% ethanol
3230 - 3231	<i>Pineus pini</i>	Praha, Břevnov	<i>progređiens, ovo,larva</i>	98% ethanol
3576	<i>Pineus pini</i>	České Budějovice	<i>progređiens, ovo,larva</i>	98% ethanol
3071 - 3072	<i>Pineus cembrae</i>	Těchobuz u Pacova	<i>sistens,ovo,larva</i>	98% ethanol
3497	<i>Pineus cembrae</i>	Těchobuz u Pacova	<i>progređiens, ovo,larva</i>	98% ethanol
3583	<i>Pineus cembrae</i>	Buchlovice	<i>progređiens, ovo,larva</i>	98% ethanol
10536	<i>Pineus cembrae</i>	Těchobuz u Pacova	<i>sistens</i>	-82°C
2486,2489 - 2496	<i>Pineus orientalis</i>	Buchlovice	<i>al-gal</i>	98% ethanol
2514	<i>Pineus orientalis</i>	Buchlovice	<i>al-gal</i>	98% ethanol
10241	<i>Pineus orientalis</i>	Buchlovice	<i>al-gal</i>	-82°C
10580 - 10582	<i>Pineus orientalis</i>	Lednice	<i>al-gal</i>	-82°C
10600 - 10604	<i>Pineus orientalis</i>	Lednice	<i>al-gal</i>	-82°C
10655 - 10657	<i>Pineus orientalis</i>	Buchlovice	<i>al-gal</i>	-82°C
3487	<i>Pineus pineoides</i>	Zdítov	<i>sistens</i>	98% ethanol
3498 - 3499	<i>Dreyfusia piceae</i>	Bystřice pod Hostýnem	<i>progređiens, ovo,larva</i>	98% ethanol
3622	<i>Dreyfusia piceae</i>	Č. Budějovice, Branišov	<i>progređiens, ovo,larva</i>	98% ethanol
10373	<i>Dreyfusia nordmanniana</i>	Buchlovice	<i>al-gal</i>	-82°C
10539 - 10541	<i>Dreyfusia nordmanniana</i>	Libín	<i>sistens</i>	-82°C
11449 - 11453	<i>Dreyfusia nordmanniana</i>	Buchlovice	<i>al-gal</i>	-82°C
12009 - 12011	<i>Dreyfusia nordmanniana</i>	Buchlovice	<i>al-gal</i>	-82°C
812	<i>Dreyfusia prelli</i>	Buchlovice	<i>al-ex</i>	98% ethanol
854	<i>Dreyfusia prelli</i>	Buchlovice	<i>al-gal</i>	98% ethanol
10397	<i>Dreyfusia prelli</i>	Buchlovice	<i>al-gal</i>	-82°C
10841 - 10843	<i>Dreyfusia prelli</i>	Buchlovice	<i>al-gal</i>	-82°C

3.2. Metody

Všechny dále uváděné metody byly prováděny výhradně s použitím aerosolových špiček, aby se předešlo případné kontaminaci cizorodou DNA či DNA z ostatních analyzovaných vzorků. K analýze bylo použito (vzhledem k velikosti) 5-6 jedinců z jednoho klonu.

3.3. Izolace DNA

Vzorky, které byly uchovávány v ethanolu byly před analýzou ponechány na buničité vatě při pokojové teplotě, aby se odpařily ethanolové zbytky. Čistý ethanol totiž sráží DNA, a proto by mohl negativně ovlivnit DNA extrakci. Izolace DNA byla prováděna pomocí několika metod.

3.3.1. Izolace extrakčním pufrem (Cox and Hebert, 2001; Frati et al., 2001)

Směs na extrakční pufr (EP):

885 μ l ddH₂O; 100 μ l 1x PCR pufr s MgCl₂ (TopBio); 10 μ l 1% Tween 20; 5 μ l proteinázy K o koncentraci 100 μ g/ml.

K analyzovanému vzorku bylo přidáno 25 μ l EP, poté byl vzorek ponechán 15 minut v mrazícím boxu o teplotě -76°C. Dalším krokem byla inkubace po 2 hodiny při 65°C a závěrečná inaktivace proteinázy K při 95°C po 15 minut. Vzniklá směs byla uskladněna v mrazícím boxu při teplotě -20°C, kde byla připravena k použití jako templát pro PCR.

3.3.2. Izolace pomocí „Squishing Buffer“ (SB) (Gloor et al., 1993)

Izolační roztok byl následujícího složení:

TRIS – Cl, pH 8,2 10mM; EDTA 1mM; NaCl 25mM; Proteináza K 200 μ g/ml

První krok izolace se lišil v závislosti na předchozím uchování vzorku. Pokud byl vzorek z lihu, byl nejprve přenesen do AE pufru (QIAGEN; 10mMTris-Cl, 0,5mM EDTA, pH9) (aby došlo k rehydrataci tkání), kde byl ponechán přes noc, poté byl AE pufr odstraněn. Další postup byl stejný pro vzorky zmražené i lihové.

Do mikrozkušavky o objemu 1,5 ml byl přenesen vzorek, poté bylo přidáno 50 μ l SB, vzorek byl pomocí zatavené 1000 μ l špičky zhomogenizován a zkušavka byla přenesena do inkubačního bločku, kde byla při teplotě 37°C ponechána 30 minut, poté byla teplota zvýšena na 95°C po dobu 10 minut, aby došlo k inaktivaci proteinázy K. Na závěr byl vzorek centrifugován 2 minuty/ 11 000 otáček. Tato směs byla uskladněna při teplotě 4°C a přímo použita jako DNA templát pro PCR.

3.3.3. Izolace pomocí kitu ZR Genomic DNA II (ZYMO RESEARCH)

Izolace byla provedena dle návodu výrobce. Lišila se v posledním kroku, kdy byla eluce DNA provedena do 2 frakcí, každá o objemu 20 μ l. 1. frakce byla uskladněna při teplotě 4°C a ihned používána. 2. frakce byla uskladněna v mrazícím boxu při teplotě -20°C.

3.3.4. Izolace pomocí kitu Invisorb Spin Tissue mini (INVITEK)

Izolace proběhla dle návodu výrobce s těmito úpravami: inkubace po přidání proteinázy K probíhala 2 hodiny ve vodní lázni o teplotě 52°C, závěrečná eluce DNA byla provedena do 2 frakcí, první o objemu 100 μ l (uchována při 4°C a ihned používána), druhá o objemu 50 μ l (uskladněna v mrazícím boxu při teplotě -20°C).

3.3.5. Izolace pomocí kitu DNeasy blood and tissue (QIAGEN)

Izolace dle návodu výrobce se závěrečnou elucí DNA rozdělenou do 2 frakcí, první o objemu 100 μ l (polovina první frakce byla ihned po izolaci zamražena na -20°C a uchována pro pozdější použití, druhá polovina byla ponechána při teplotě 4°C), druhá frakce o objemu 75 μ l zamražena na -20°C.

3.4. Primery

K amplifikaci vybraných úseků byly použity univerzální primery zvolené na základě údajů z literatury (Folmer et al., 1994; Simon et al., 1994; Ji et al., 2003; Sandström et al., 2001; Leonardo and Muiru, 2003). Tyto primery jsou ve většině případů umístěny v konzervovaných oblastech genomu a umožňují tak úspěšnou amplifikaci většiny analyzovaných vzorků. Primery specifické jsou navrženy podle

mšice *Daktulosphaira vitifoliae* ze sesterské skupiny *Phylloxeridae*, k amplifikaci variabilnějších úseků. Přehled použitých primerů a jejich sekvencí je uveden v Tab.2. Přesné umístění úspěšně naamplifikovaných fragmentů společně s polohou použitých primerů je znázorněné na Obr. 3. Amplifikace pro oblasti ITS a AT-control region nebyly úspěšné, proto jejich bližší popis není uveden.

Tab. 2 Seznam a popis použitých primerů

Název primeru	Sekvence 5' →3'	Typ
Cytochromoxidáza podjednotka 1		
LCO 1490 ¹⁾	GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G	F
HCO 2198 ¹⁾	TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA	R
AT-control region		
Adel AT for114486 ⁷⁾	CAA TTA TAG AAC AGA TTC CTC	F
Adel AT rev1 213 ⁷⁾	TTG AAG TAT GAA TCC AAA AGC	R
Genom endosymbionta <i>Buchnera sp.</i> Arginyl -tRNA synthasa		
argS1 ⁴⁾	TGT CCA ATA TGC ATT TCT TTT GC	F
Buch 5' rev ⁴⁾	CCA GAT ATT ACT CAC CCG TT	R
Genom endosymbionta <i>Buchnera sp.</i> 16S rRNA (rrs)		
Buch 16S1fb ⁵⁾	TTC GTG ACG TTA CCC GCA GA	F
common reverse primer ⁶⁾	CCC CTA CGG TAA CCT TGT TAC GAC	R
Internal transcribed spacer		
ITS 5f ²⁾	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	F
ITS 1r ³⁾	CTT TTC CTC CSC TTA YTR ATA TGC	R
ITS f1 ³⁾	TAC ACA CCG CCC GTC GCT ACT A	F
ITS 4r ²⁾	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC	R

1) Folmer et al., 1994

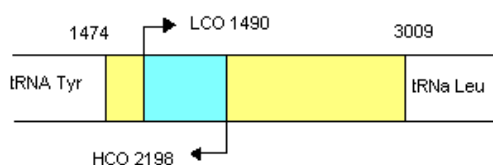
2) Simon et al., 1994

3) Ji et al., 2003

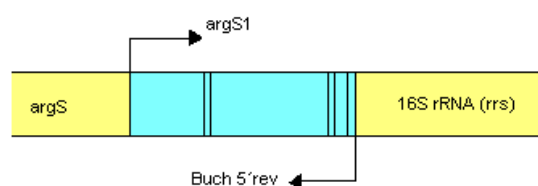
4), 5), 7) Žurovcová, 2008

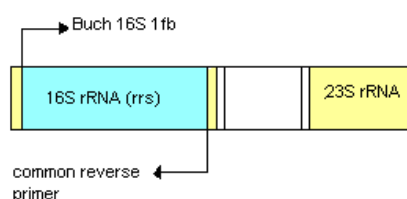
6) Leonardo and Muiru, 2003

Cytochromoxidáza podjednotka 1



Linearizovaný úsek genomu *Buchnera sp.*





Obr. 3 Grafické znázornění amplifikovaných úseků společně s použitými primery (modře jsou vyznačeny naamplifikované úseky, žlutě kódující oblasti, dvojitou čarou jsou ohraničeny nekódující oblasti)

3.5. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

3.5.1. Reakční směs

Základní PCR reakce byla míchána do mikrozkušavky o objemu 200 μ l, její příprava probíhala na ledu, standardně se do každé reakce přidávalo BSA (Bovine Serum Albumine 20mg/ml, Fermentas), pro stabilizaci a zvýšení účinnosti. Přidání polymerázy byl poslední krok. Výsledný objem reakce byl vždy 12,5 μ l. Základní reakce byla s Taq DNA polymerázou Unis. Při optimalizaci reakce byly vyzkoušeny 2 typy polymeráz a zvýšení koncentrace hořčíku. Všechny typy reakcí jsou zaznamenány v tabulce 3.

