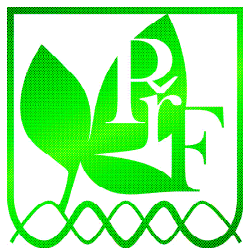


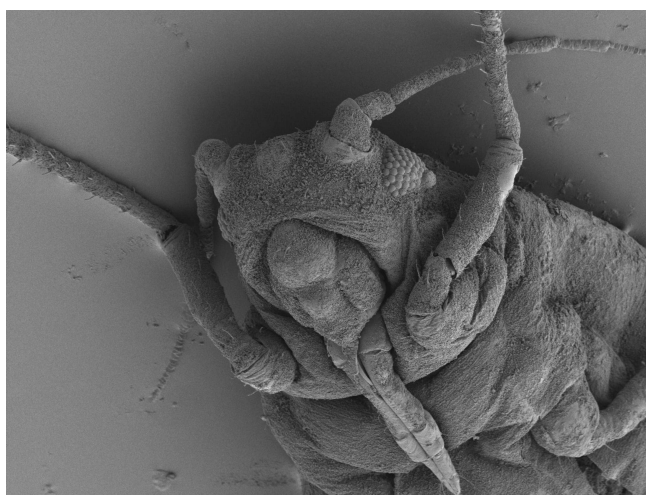
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta



## **Genetická variabilita přírodních populací *Diuraphis noxia* (*Aphididae*)**

Bakalářská práce

**Věra Slaninová**



Školitel: PaedDr. Martina Žurovcová, PhD.  
Školitel specialista: Ing. Jan Havelka, PhD.

České Budějovice  
2010

## **Bakalářská práce**

Slaninová, V., 2010. Genetická variabilita přírodních populací *Diuraphis noxia* (Aphididae) [Genetic variability of natural populations of *Diuraphis noxia* (Aphididae), Bc. Thesis, in Czech.] Faculty of science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic, 56 pp.

### **Anotace**

Sedm alozymů bylo podrobena analýze variability a barvitelnosti polyakrylamidovou elektroforézou. Jeden z těchto alozymů byl vybrán a byla testována jeho nukleotidová variabilita mezi jedinci *D. noxia*. Bylo získáno 18 sekvencí části genu pro fosfoglukomutázu z různých jedinců pocházejících z několika lokalit po celém světě. V těchto sekvencích bylo objeveno 5 haplotypů.

### **Annotation**

Seven allozyme markers were investigated for variability and colourability by PAGE electrophoresis. One allozyme coding gene was chosen and tested for nucleotide variability among worldwide collections of the Russian Wheat Aphid (*Diuraphis noxia*). We got 18 sequences of phosphoglucomutase (*Pgm*) gene from various populations. Five haplotypes were found within this 18 populations.

Projekt byl financován GAČR, 522/09/1940, ze záměru Entomologického ústavu Z 50070508 a Přírodovědecké fakulty 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, 26. 4. 2010

.....

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat své školitelce PaedDr. Martině Žurovcové za odborné vedení, dohled, rady a informace. RNDr. Petru Starému za poskytnutí části analyzovaného materiálu. Také Mgr. Lucii Kučerové za její pomoc nejen v začátcích. Anně Kuřátkové a Daniele Chundelové za konzultace ohledně počítačového zpracování dat. Zbytku kolektivu naší laboratoře za přátelskou atmosféru a podporu. A samozřejmě také své rodině za jejich skvělou podporu po celou dobu studia.