Tab. 3 Přehled použitých PCR reakčních směsí

	Základní PCR reakční směs	PCR směs pro amplifikaci úseku COI	PCR směs pro amplifikaci úseku argS	PCR směs pro amplifikaci úseku 16S rRNA
dH ₂ O	7,15 μ l	7,15 μ l	6,19 μ l	7,15 μ l
10x pufr ¹⁾	1,25 μ l	1,25 μ l	1,25 μ l	1,25 μ l
dNTPs ²⁾	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
primery F/R (5 μ M)	0,75 μ l/0,75 μ l	0,75 μ l/0,75 μ l	0,75 μ l/0,75 μ l	0,75 μ l/0,75 μ l
BSA	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l
MgCl ₂ (25mM) (TopBio s.r.o.)	-----	-----	0,96 μ l	-----
polymeráza:				
Unis ³⁾	0,1 μ l	0,1 μ l	0,1 μ l	0,1 μ l
LA ⁴⁾	0,1 μ l			
DNA	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l

1) 10x Ex Taq pufr (TaKaRa)

2) dNTPs 2,5mM (TaKaRa)

3) Taq DNA polymeráza Unis (TopBio s.r.o.)

4) LA DNA polymerases mix (TopBio s.r.o.)

3.5.2. PCR profil k amplifikaci jedntolivých fragmentů

Oblast COI („Barcoding“)

Všechny amplifikace proběhly na přístroji Bioer XP cycler. Amplifikační program měl tyto kroky: predenaturace 94°C, 1 min., následovalo 35 cyklů (denaturace 94°C, 30 s, aneling 47°C, 35 s, elongace 72°C, 1 min. 30s), reakci ukončila postelongace 72°C, 1 min. 30s.

Oblast genu argS

Amplifikace proběhly na přístrojích Bioer XP cycler a Eppendorf Mastercycler. Amplifikační program měl tyto kroky: predenaturace 94°C, 2min., následovalo 35 cyklů (denaturace 94°C, 30 s, aneling 55°C, 30 s, elongace 72°C, 1 min.), reakci ukončila postelongace 72°C, 2 min.

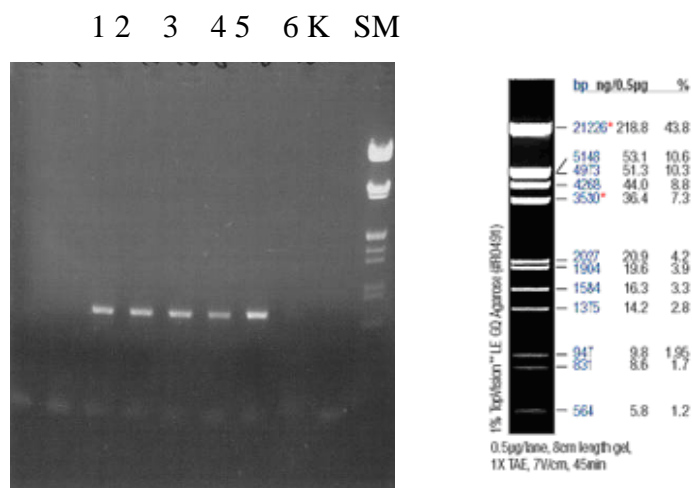
Oblast 16S rRNA (rrs)

Amplifikace proběhly na přístroji Eppendorf Mastercycler. Amplifikační program měl tyto kroky: predenaturace 94°C, 1min., následovalo 35 cyklů (denaturace 94°C, 30 s, aneling 59°C, 30 s, elongace 72°C, 1 min.), reakci ukončila postelongace 72°C, 2 min.

3.6. Gelová elektroforéza

Po proběhnutí PCR reakce byla úspěšnost amplifikace (velikost a množství produktu) ověřena pomocí elektroforetické verifikace. 2 µl PCR produktu byly naneseny na 1% agarózový gel. Gel byl připraven rozpuštěním 1g agarózy (SeaKem LE Agarose, Cambrex) ve 100 ml 1x TAE pufru (zásobní roztok 50x TAE pufr je následujícího složení: 121 g TRIS; 28,55 ml kyseliny octové; 50 ml 0,5M EDTA pH 8,0; 421,45 ml H₂O) a rozvařením v mikrovlnné troubě. Poté byl zchlazen pod tekoucí vodou na teplotu cca 50°C a bylo do něj přidáno 10 µl ethidium bromidu o koncentraci 0,5µg/µl. Takto připravený gel byl nalit do připravené formy s hřebínky zajišťujícími vznik jamek. Gel byl ponechán tuhnout cca 40 minut při pokojové teplotě. Elektroforéza probíhala při napětí 110V 35 minut v pokojové teplotě. Pro porovnání velikosti a množství PCR produktu byl na gel nanášen velikostní marker Lambda

DNA/EcoRI+Hind III (FERMENTAS). Rozdělený PCR produkt byl vizualizován na UVP transiluminátoru (UVP transilluminator). Výsledek byl fotograficky zdokumentován digitální kamerou UVP. Fotografie gelu po úspěšné PCR amplifikaci je na Obr. 4.



Obr. 4 Vlevo výsledná fotografie PCR produktů po rozdělení. 1-6 testované vzorky fragmentu COI (1-5 úspěšně, 6 neúspěšně amplifikované), K kontrolní PCR reakce bez přidané DNA, SM Lambda DNA/EcoRI+Hind III marker, vpravo Lambda DNA/EcoRI+Hind III marker

3.7. Purifikace PCR produktu

Po ověření úspěšnosti amplifikace daného fragmentu byl PCR produkt přečištěn. K přečištění byly používány 2 metody.

3.7.1. DNA clean and concentrator clean-up (ZYMO Research)

Přečištění PCR produktu probíhalo dle návodu výrobce.

3.7.2. Přečišťování pomocí směsi ExoSap-IT® (USB) (Dugan et al., 2002)

K 10 µl PCR produktu bylo přidáno 1,5µl ExoSapu. Míchání probíhalo na ledu. Poté byla směs inkubována v přístroji Eppendorf Mastercycler nebo Bioer XP cyler po dobu 30 minut při 37°C a 15 minut při 87°C. Vzniklý produkt byl připraven přímo na sekvenační reakci.

3.8. Sekvenační PCR reakce

Pro sekvenování byl použit kit BigDye Terminator v 3.1. Cycle Sequencing Kit.

Složení reakční směsi (10 µl):

1,0 µl sekvenačního mixu; 1,5 µl 5x sekvenačního pufru; 0,5 µl primeru (5 µM); 10-40 ng PCR produktu, vše doplněno dd H₂O do 10 µl. Míchání směsi probíhalo na ledu.

Sekvenační program

V sekvenační reakci byl templátem přečištěný PCR produkt. Reakce probíhala na přístrojích Eppendorf Mastercycler nebo Bioer XP cycler. Skládala se z těchto kroků: predenaturace 96°C, 2min., následovalo 25 cyklů (denaturace 96°C, 15 s, aneling 50°C, 20 s, elongace 60°C, 4 min). Poté došlo ke zchlazení na uchovávací teplotu 4°C.

3.9. Přečištění sekvenační reakce pomocí Sephadexu a aerosolových špiček

Na přípravu 1 sloupečku bylo potřeba 0,025 g Sephadexu (SephadexTM G-50 Superfine, Amersham Biosciences) a 400 µl ddH₂O. Sephadex byl ve vodě rozpuštěn a vzniklá směs byla ponechána bobtnat minimálně 45 min. při 4 °C.

Aerosolová špička (100 µl) byla uříznuta cca 5 mm pod filtrem a umístěna do 0,5 ml mikrozkušavky. Na každý sloupeček bylo nanášeno 150 µl roztoku Sephadexu a pipetovacím dudlíkem byla protlačena přebytečná voda. Poté bylo nanášeno na sloupeček dalších 150 µl, přebytečná voda byla opět protlačena pipetovacím dudlíkem, na závěr bylo nanášeno cca 100µl Sephadexu a centrifugováno 2 min při 1 000 rcf. Nakonec byly sloupečky přemístěny do nové mikrozkušavky.

Produkt sekvenační reakce byl nanášeno přímo na čerstvě připravený sloupeček Sephadexu. Sloupečky byly centrifugovány po 2 min. při 1 000 rcf.

Přečištěná sekvenační reakce byla vysušena ve vakuové vysoušečce Speed-VAC (cca 40 min) při pokojové teplotě.

3.10. Analýza sekvencí

K analýze sekvencí byl použit automatický sekvenátor ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems, Biologické centrum AV ČR, ÚMBR, Laboratoř genomiky).

3.11. Statistické zpracování sekvencí

Kontrolní identifikace sekvencí byla prováděna pomocí databáze NCBI BlastSearch (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sekvence byly upraveny v programu SeqMan (DNASTAR, Inc.), kde byla z komplementárních sekvencí vytvořena jedna konsenzuální. Tato sekvence byla dále zkontrolována a v případě potřeby opravena v programu Mega 4 (Tamura et al., 2007). Program MEGA 4 byl dále použit pro tvorbu alignmentů (vytvořeny metodou ClustalW). Dále byla v tomto programu vypočtena průměrná délka a nukleotidové složení sekvencí, určen počet variabilních míst, parsimoniální variabilita a genetická vzdálenost (model Kimura2-Parameter).

Pomocí metody Neighbour-Joining (NJ) na základě modelu genetické vzdálenosti Kimura2-parametr byly vytvořeny dendrogramy. U markeru *argS* byly gapy zohledňovány jako variabilita a nikoliv jako chybějící data (použita volba „Pairwise deletion“). Statistická podpora stromu byla testována pomocí metody bootstrap (2000 opakování). Tato metoda byla vybrána dle jejího ověřeného použití u markeru COI týkajícího se *Dipter* (Smith et al., 2005b; Smith et al., 2006) a je také standardní pro DNA „barcoding“ (www.barcodinglife.org).

Při tvorbě dendrogramu COI fragmentu byla jako outgroup zvolena mšice *Daktulosphaira vitifoliae* ze sesterské čeledi *Phylloxeridae*. Při tvorbě dendrogramu u markeru *argS* byl jako outgroup použit sekundární symbiont *Buchnera sp.*. Bylo zapotřebí zohlednit jeho délkovou variabilitu u daného fragmentu, proto byla *Buchnera sp.* vybrána ze 2 hostitelských organismů – mšice *Acyrtosiphon pisum* (delší fragment) a *Schizaphis graminum* (kratší fragment).

Analýza haplotypů a jejich frekvencí byla provedena pomocí programu DnaSP ver. 3 (Rozas and Rozas, 1999).

Pomocí programu TaxonDNA (Meier et al., 2006) byla získána data na jejichž základě byly v programu Microsoft Excel vytvořeny histogramy.

4. Výsledky

V této práci byla testována vhodnost 2 mitochondriálních markerů, 1 nukleárního markeru a 2 markerů z genomu primárního endosymbionta *Buchnera sp.* k identifikaci druhů u druhových komplexů korovnic rodů *Dreyfusia* a *Pineus*. Amplifikace byla úspěšná pro fragment mitochondriálního genu COI a pro markery z genomu endosymbionta, kterými byly *argS* a 16S rRNA. Celkem bylo analyzováno 55 jedinců.

Charakteristika fragmentu genu COI

Cílová oblast v genu COI byla úspěšně naamplifikována u 51 jedinců, sekvence byly upraveny na jednotnou délku 647 bp. Počet variabilních míst byl 140 (21,63% z celkové délky sekvence), parsimoniální variabilita byla na 111 místech (17,1%). Průměrný obsah AT/GC v sekvencích byl 75,7/24,3. Dále byly spočítány genetické vzdálenosti uvnitř jednotlivých druhů, ty jsou pro všechny testované markery uvedeny v Tab. 4. Mezidruhovú variabilita pro marker COI je uvedena v Tab. 5. Průměrná hodnota vnitrodruhovú variability markeru COI je 0,94% a mezidruhovú 7,9%. Pro tento marker analýza rozlišila celkem 21 haplotypů, jejich přehled je uveden v Tab. 6. Ze všech získaných sekvencí byl vytvořen dendrogram (Obr. 5) znázorňující rozdělení do druhů.

Tab. 4 Vnitrodruhovú genetické vzdálenosti

Vnitrodruhovú variabilita			
Marker	COI	<i>argS</i>	<i>rrs</i>
Průměr (Směrodatná odchylka)			
<i>Dreyfusia nordmanniana</i>	0,004 (0,001)	0,01 (0,004)	0,043 (0,005)
<i>Dreyfusia prelli</i>	0,007 (0,002)	0,002 (0,002)	0,048 (0,006)
<i>Dreyfusia piceae</i>	0,001 (0,001)	0,014 (0,006)	0,001 (0,001)
<i>Pineus orientalis</i>	0,004 (0,001)	0,003 (0,001)	0,006 (0,001)
<i>Pineus strobi</i>	0,045 (0,006)	0 (0)	0,035 (0,004)
<i>Pineus pini</i>	0,004 (0,002)	0,006 (0,003)	0,031 (0,004)
<i>Pineus cembrae</i>	0,001 (0,001)	nenaamplifikováno	0,001 (0,001)
<i>Pineus pineoides</i>	n/c (n/c)	nenaamplifikováno	n/c (n/c)

n/c – průměr nebyl spočítán, u druhu byl osekvenován pouze 1 jedinec

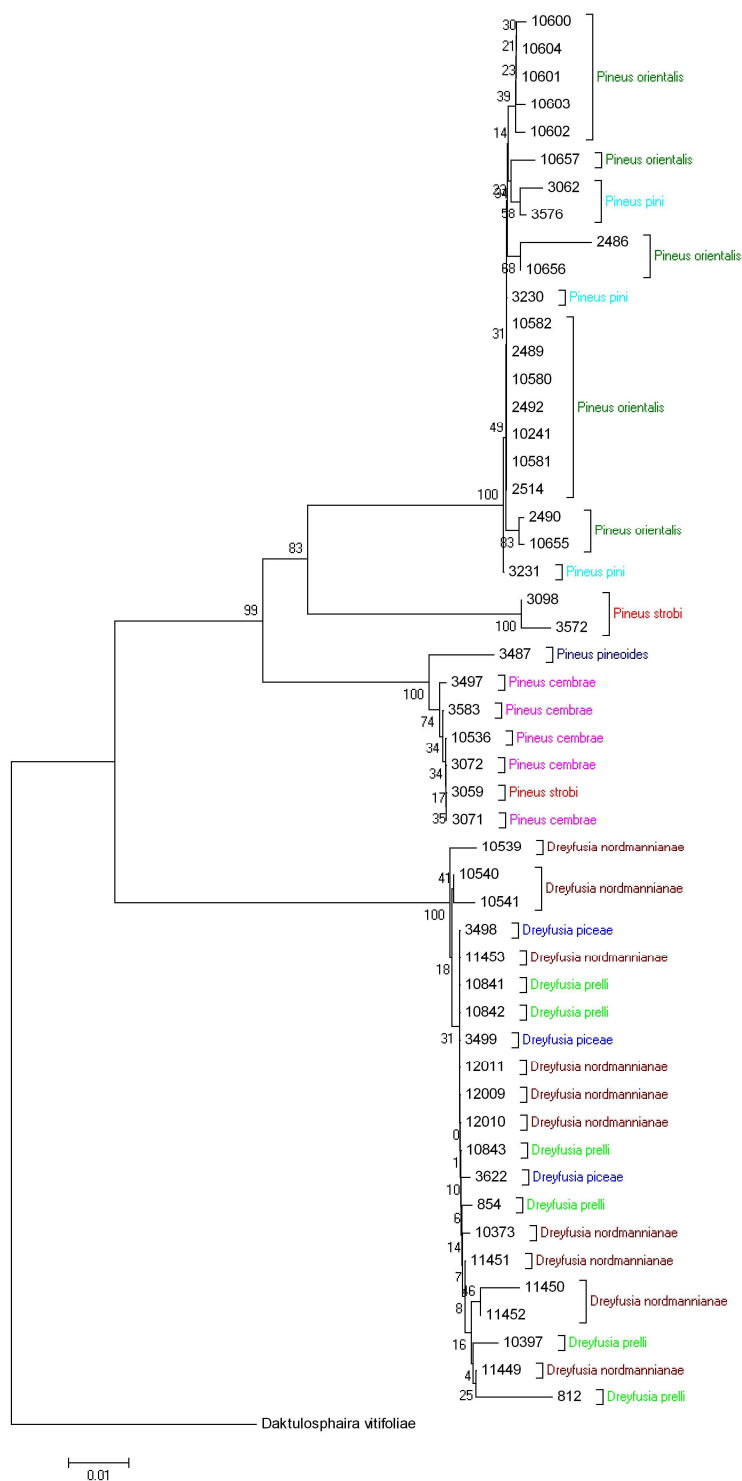
Tab. 5 Mezidruhové genetické vzdálenosti

	<i>D.nord.</i> ¹⁾	<i>D. prelli</i>	<i>D.piceae</i>	<i>P.orient.</i> ²⁾	<i>P.strobi</i>	<i>P.pini</i>	<i>P.cembrae</i>	<i>P.pineoides</i>
<i>D. nord.</i> ¹⁾		0,001	0,001	0,012	0,01	0,012	0,011	0,011
<i>D. prelli</i>	0,005		0,001	0,012	0,011	0,012	0,011	0,011
<i>D. piceae</i>	0,003	0,004		0,012	0,01	0,012	0,011	0,011
<i>P.orient.</i> ²⁾	0,116	0,119	0,115		0,008	0,001	0,009	0,01
<i>P.strobi</i>	0,111	0,113	0,11	0,069		0,008	0,006	0,007
<i>P.pini</i>	0,117	0,119	0,116	0,004	0,069		0,009	0,01
<i>P.cembrae</i>	0,1	0,102	0,099	0,069	0,044	0,068		0,004
<i>P.pineoides</i>	0,107	0,108	0,106	0,076	0,056	0,076	0,013	

1)-*Dreyfusia nordmanniana*e, 2) -*Pinus orientalis*. Průměry jsou psány černě, směrodatné odchylky zeleně.

Tab. 6 Přehled haplotypů COI

Haplotyp	Frekvence	Číslo vzorku (druh)
1	12	12009,12010,12011,11451,11452,11453 (<i>D. nordmanniana</i> e) 10841,10842,10843,10373 (<i>D.prelli</i>) 3498,3499 (<i>D.piceae</i>)
2	1	11449 (<i>D.nordmanniana</i> e)
3	1	11450 (<i>D.nordmanniana</i> e)
4	3	10539,10540,10541 (<i>D.nordmanniana</i> e)
5	1	812 (<i>D.prelli</i>)
6	1	854 (<i>D.prelli</i>)
7	1	10397 (<i>D.prelli</i>)
8	1	3622 (<i>D.piceae</i>)
9	1	2486 (<i>P. orientalis</i>)
10	11	2489,2492,10580,10581,10582,10656,2514,10241 (<i>P.orientalis</i>) 3230,3231,3576 (<i>P.pini</i>)
11	1	2490 (<i>P. orientalis</i>)
12	1	10655 (<i>P. orientalis</i>)
13	1	10657 (<i>P. orientalis</i>)
14	1	10600 (<i>P. orientalis</i>)
15	4	10601, 10602, 10603,10604 (<i>P. orientalis</i>)
16	5	3059 (<i>P.strobi</i>) 3071,3072,3583,10536 (<i>P.cembrae</i>)
17	1	3098 (<i>P.strobi</i>)
18	1	3572 (<i>P.strobi</i>)
19	1	3062 (<i>P.pini</i>)
20	1	3497 (<i>P.cembrae</i>)
21	1	3487 (<i>P. pineoides</i>)



Obr. 5 Dendrogram COI (Neighbour-Joining, Kimura2-Parameter, Pairwise deletion, Bootstrap 2000). Strom zakořeněn pomocí mšice *Daktulosphaira vitifoliae* ze sesterské skupiny *Phylloxeridae*. Jednotlivé druhy jsou odlišeny barevně.

Charakteristika fragmentu pro argS

Při použití tohoto markeru byla amplifikace úspěšná u 31 jedinců. Při tvorbě konsenzuálních sekvencí byla detekována rozdílná velikost fragmentu pro jednotlivé rody, proto byl statistickým analýzám každý rod podroben zvlášť.

Rod *Pineus*

Získané sekvence tohoto rodu byly upraveny na jednotnou délku 581bp. Počet variabilních míst byl 54, tj. 9,29% z celkové délky sekvence, parsimoniální variabilita byla na 40 místech (6,88%). Průměrný obsah AT/GT v sekvencích byl 80/20. Opět byly spočítány genetické vnitrodruhové (Tab. 4) a mezidruhové (Tab.7) vzdálenosti. Průměrná hodnota vnitrodruhové variability je 0,3% a mezidruhové variability je 6,06%. Analýza rozlišila celkem 4 haplotypy (Tab.8). I pro tento marker byl vytvořen dendrogram s rozdělením jednotlivých vzorků do druhů (Obr. 6).