# Obsah

1	Úvod.....	5
1.1	Hospodářský význam .....	7
2	Cílepráce.....	9
3	Molekulární markery.....	10
3.1	Proteinové markery .....	10
3.2	Markery na úrovni DNA .....	11
3.2.1	Genetické markery založené na metodě PCR .....	12
3.2.1.1	RAPD – PCR.....	12
3.2.1.2	AFLP – PCR.....	13
3.2.1.3	Mikrosatelitní DNA.....	13
3.2.2	Sekvenační metoda.....	14
3.2.2.1	Mitochondriální DNA .....	15
3.2.3	Genetické markery založené na anlyze endosymbiontů.....	16
4	Vyhodnocení molekulárních markerů .....	17
4.1	Alozymy .....	17
4.2	RAPD - PCR .....	17
4.3	AFLP – PCR.....	18
4.4	Mikrosatelitní markery .....	19
4.5	mtDNA .....	20
4.6	Analýza endosymbiontů .....	21
4.7	Výběr metody .....	22
5	Experimentální práce.....	24
5.1	Analýza alozymů.....	24
5.1.1	Studované alozymy .....	24
5.1.2	Homogenizace .....	24
5.1.3	Elektroforéza proteinů.....	25
5.1.4	Detekce alozymů .....	25
5.1.5	Vyhodnocení alozymové elektroforézy a výběr proteinu .....	26
5.2	DNA analýza .....	27
5.2.1	Navržení primerů.....	27
5.2.2	Extrakce RNA a reverzní transkripce.....	28
5.2.3	Ektrakce DNA .....	29
5.2.3.1	Ektrakce pomocí kitu .....	29
5.2.3.2	Extrakce pomocí Squishing Bufferu (Gloor a kol., 1993) .....	29
5.2.4	Reakční směs .....	29
5.2.5	PCR profil .....	30
5.2.6	Gelová elektroforéza .....	30
5.2.7	Pufirikace PCR produktu .....	31
5.2.8	Sekvenační reakce a její zpracování.....	32
5.2.9	Analýza sekvencí.....	32
6	Výsledky.....	34
6.1	Rešeršní práce .....	34
6.2	Alozymová elektroforéza .....	34
6.3	Gen pro fosfoglukomutázu (PGM) .....	35
7	Diskuze.....	41

7.1	Literární rešerše .....	41
7.2	Alozymová elektroforéza a detekované alozymy .....	41
7.3	Extrakce DNA .....	42
7.4	Metodika PCR .....	42
7.5	Purifikace PCR reakce .....	43
7.6	Gen pro fosfoglukomutázu .....	43
8	Závěr .....	45
9	Použitá literatura .....	46
10	Přílohy .....	52

# 1 Úvod

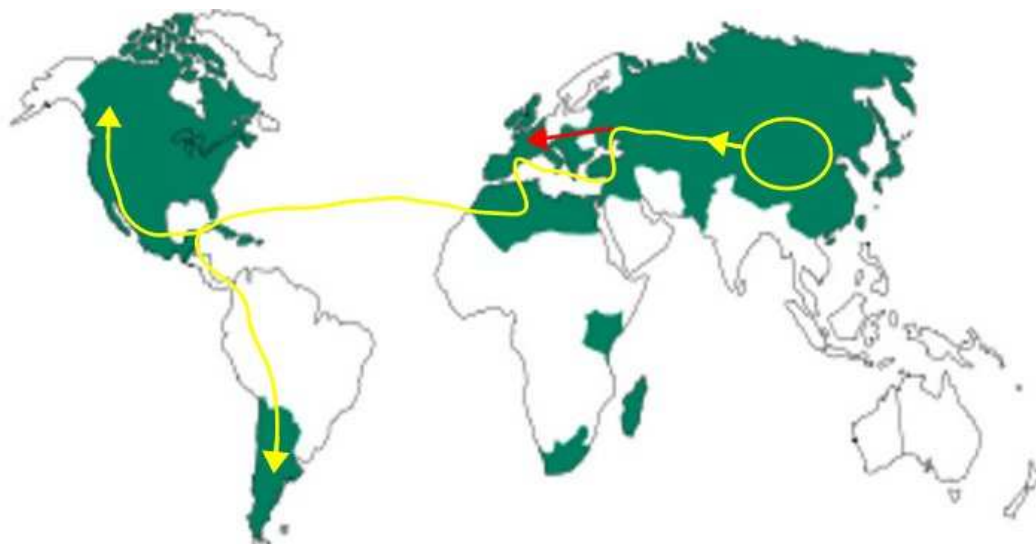
Čeď *Aphididae* (mšicovití) je v rámci řádu *Hemiptera* monofyletická a je příbuzná čeledím *Adelgidae* a *Phyloxeridae*, přičemž vzájemné vztahy mezi těmito čeleděmi nejsou stále zcela vyjasněné. Je to starobylá skupina, jejíž společný předek se vyskytoval zhruba před 250 miliony let. Jednotlivé podřády a čeledi se začaly oddělovat v období jury, tedy zhruba před 150 miliony let (Martinez-Torres a kol., 2001) a v dnešní době obsahuje tato čeď něco přes 4700 druhů (van Emden a Harrington, 2007). Jedná se o drobné živočichy s měkkým tělem. Obvykle vytvářejí na rostlinách kolonie a většina jedinců na téže rostlině jsou klony jedné nebo několika živorodých samic. Živí se sáním rostlinných šťáv, přičemž nejen že ničí napadené rostliny, ale jsou též přenašeči různých rostlinných virů.