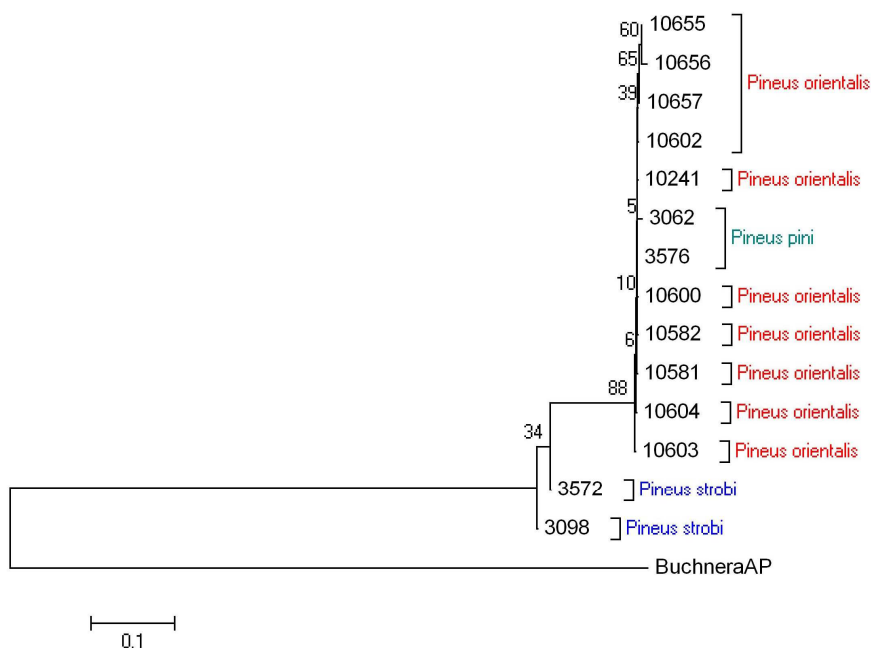
Tab. 7 Mezidruhové genetické vzdálenosti u rodu *Pineus*

	<i>P.pini</i>	<i>P.strobi</i>	<i>P.orientalis</i>
<i>P.pini</i>		0,012	0,002
<i>P.strobi</i>	0,086		0,012
<i>P.orientalis</i>	0,005	0,091	

Průměr je psán černě a směrodatná odchylka zeleně.

Tab. 8 Přehled haplotypů pro argS u rodu *Pineus*

Haplotyp	Frekvence	Číslo vzorku (druh)
1	10	3062,3576 (<i>P.pini</i>) 10241,10581,10582,10600,10602,10603, 10604,10657 (<i>P.orientalis</i>)
2	2	3098,3572 (<i>P. strobi</i>)
3	1	10655 (<i>P.orientalis</i>)
4	1	10656 (<i>P.orientalis</i>)



Obr. 6 Dendrogram argS rod *Pineus* (Neighbour-Joining, Kimura2-Parameter, Pairwise deletion, Bootstrap 2000). Strom zakořeněn pomocí endosymbionta *Buchnera sp.* jejímž hostitelem je mšice *Acyrtosiphon pisum*. Jednotlivé druhy jsou odlišeny barevně.

4.2.2. Rod *Dreyfusia*

Sekvence tohoto rodu byly upraveny na jednotnou délku 191 bp. Počet variabilních míst byl 9 (4,71 % z celkové délky sekvence), parsimoniální variabilita byla na 5 místech (2,61 %). Průměrný obsah AT/GT v sekvencích byl 68/32. Dále byly spočítány genetické vnitrodruhové (Tab. 4) a mezidruhové (Tab. 9) vzdálenosti. Průměrná hodnota vnitrodruhové variability je 0,86% a mezidruhové variability je 1,033%. Analýza rozlišila celkem 5 haplotypů (Tab. 10). I pro tento marker byl vytvořen dendrogram s rozdělením jednotlivých vzorků do druhů (Obr. 7).

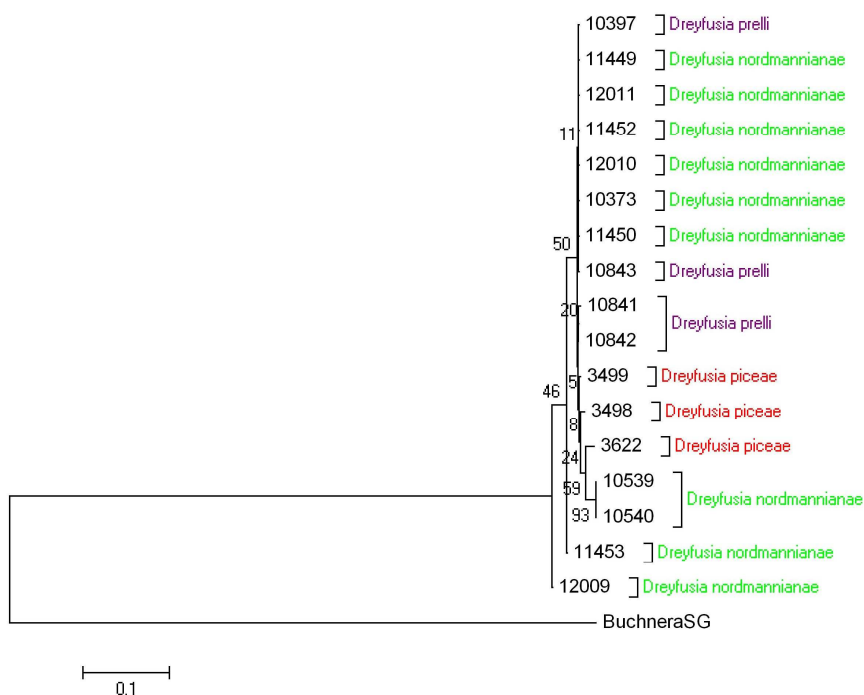
Tab. 9 Mezidruhové genetické vzdálenosti pro argS, rod *Dreyfusia*

	<i>D.prelli</i>	<i>D.nord.</i> ¹⁾	<i>D.piceae</i>
<i>D.prelli</i>		0,002	0,005
<i>D.nord.</i> ¹⁾	0,006		0,006
<i>D.piceae</i>	0,01	0,015	

1)-*Dreyfusia nordmanniana*. Průměr je psán černě, směrodatné odchylky zeleně.

Tab. 10 Přehled haplotypů pro argS u rodu *Dreyfusia*

Haplotyp	Frekvence	Číslo vzorku (druh)
1	12	10841,10842,10843,10397 (<i>D.prelli</i>) 11449,11450,11452,11453,12010,12011,10373 (<i>D.nordmannianae</i>) 3499 (<i>D. piceae</i>)
2	2	10539,10540 (<i>D.nordmannianae</i>)
3	1	12009 (<i>D.nordmannianae</i>)
4	1	3498 (<i>D. piceae</i>)
5	1	3622 (<i>D. piceae</i>)



Obr. 7 Dendrogram argS rod *Dreyfusia* (Neighbour-Joining, Kimura2-Parameter, Pairwise deletion, Bootstrap 2000). Strom zakořeněn pomocí endosymbionta *Buchnera sp.* jejímž hostitelem je mšice *Schizaphis graminum*. Jednotlivé druhy jsou odlišeny barevně.

Charakteristika fragmentu 16S rRNA (rrs)

Amplifikace byla úspěšná v 36 případech. Sekvence byly zarovnány na jednotnou délku 933bp. Variabilních míst se vyskytlo 175 (18,75% celkové délky sekvence), parsimoniální variabilita byla na 102 místech (10,93%). Průměrný obsah AT/GT v sekvencích byl 46,1/53,9. Opět byly spočítány vnitrodruhové (Tab. 4) a mezidruhové

(tab. 11) genetické vzdálenosti. Průměrná hodnota vnitrodruhové variability je 2,35% a mezidruhové variability je 4,53%. Celkem bylo rozlišeno 23 haplotypů (Tab. 12). Na závěr byl vytvořen dendrogram znázorňující rozdělení jednotlivých vzorků do druhů (Obr. 8)

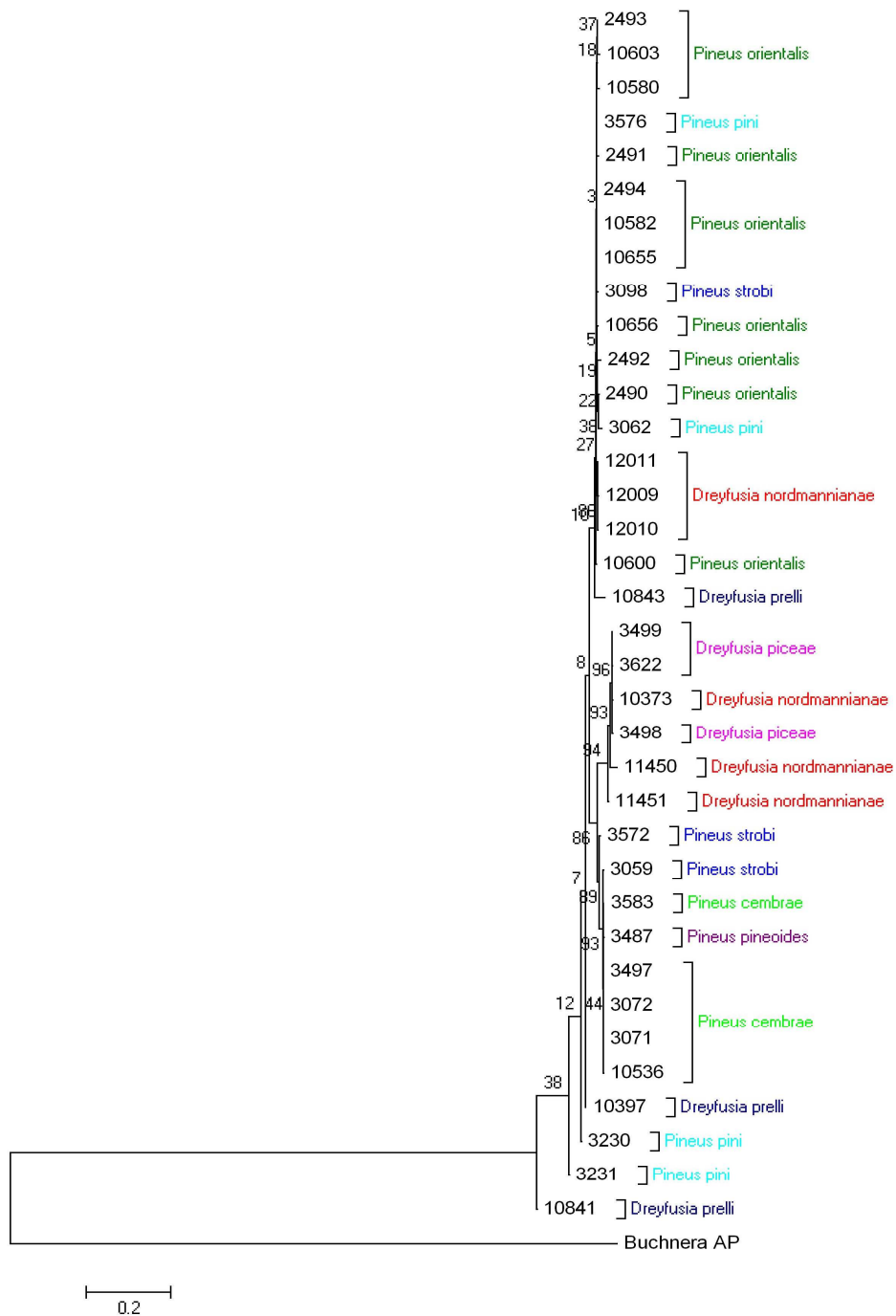
Tab. 11 Mezidruhové genetické vzdálenosti u rrs fragmentu

	<i>P.orient</i> ¹⁾	<i>P.strobi</i>	<i>P.cembrae</i>	<i>P.pini</i>	<i>P.pineoides</i>	<i>D.piceae</i>	<i>D.nord</i> ²⁾	<i>D.prelli</i>
<i>P.orient</i> ¹⁾		0,004	0,007	0,003	0,007	0,008	0,004	0,004
<i>P.strobi</i>	0,035		0,003	0,004	0,003	0,006	0,004	0,005
<i>P.cembrae</i>	0,053	0,021		0,006	0,001	0,006	0,005	0,006
<i>P.pini</i>	0,022	0,038	0,05		0,006	0,008	0,005	0,004
<i>P.pineoides</i>	0,052	0,021	0,002	0,049		0,006	0,005	0,007
<i>D.piceae</i>	0,074	0,05	0,043	0,073	0,042		0,004	0,007
<i>D.nord</i> ²⁾	0,04	0,043	0,048	0,047	0,047	0,039		0,005
<i>D.prelli</i>	0,034	0,05	0,061	0,04	0,06	0,079	0,056	

1)–*Pineus orientalis*, 2-*Dreyfusia nordmanniana*e. Průměry jsou psány černě, směr. odchylky zeleně.

Tab. 12 Přehled haplotypů pro fragment rrs

Haplotyp	Frekvence	Číslo vzorku (druh)
		2490,2494,10582,10600,10655 (<i>P.orientalis</i>)
1	9	3576 (<i>P.pini</i>) 12009,12010,12011 (<i>D.nordmanniana</i> e)
2	1	2491 (<i>P.orientalis</i>)
3	1	2492 (<i>P.orientalis</i>)
4	1	2493 (<i>P.orientalis</i>)
5	1	10580 (<i>P.orientalis</i>)
6	1	10603 (<i>P.orientalis</i>)
7	1	10656 (<i>P.orientalis</i>)
		3059 (<i>P.strobi</i>)
8	5	3071,3072,3497,3583 (<i>P.cembrae</i>)
9	1	3098 (<i>P.strobi</i>)
10	1	3572 (<i>P.strobi</i>)
11	1	10536 (<i>P.cembrae</i>)
12	1	3062 (<i>P.pini</i>)
13	1	3230 (<i>P.pini</i>)
14	1	3231 (<i>P.pini</i>)
15	1	3487 (<i>P.pineoides</i>)
16	1	3498 (<i>D.piceae</i>)
		3499 (<i>D.piceae</i>)
17	2	10373 (<i>D.nordmanniana</i> e)
18	1	3622 (<i>D.piceae</i>)
19	1	11450 (<i>D.nordmanniana</i> e)
20	1	11451 (<i>D.nordmanniana</i> e)
21	1	10397 (<i>D.prelli</i>)
22	1	10841 (<i>D.prelli</i>)
23	1	10843 (<i>D.prelli</i>)



Obr. 8 Dendrogram rrs (Neighbour-Joining, Kimura2-Parameter, Pairwise deletion, Bootstrap 2000). Strom zakořeněn pomocí endosymbionta *Buchnera sp.* jejímž hostitelem je mšice *Acyrtosiphon pisum*. Jednotlivé druhy jsou odlišeny barevně.

5. Diskuze

5.1. Izolace DNA a metodika PCR

Celkem bylo vyzkoušeno 5 metod izolace DNA, přičemž izolace extrakčním pufrem (Cox and Hebert, 2001; Frati et al., 2001) se nezdařila u žádného z analyzovaných vzorků. Izolace pomocí „Squishing buffer“ (Gloor et al., 1993) byla úspěšná ve všech případech, docházelo však k rychlé degradaci DNA a proto byla tato izolace vhodná pouze pro předběžný screening vzorků. Izolace pomocí kitů byly zprvu stejně úspěšné, v průběhu práce jsem ovšem zjistila, že i zde dochází k různě velké degradaci DNA ze sekundárního endosymbionta *Buchnera sp.* Nejvýhodnější metoda, izolace DNA z hlediska její dlouhodobé použitelnosti, byla s použitím kitu DNeasy blood and tissue (QIAGEN).

Během optimalizace reakce byla zkoušena vedle standardní polymerázy Taq DNA Unis ještě polymeráza LA DNA polymerase mix s lepším „proof readingem“, tedy s lepší schopností opravovat chyby, které vznikají při PCR amplifikaci DNA. Nepozorovala jsem ovšem žádné výrazné zlepšení, amplifikace fragmentů z genomu endosymbionta se dokonce zhoršila.

Při amplifikaci úseku *argS* z genomu endosymbionta *Buchnera sp.* jsem zkoušela zvětšit výtěžnost reakce změněním koncentrace hořčíku. Nejlepší výtěžnost reakce byla po přidání 0,96 μl MgCl₂ o koncentraci 25mM.

Produkty PCR byly přečišťovány pomocí 2 metod. Sloupeček DNA clean and concentrator clean-up (ZYMO Research) jsem použila pouze při vyšší výtěžnosti PCR produktu. V ostatních případech jsem použila směs enzymů ExoSap-IT® (USB) (Dugan et al., 2002). Tato metoda přečištění byla efektivnější. I při malé výtěžnosti PCR reakce jsem nakonec získala dobře čitelné sekvence.

5.2. Testování markerů

Na začátku práce jsem vybrala celkem 5 markerů. Pro fragment ITS jsem používala univerzální primery, které ovšem v reakci vytvořily několik nespecifických produktů. Je tedy zřejmé, že univerzální primery nejsou vhodné pro amplifikaci ITS oblasti u korovnic a bylo by potřeba navrhnout primery specifitější. Primery pro AT

oblast byly navrženy podle mšice *Daktulosphaira vitifoliae* ze sesterské skupiny *Phylloxeridae*. Amplifikace tohoto fragmentu se zdařila u 4 testovaných vzorků, při porovnání těchto sekvencí v databázi NCBI BlastSearch (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) však nebyla nalezena žádná podobnost se sekvencemi korovnic ani jejich sesterských skupin. Byly proto z dalších analýz vynechány. Amplifikace tohoto fragmentu se poté už nezdařila ani při opakovaných pokusech. Při prvotní analýze tedy i přes veškerá opatření došlo ke kontaminaci cizorodou DNA, která se i přes specifičnost primerů pro korovnice, dále naamplifikovala.

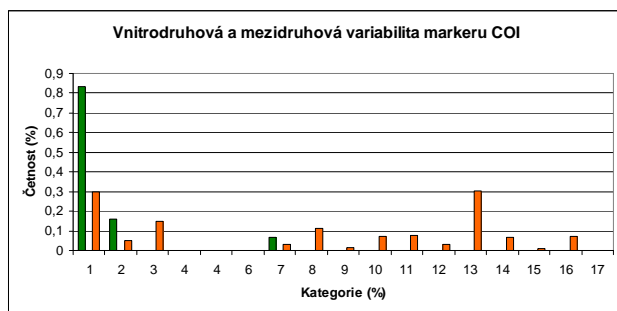
U markeru COI byly také použity univerzální primery. Získala jsem celkem 51 sekvencí z 55 analyzovaných jedinců. Neúspěšné amplifikace se vyskytovaly u vzorků, které byly před analýzou skladovány v 98% ethanolu, je tedy velice pravděpodobné, že došlo k degradaci DNA. V předchozí práci (Věchtová, P., 2008) byla degradace pozorována u vzorků skladovaných v ethanolu déle než 10 měsíců. V mé práci jsem ji zaznamenala i u vzorků skladovaných v ethanolu kratší dobu, kdy degradovala převážně DNA z endosymbiotických bakterií.

Pro amplifikaci úseku z genomu endosymbionta jsem použila primery navržené podle *Acyrtosiphon pisum* a jeden primer univerzální. Pro úsek *argS* byla amplifikace úspěšná u 31 a pro oblast *rrs* u 36 analyzovaných vzorků. Ačkoliv oba tyto fragmenty pocházejí ze stejného genomu a dokonce se v něm vyskytují za sebou obvykle nedocházelo k naamplifikování úseku *argS* i *rrs* ze stejného vzorku. Tento jev je opět možný vysvětlit velmi rychlou degradací DNA, která proběhla mezi jednotlivými pokusy.

5.3. Srovnání použitých markerů

5.3.1. Marker COI

„DNA barcoding“ v našem případě zhruba splňuje obecný předpoklad, že má mezidruhovou variabilitu přibližně 10x větší než vnitrodruhovou. Nicméně dochází k překryvu vnitro- a mezidruhové variability v kategorii do 1%, 2% a v kategorii do 7%. Tato skutečnost je dobře znázorněna v histogramu pro vnitrodruhovou a mezidruhovou variabilitu (Obr. 9).



Obr. 9 Vnitrodruhová a mezidruhová variabilita pro marker COI. Vnitrodruhová variabilita zeleně, mezidruhová oranžově

Variabilní místa zaujímají 21,63% celkové délky sekvence, což je v souladu s předchozí prací (Věchtová, P. 2008), kde variabilní místa zaujímala 25,2%, tato drobná odchylka je způsobena tím, že zmíněná práce byla zaměřena na větší počet druhů, ovšem s menším počtem analyzovaných jedinců uvnitř každého druhu. V práci Havill et al. (2006) jsou variabilní místa v 32,3% celkové délky sekvence. Tato hodnota je však pravděpodobně ovlivněna tím, že v této práci analyzovali druhy z celého areálu rozšíření korovnic a opět se soustředili na velký počet druhů ovšem s malým zastoupením jedinců.

V histogramu je překrývající se hodnota vnitro- a mezidruhové variability mezi 0-2% způsobena skutečností, že jsem se zaměřila na druhové komplexy, které v rámci podrodu vykazují jen velmi nízkou mezidruhovou variabilitu. Jsou morfologicky nerozlišitelné, mohou sdílet stejné haplotypy a odlišují se pouze svou biologií. Do těchto druhových komplexů patří *D. piceae* a *D. nordmanniana*., jejich mezidruhová variabilita je 0-2,4%. Dalším druhovým komplexem je holocyklická *P. orientalis* a anholocyklická *P. pini* s mezidruhovou variabilitou 0-0,3%.

Potvrdil se tedy předpoklad z předchozí práce (Věchtová P., 2008), že DNA „barcoding“ není vhodný k rozdělení zmíněných druhových komplexů.