Mšice mají navíc mutualistický vztah s endosymbiotickými bakteriemi, přičemž primárním endosymbiontem jsou bakterie druhu *Buchnera aphidicola* z čeledi *Enterobacteriaceae* (Martinez-Torres a kol., 2001).

Mšice zhoubná (*Diuraphis noxia*) je hospodářsky významným škůdcem. Během několika dní dokáže zničit až 70% úrody obilí (van Emden a Harrington, 2006). Ve studiích zabývajících se mšicemi (Hales a kol., 1997; Figueroa a kol., 1999; Martinez-Torres a kol., 2001; van Emden a Harrington, 2007; Liu a kol., "in press" a další) je řazena do tribu Macrosiphini (čeď *Aphididae*, podřád *Sternorrhyncha*, řád *Hemiptera*). Má trubkovitý tvar těla a živí se sáním na mladých rostlinách a výhoncích. Hostitelskými rostlinami jsou jak šlechtěné tak planě rostoucí rostliny z čeledi Poacea (Payton, 2004), přičemž divoce rostoucí trávy mohou být pro *D. noxia* zdrojem biotypové a genetické diverzity, stejně jako je tomu u *Schizaphis graminum* (Weiland a kol., 2008). Mšice zhoubná vstříkuje do rostlin látky, které způsobují typické podélné bílé pruhy na listech. Navíc způsobuje svinování listů do ruličky, v nichž se ukrývá a je tak chráněna před postřikem a částečně i před přirozenými nepřáteli (Payton, 2004). Díky velkým škodám na úrodách je nyní *D. noxia* častým námětem mnoha výzkumů a proto také získala titul „mšice roku 2009“.

Jedna z prvních zmínek o *Diuraphis noxia* se podle van Emdena a Harringtona (2007) objevuje v ruské literatuře již v roce 1914. Možná proto se také označuje jako „Russian wheat aphid“, tedy ruská mšice pšeničná. Původem je však ze střední Asie, z oblasti mezi Kavkazem a horami Tian Shan. Z těchto míst se poté začala šířit do celého světa. Nejdříve se na počátku 20. století rozšířila do Moldavské republiky a na Ukrajinu. Zde byla také poprvé identifikována. Z Ukrajiny se v roce 1978 rozšířila do Turecka, dále do Francie, severní Afriky a v 80. letech také do Mexika,

odkud se začala šířit do severní a jižní Ameriky (van Emden a Harrington 2007). Z původní oblasti se zhruba v té době rozšířila také do středomoří a jedna z vedlejších větví invadovala do střední Evropy (Starý a kol. 2003). V dnešní době se vyskytuje po celém světě s výjimkou Austrálie. V České republice se *Diuraphis noxia* poprvé objevila na ječmeni zhruba před 15 lety.



**Obr. 1:** Směry šíření a oblasti výskytu *D. noxia* (žlutě hlavní směr šíření do celého světa, červeně vedlejší směr šíření evropského haplotypu) (mapa rozšíření převzata z <http://www.agric.wa.gov.au>)

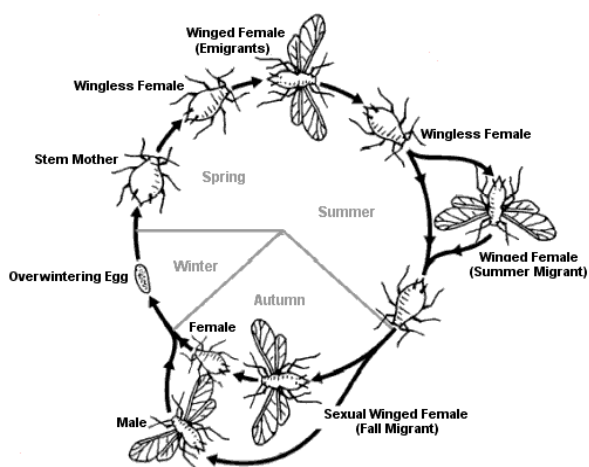
*D. noxia* (i ostatní *Aphididae*) má velmi složitý způsob rozmnožování, díky němuž je její výzkum v oblasti populační genetiky přinejmenším znesnadněn. Pochopení způsobu rozmnožování je přitom zásadní pro zjištění struktury populace a navržení a provedení experimentu (Hales a kol., 1997).