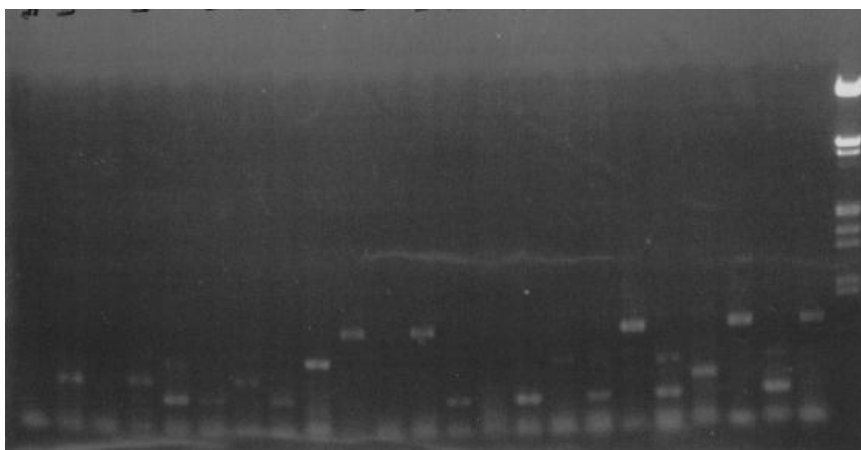
V dendrogramu se vytvořily 2 oddělené klastry rodu *Dreyfusia* a *Pineus* oba podpořené bootstrapem nad 95%. Rozdělení do druhů už tak jednoznačné nebylo. U rodu *Pineus* je jednoznačně oddělen pouze druh *P. cembrae*. U rodu *Dreyfusia* se nevytvořily jednoznačné klastry. Druhy *D. nordmanniana* a *D. prelli* zůstaly

promíchány. V práci Havill et al. (2006) nebyla *D. prelli* analyzována, v práci Věchtová, P. (2008) sice vytvořila oddělený klast, ovšem ten byl podporován velmi nízkým bootstrapem, v průměru jen 20%.

5.3.2. Marker *argS* (marker z genomu sekundárního endosymbionta *Buchnera sp.*)

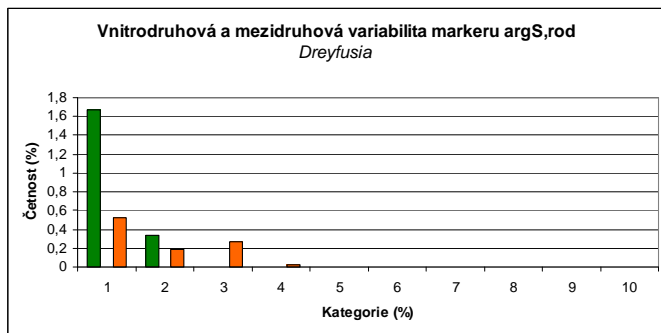
Tento marker byl vybrán na základě skutečnosti, že mezi jednotlivými druhy mšic se vyznačuje svou velkou délkovou variabilitou i variabilitou v uspořádání nukleotidů. Předpokládala jsem, že stejná situace nastane u korovnic. Délková variabilita byla patrná ihned po elektroforetickém rozdělení a vizualizaci PCR produktu. Amplifikované fragmenty pro rod *Pineus* měly délku 590 bp, pro rod *Dreyfusia* pouze 210 bp. (Obr.10).

K 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 SM

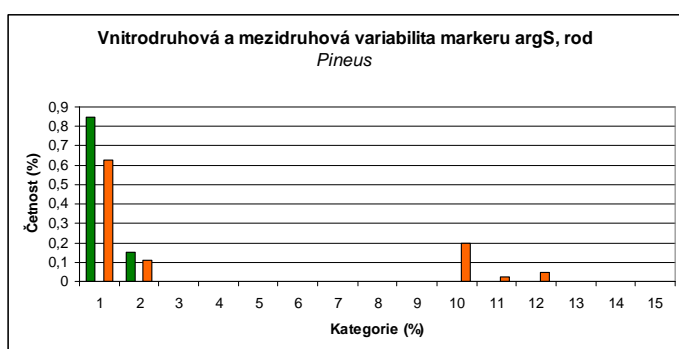


Obr. 10 Vizualizace PCR produktů, marker *argS*, rody *Dreyfusia* a *Pineus*. K- kontrolní reakce bez DNA, SM- velikostní Lambda DNA/EcoRI+Hind III marker. Vzorky 2-8, 13-17, 19, 20, 22 náleží rodu *Dreyfusia*, vzorky 9-12, 18, 21 rodu *Pineus*.

Tato variabilita však znemožnila celkové analýzy rodů *Dreyfusia* a *Pineus* dohromady. U rodu *Dreyfusia* v kategorii do 1% byla vnitrodruhová variabilita větší než mezidruhová, naopak u rodu *Pineus* se v kategorii do 1% variabilty téměř překrývaly. Tato skutečnost však může být způsobena i tím, že u rodu *Pineus* se zdařila analýza pouze u 14 vzorků ze kterých 10 bylo stejného druhu. Vše je opět dobře znázorněné na histogramech (Obr. 11, 12)



Obr. 11 Vnitrodruhová a mezidruhová variabilita, marker argS, rod *Dreyfusia*, vnitrodruhová variabilita zeleně, mezidruhová oranžově.



Obr. 12 Vnitrodruhová a mezidruhová variabilita, marker argS, rod *Pineus*, vnitrodruhová variabilita zeleně, mezidruhová oranžově.

U rodu *Pineus* se v dendrogramu jasně oddělil druh *P. strobi*. Druhy *P. pini* a *P. orientalis* sice nejsou jasně odděleny, ale podpora klastru pro *P. pini* je pouze 5%. U rodu *Dreyfusia* se do samostatného klastru s podporou nad 90% oddělil pouze druh *Dreyfusia nordmanniana* z lokality Libín. V této lokalitě byl druh sbírán i v jiném stádiu vývoje (*sistens*), ke stejné jasnému oddělení těchto vzorků došlo i u markeru COI. Při vizuálním porovnávání sekvencí v programu Mega 4 jsem zjistila, několik odlišností v nukleotidovém složení. Tyto rozdíly jsou uvedeny v tabulce 13.

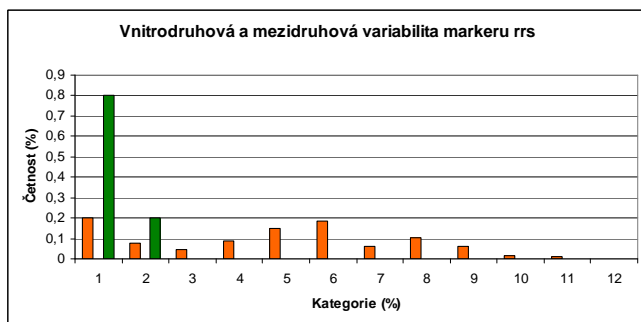
Tab.13 Rozdíly v nukleotidovém složení druhu *Dreyfusia nordmanniana* z různých lokalit

Marker	báze	Nukleotid u jedince z Libína	Nukleotid u jedince stejného druhu z jiné lokality
COI	607	C	T
argS	28	G	A
	57	G	C
	168	G	A
	185	A	T

Při porovnávání sekvencí vzorků z lokality Libín (marker COI) v databázi NCBI BlastSearch (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) s referenčními sekvencemi byla zjištěna 100% shoda s druhem *Dreyfusia nordmanniana*, nejde tedy o chybné určení druhu, ale nejspíše o izolovanou skupinu jedinců, kde došlo ke změně v genomu.

5.3.3. Marker rrs

I tento marker byl vybrán z genomu endosymbionta *Buchnera sp.* Opět byla očekávána jeho vyšší variabilita i uvnitř jednotlivých druhů. Při amplifikaci se muselo postupovat opatrně, aby nedošlo ke kontaminaci cizorodou DNA neboť je to úsek ze 16S rRNA a velmi podobné sekvence 16S rRNA se vyskytují i u bakterií, které mohly být naamplifikovány spolu s požadovaným produktem. Předpoklad o variabilitě se potvrdil, jak je patrné i z dendrogramu (Obr. 8) i z histogramu (Obr. 13). Vnitrodruhová variabilita je největší v kategorii do 1%, mezidruhová variabilita je naopak rovnoměrně rozdělena mezi 1-11%, nejvyšších hodnot dosahuje v kategorii do 6%.



Obr. 13 Vnitrodruhová a mezidruhová variabilita, marker rrs, vnitrodruhová variabilita zeleně, mezidruhová variabilita oranžově

Tento marker byl ze všech vybraných nejvariabilnější. Při tvorbě dendrogramu nedošlo k vytvoření jasně odlišných klastrů s jednotlivými rody. Jednoznačně, s bootstrapovou podporou nad 90%, byly seskupeny druhy *Dreyfusia nordmanniana* a *Dreyfusia piceae*. Rod *Pineus* nebyl jasně vymezen. Toto uspořádání přibližně odpovídá fylogenetickému stromu na Obr. 2, kde Steffan (1968) seskupil rody *Dreyfusia* a *Pineus* do společné podčeledi *Pineinae* na základě uspořádání chromosomů a symbiontů.

Následně byly pro srovnání vytvořeny dendrogramy na základě kombinací sekvencí dvou markerů (příloha 1,2,3). V případě kombinace markeru COI a rrs došlo k jasnému oddělení rodů *Dreyfusia* (s bootstrapovou podporou 85%) a *Pineus* (s bootstrapovou podporou 96%) nicméně na druhové úrovni již nebylo rozdělení klastrů tak jednoznačné. Pro marker COI a argS u rodu *Pineus* došlo dokonce k jasnému vytvoření 3 klastrů pro každý analyzovaný druh, naopak u kombinace těchto markerů pro rod *Dreyfusia* zůstaly druhy nerozděleny.

U rodů *Dreyfusia nordmannianae* a *Dreyfusia prelli* jsem na základě jejich velkých morfologických odlišností očekávala, že se v dendrogramu rozdělí do samostatných klastrů. Žádný z vybraných markerů však tyto morfologické odlišnosti na molekulární úrovni neodhalil a proto tyto druhy zůstaly nerozděleny.

6. Závěr

Z pěti testovaných molekulárních markerů pro druhovou identifikaci korovnic (ITS, *argS*, *rrs*, AT-Rich, COI) byly úspěšně naamplifikovány a osekvenovány mitochondriální marker COI a markery z endosymbionta *Buchnera sp.* *argS* a *rrs*. Vytvoření dendrogramů znázorňujících vztahy jednotlivých rodů a druhů na základě těchto markerů byla provedena shlukovací (klastrovací) distanční metodou Neighbour-Joining s modelem Kimura 2-Parameter.

Všechny markery rozdělily v dendrogramech analyzované jedince na rodové úrovni do správných taxonomických skupin. Na druhové úrovni se však jasného rozdělení dosáhlo pouze u rodu *Pineus* v dendrogramu, k jehož tvorbě byly použity 2 markery (COI a *argS*). Marker *rrs* se projevil jako nejvariabilnější z testovaných. Bude proto použit i pro analýzy dalších druhových komplexů. Vhodná bude jeho kombinace s dalším stejně variabilním mitochondriálním či nukleárním markerem.

7. Literatura

- Annand, P. N., 1928.** A Contribution Toward a Monograph of the Adelginae (Phylloxeridae) of North America. *Palo Alto, CA: Stanford Univ. Press.* 146 pp.
- Bargues, M. D., Marcilla, A., Ramsey, J. M., Dujardin, J. P., Schofield, C. J., Mas-Coma, S., 2000.** Nuclear rDNA-based molecular clock of the evolution of *Triatominae* (Hemiptera: Reduviidae), vectors of Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 95: 567-573
- Baumann, P., Moran, N. A., Baumann, L., 2000.** Bacteriocyte-associated endosymbionts of insects. *The prokaryotes*, 1: 403-438
- Binazzi, A., Covassi, M., 1991.** Contributions to the knowledge of the conifer aphid fauna XII, a review of the species of *Dreyfusia* Boerner occurring in Italy with description of *Dreyfusia nebrodensis* n. sp. (Homoptera: Adelgidae). *Redia*, 74: 233-288
- Binazzi, A., 2000.** Notes on and key to winged forms of adelgids recorded from Italy (Homoptera, Aphidoidea, Adelgidae). *Redia*, 83: 187-215
- Blackman, R. L., Eastop, V. F., 1994.** Aphids on the World's Trees: An Identification and Information Guide. *Wallingford, UK: Cab Int.* 987 pp.
- Börner, C.V., 1907.** Systematik und Biologie der Chermiden. *Zool. Anz.*, 32: 412-28
- Börner, C. V., 1908.** Eine monographische Studie über die Chermiden. *Arb. Kais. Biol. Anst.f.Land-U.Forstw.*, 6: 81-320
- Börner, C. V., Heinze, K., 1957.** Aphidina-Aphidoidea. In Tierische Schädlinge an Nutzpflanzen. Homoptera 2. Teil, ed. *H Blunck*, pp. 323-355. *Berlin: Paul Parey*
- Buchner, P., 1965.** Endosymbiosis of animal with plant microorganisms. *New York: John Wiley.* 909 pp.
- Burdon, E. R., 1908.** Some critical observations on the European species of the genus chermes. *Journ.Econ.Biol.*, 2: 119-148.
- Carter, C. I., 1971.** Conifer Woolly Aphids (Adelgidae) in Britain. *London: Her Majesty's Stationery Off.* 51 pp.
- Caterino, M. S., Cho, S., Sperling, F. A. H., 2000.** The current state of insect molecular systematics: A thriving tower of Babel. *Annu. Rev. Entomol.*, 45: 1-54

- Clark, M. A., Moran, N. A., Baumann, P. Wernegreen, J. J., 2000.** Cospeciation between bacterial endosymbionts (*Buchnera*) and a recent radiation of aphids (Uroleucon). *Evolution*, 54: 517-525
- Covassi, M., Binazzi, A., 1981.** Contributions to the knowledge of the conifer aphid fauna IV. Remarks on several woolly aphids occurring in Italy (Homoptera, Adelgidae). (in Ital.). *Redia*, 64: 303-330.
- Cox, A. J., Hebert, P. D. N., 2001.** Colonization, extinction, and phylogeographic patterning in a freshwater crustacean. *Molecular Ecology*, 10:331-386
- Darby, A. C., Birkle, L. M., Turner, S. L., Douglas, A. E., 2001.** An aphidborne bacterium allied to the secondary symbionts of whitefly. *FEMS Microbiology Ecology*, 1235: 1-8
- Douglas, A. E., 1998.** Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology*, 43: 17-37
- Douglas, L. J., Haymer, D. S., 2001.** Ribosomal ITS1 polymorphisms in *Ceratitidis capitata* and *Ceratitidis rosa* (Diptera: Tephritidae). *Entomological Society of America*, 94: 726-731
- Dugan, K. A., Lawrence, H. S., Hares, D. R., Fisher, C. L., Budowle, B., 2002.** An Improved method for post-PCR purification for mtDNA sequence analysis. *Journal of Forensic Science*, 47(4):811-8
- Eichhorn, O., 1968.** Problems of the population dynamics of silver fir woolly aphids, genus *Adelges* (= *Dreyfusia*), Adelgidae. *Z. Angew. Entomol.*, 61: 157-214
- Eichhorn, O., 1969.** Investigations on woolly aphids of the genus *Adelges* An. (Homopt.:Adelgidae) and their predators in Turkey. *Tech. Bull. CIBC* 12: 83-103
- Eichhorn, O., 1989.** On the life cycle (heterogony) and host alternation of the conifer woolly aphids *Sacchiphantes* spp. (Hom, Adelgidae). *J. Appl. Entomol.*, 108(1): 44-53
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994.** DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294-299.
- Fрати, F., Spinsanti, G., Dallai, R., 2001.** Genetic variation of mt COII gene in the collembolan *Isotoma klovstadi* from Victoria land, Antarctica: evidence for population

differentiation. *Polar Biology*, 24: 934-940

Fukatsu, T., Watanabe, K., Sekiguchi Y., 1998. Specific detection of intracellular symbiotic bacteria of aphids by oligonucleotide-probed *in situ* hybridization. *Applied Entomology and Zoology*, 33: 461-472

Fukatsu, T., Tsuchida, T., Nikoh, N., Koga, R., 2001. *Spiroplasma* symbiont of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 1284-1291

Gloor, G. B., Preston, C. R., Johnson-Schlitz, D. M., Nassif, N. A., Phillis, R. W., Benz, W. K., Robertson, H. M., Engels, W. R., 1993. Type I repressors of P element mobility. *Genetics*, 135: 81-95

Havill, N. P., Montgomery, M. E., Yu G., Shiyake, S., Caccone A., 2006a. Mitochondrial DNA from Hemlock Woolly Adelgid (Hemiptera: Adelgidae) Suggests Cryptic Speciation and Pinpoints the Source of the Introduction to Eastern North America. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 99: 195-203.

Havill, N. P., Foottit, R. G., von Dohlen, C. D., 2006b. Evolution of host specialization in the Adelgidae (Insecta: Hemiptera) inferred from molecular phylogenetics. *Mol. Phylog. Evol.*, 44: 357-370

Havill N. P., Foottit R. G., 2007. Biology and evolution of Adelgidae. *Annu.Rev.Entomol.*, 52: 325-349

Hebert, P. D. N., Penton, E. H., Burns, J. M., Janzen, D. H., Hallwachs, W., 2004 Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Science*, USA. 101: 14812-14817.

Chen, D. Q., Campbell, B. C., Purcell, A. H., 1996. A new *Rickettsia* from a herbivorous insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *Current Microbiology*, 33: 123-128

Chen, D. Q., Purcell, A. H., 1997. Occurrence and transmission of facultative endosymbionts in aphids. *Current Microbiology*, 34: 220-225

Chen, D. Q., Montllor, C. B., Purcell, A. H., 2000. Fitness effects of two facultative endosymbiotic bacteria on the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, and the blue alfalfa aphid, *A. kondoi*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 95: 315-323

- Cholodkovsky, N., 1896.** Zur Biologie der Lärchen-Chermes-Arten. *Zool.Anz.*, 19: 37-40.
- Inouye, M., 1945.** Monographische Studie über die japanischen Koniferen-Gallenläuse (Adelgidae). *Bull. Sapporo Bran. Gov. For. Exp. Stn.*, 15: 1-91
- Ji, Y., Zhang, D., He, L., 2003.** Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. *Molecular Ecology Notes*. 3: 581-585.
- Lai, C. Y., Baumann, L., Baumann, P., 1994.** Amplification of *trpEG*; adaptation of *Buchnera aphidicola* to an endosymbiotic association with aphids. *Proceedings of the National Academy of Science of th USA*, 91: 3819-3823
- Lampel, G., 1968.** Die biologie des blattlaus-generationswechsels. *Jena: VEB Gustav Fischer*.
- Leonardo, T. E., Muiru, G. T., 2003.** Facultative symbionts are associated with host plant specialization in pea aphid populations. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 270: S209-S212
- Loxdale, H. D. & Lushai, G., 1998.** Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research*, 88: 577-600.
- Mantovani, B., Francardi, V., Binazzi, A., Leccese, A., 2002.** A molecular approach to differentiate the species of *Dreyfusia* Börner occurring in Italy (Aphidoidea, Adelgidae). *Redia*, 84: 151-159.
- Marchal, P., 1913.** Contribution a l'etude de la biologie des *Chermes*. *Ann. Sci. Nat., Zool.*, 18: 171-226.
- Meier, R., Kwong, S., Vaidya, G., Ng, Peter K. L., 2006.** DNA Barcoding and Taxonomy in *Diptera*: a Tale of High Intraspecific Variability and Low Identification Success. *Systematic Biology*, 55: 715-728
- Moran, N. A., Munson, M. A., Baumann, P., Ishikawa, H., 1993.** A molecular clock in endosymbiotic bacteria is calibrated using the insect hosts. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 253: 167-171
- Moran, N. A., Kaplan, M. J., Gelsey, M. J., Murphy, T. G., Sholes, E. A., 1999.** Phylogenetics and evolution of the aphid genus *Uroleucon* based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Systematic Entomol.*, 24: 85-93.

- Munson, M. A., Baumann, P., Kinsey, M. G., 1991.** *Buchnera* gen. nov. and *Buchnera aphidicola* sp. nov., a taxon consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbiontes of aphids. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41: 566-568
- Munson, M. A., Baumann, P., Clark, M. A., Baumann, L., Moran, N. A., Voegtlin, D. J., Campbell, B. C., 1991b.** Evidence for the establishment of aphid-eubacterium endosymbiosis in an ancestor of four aphid families. *J. Bacteriol*, 173: 6321-6324
- Munson, M. A., Baumann, L., Baumann, P., 1993.** *Buchnera aphidicola* (a prokaryotic endosymbiont of aphids) contains a putative 16S rRNA operon unlinked to the 23S rRNA-encoding gene: sequence determination, and promoter and terminator analysis. *Gene*, 137: 171-178
- Oliver, K. M., Russel, J. A., Moran, N. A., Hunter, M. S., 2003.** Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100: 1803-1807
- Olsen, G. J., Woese, C. R., Overbeek, R., 1994.** The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. *J. Bacteriol*, 176: 1-6
- Pang, H., Winkler, H. H., 1993.** Copy number of the 16S r RNA gene in *Rickettsia prowazekii*. *J. Bacteriol*, 175: 3893-3896
- Pašek, V., 1954.** Vošky našich lesných drevín. Bratislava: Vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied.
- Rozas, J., Rozas, R., 1999.** DnaSP version 3: an integrated program for molekular analysis. *Bioinformatics*, 15: 174-175
- Sandström, J. P., Russel, J. A., White, J. P., Moran, N. A., 2001.** Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. *Molecular ecology*, 10: 217-228
- Scarborough, C. L., Ferrari, J., Godfray, H. C. J., 2005.** Aphid protected from pathogeny by endosymbiont. *Science*, 310: 1781
- Shearer, T. L., Coffroth, M. A., 2007.** Barcoding corals: limited by interspecific divergence, not intraspecific variation. *Molecular Ecology Notes* (published ahead online).

- Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y., Ishikawa, H., 2000.** Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. *APS. Nature*, 407: 81-86
- Schlötterer, Ch., Hauser, M. T., von Haeseler, A., Tautz, D., 1994.** Comparative Evolutionary Analysis of rDNA ITS Regions in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.*, 11(3): 513-522
- Simon, Ch., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., Flook, P., 1994.** Evolution, weihgting, phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 651-701.
- Simon, J. C., Carré, S., Boutin, M., Prunier-Leterme, N., Sabater-Muñoz, B., Latorre, A., Bournoville, R., 2003.** Host-based divergence in populations of the pea aphid: insights from nuclear markers and the prevalence of facultative symbionts. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 270: 1703-1712
- Smith, M. A., Woodley, N. E., Janzen, D. H., Hallwachs, W., Hebert P. D. N., 2005b.** DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proceedings of the National Academy of Science*, USA, 103: 3657-3662.
- Smith, M. A., Wood, D. M., Janzen, D. H., Hallwachs, W., Hebert, P. D. N., 2006.** DNA barcodes affirm that 16 species of apparently generalist tropical parasitoid flies (Diptera, Tachinidae) are not all generalists. *Proceedings of the National Academy of Science*, USA. 104: 4967-4972.
- Steffan, A. W., 1962.** Die eidonomischen und zytologischen Grundlagen bei der Entstehung anholozyklisch-parthenogenetischer Adelgidae-Species (Homoptera: Aphidina). *Z. Angew. Entomol.*, 65: 444-52
- Steffan, A. W., 1963.** Zur systematischen und phylogenetischen Stellung der Agamospecies in den Adelgiden-Genera (Homoptera: Aphidoidea). *Verb. Dtsch. Zool. Gesell.*, 26: 640-55
- Steffan, A. W., 1964.** Problems of the evolution and speciation in Adelgidae (Homoptera; Aphidoidea). *Can. Entomol.*, 96: 155-57

Steffan, A. W., 1968. Evolution und Systematik der Adelgidae (Homoptera: Aphidina): Eine Verwandtschaftsanalyse auf vorwiegend ethologischer, zytologischer und karyologischer Grundlage. *Zoologica*, 115: 1-139

Steffan, A. W., 1972. Unterordnung Aphidina, Blattläuse. In Die Forstschädlinge Europas. Ein Handbuch in fünf Bänden, ed. W Schwenke, pp. 162-386, Hamburg: Parey

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24: 1596-1599

Tsuchida, T., Koga, R., Shibao, H., Matsumoto, T., Fukatsu, T., 2002. Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Molecular ecology*, 11: 2123-2135

Unterman, B. M., Baumann, P., McLean, D. L., 1989. Pea aphid symbiont relationships established by analysis of 16S rRNAs. *Journal of Bacteriology*, 171: 2970-2974

Věchtová, P. 2008. Druhá identifikace korovnic (*Adelgidae*) na základě molekulárních markerů

Via, S., Bouck, A. C., Skillman, S., 2000. Reproductive isolation between divergent races of pea aphids on two hosts. II. Selection against migrants and hybrids in the parental environments. *Evolution*, 54: 1626-1637

von Dohlen, C. D., Teulon, D. A. J., 2003. Phylogeny and historical biogeography of New Zealand indigenous Aphidini Aphids (Hemiptera: Aphididae). *Annals of the Entomological Society of America*, 96:107-116.

Zhang, D. X., Hewitt, G. M., 1997. Insect Mitochondrial Control Region: A Review of its Structure, Evolution and Usefulness in Evolutionary Studies. *Biochem. Syst. Ecol.*, Vol 25, No. 2: 99-120.

Internetové zdroje:

<http://lesprace.silvarium.cz/>

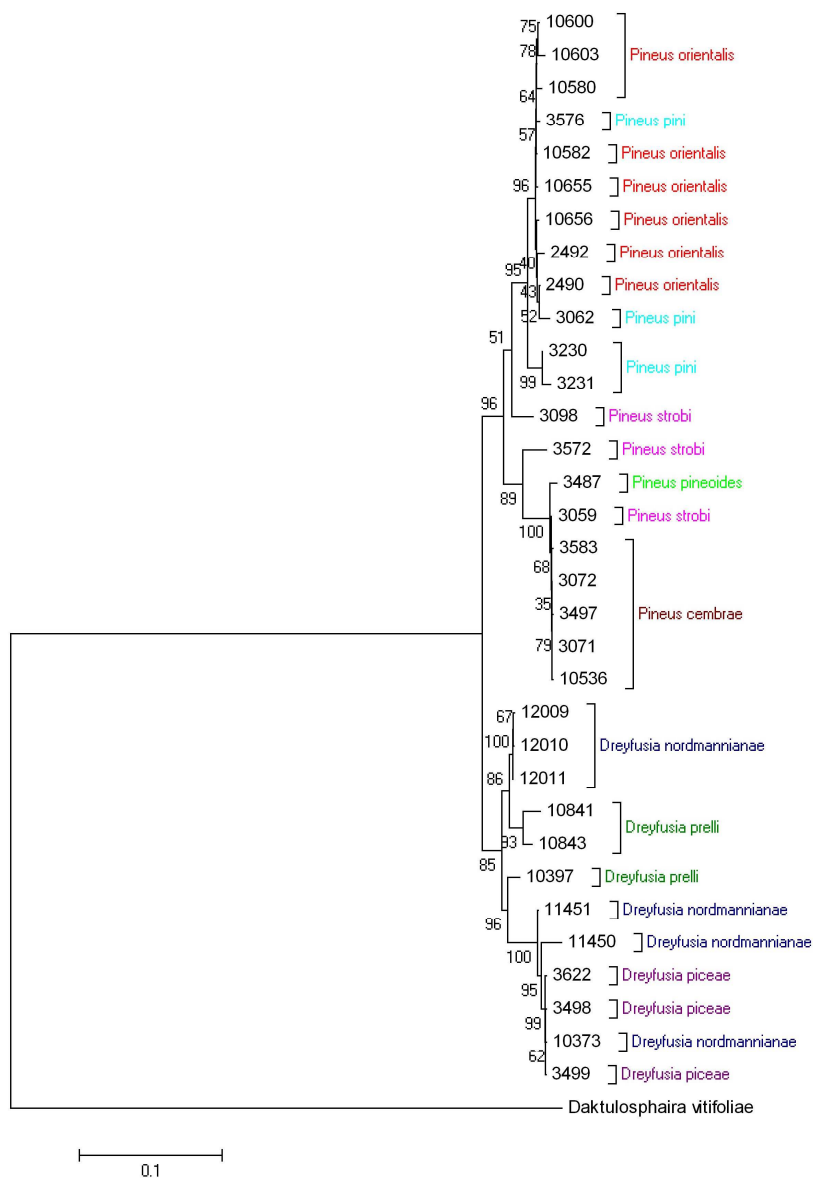
www.ext.colostate.edu

www.ncbi.nlm.nih.gov

www.barcodinglife.org

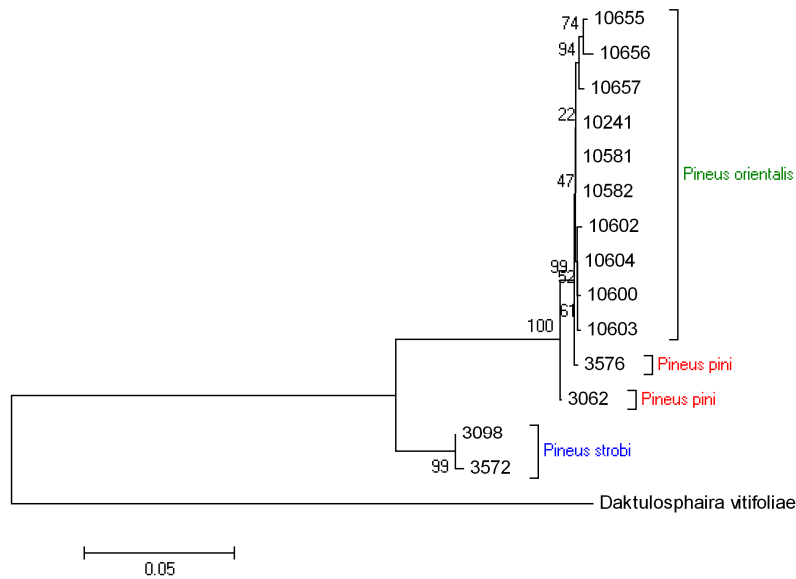
8. Přílohy

Příloha 1: Dendrogram COI+ rrs



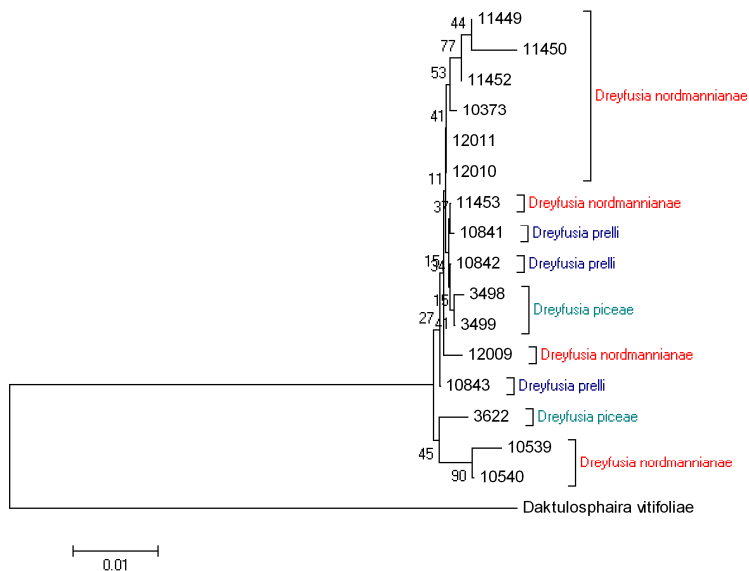
Dendrogram COI+rrs (Neighbour-Joining, Kimura2-Parameter, Pairwise deletion, Bootstrap 2000). Strom zakořeněn pomocí mšice *Daktulosphaira vitifoliae* ze sesterské skupiny *Phylloxeridae*. Jednotlivé druhy jsou odlišeny barevně.

Příloha 2: Dendrogram COI+argS, rod *Pineus*



Dendrogram COI+argS, rod *Pineus* (Neighbour-Joining, Kimura2-Parameter, Pairwise deletion, Bootstrap 2000). Strom zakořeněn pomocí mšice *Daktulosphaira vitifoliae* ze sesterské skupiny *Phylloxeridae*. Jednotlivé druhy jsou odlišeny barevně.

Příloha 3: Dendrogram COI+argS, rod *Dreyfusia*



Dendrogram COI+argS, rod *Dreyfusia* (Neighbour-Joining, Kimura2-Parameter, Pairwise deletion, Bootstrap 2000). Strom zakořeněn pomocí mšice *Daktulosphaira vitifoliae* ze sesterské skupiny *Phylloxeridae*. Jednotlivé druhy jsou odlišeny barevně.