Podle současných poznatků to vypadá, že první pohlavní generace klade na podzim vajíčka, z nichž se líhnou samice, které se množí nepohlavně, pomocí apomiktické partenogeneze. Při tomto způsobu rozmnožování dávají živorodé samice vzniknout dalším živorodým samicím, tzv. klonům. Tyto klony dospějí během 7 – 10 dnů a začnou produkovat vlastní potomstvo. Takto rychlé rozmnožování je možné díky tomu, že každá samice se rodí již s embryi vlastních dcer. V reakci na podmínky prostředí (hlavně prostorové) pak vznikají buď bezkřídlé nebo okřídlené formy. Při nedostatku prostoru na původní hostitelské rostlině se okřídlené samice přesunou na další rostlinu a pokračují v rozmnožování (Hales a kol., 1997).

Počet partenogenetických cyklů je závislý na teplotě. Při měnících se teplotních podmínkách začnou živorodé samice plodit prepohlavní a pohlavní jedince. Tyto vejcorodé samice a samci dospívají déle. Vejcorodé samice se po dosažení pohlavní dospělosti spáří se samcem a následně

naklade dormantní vajíčka na stonky i jiné části rostlin. Tento způsob slouží hlavně k přezimování (případně k přečkání dalších nepříznivých podmínek). Bylo zjištěno (Hales, 1997; van Emden a Harrington, 2006) že v teplých oblastech se vyskytují hlavně mšice obligátně partenogenetické a cyklická partenogeneze (se střídáním pohlavní a partenogenetické části cyklu) se příliš nevyskytuje. Tyto populace pak postrádají mechanismus rekombinace a rychle divergují hromaděním mutací (Hales 1997).

Podle van Emdena a Harringtona (2006) může v chladných podmínkách probíhat holocyklické rozmnožování se střídáním hostitelů (pšenice x ječmen). Naopak v některých částech Ameriky byly sice objeveny vejcorodé samice, ale žádní samci. To nasvědčuje tomu, že rozmnožování v těchto populacích probíhá pouze partenogeneticky.



**Obr.2:** Životní cyklus mšic (schématický náčrt – upraveno) (<http://www.omafra.gov.on.ca>)

## 1.1 Hospodářský význam

Mšice jsou velmi významnými škůdci hospodářských plodin. Poškozují nejen rostlinná pletiva a způsobují odumírání rostlin, ale navíc jsou to přenašeči rostlinných virů. Samotná *Diuraphis noxia* je spojována s přenosem viru žluté zakrslosti ječmene (Kiplagat, 2005). Proto je velmi důležité se výzkumem mšic zabývat. Pouze sledování diverzity, divergence, populační dynamiky, hranic druhů a způsobu šíření invazních druhů nám může pomoci vyhodnotit rizika, které mšice představují pro hospodářsky významné plodiny a také se s těmito hrozbami vypořádat. Navíc hlubší poznání jejich reprodukčního cyklu může být cestou k pochopení evolučních a adaptačních procesů.

Abychom mohli proti škůdcům účinně bojovat, musíme správně určit jeho druh. Mšice vykazují v



rámci druhů obrovskou morfologickou plasticitu. Morfologické znaky však umožňují identifikaci pouze u dospělých jedinců (Footit a kol., 2008). Proto se jako nejvhodnější pro tyto studie jeví molekulární markery, které jsou schopny nade vší pochybnost určit přesně druh jakéhokoliv organismu, u kterého jsme schopni extrahovat DNA a známe nějaký spolehlivý molekulární marker.

Molekulární markery jsou hlavním nástrojem populační genetiky, která je důležitým prostředkem pro studium genetické struktury živých populací. Tato věda studuje faktory, které tuto strukturu ovlivňují, jako je například genetický drift, mutace, přírodní selekce, adaptace a speciace. Zkoumá frekvenci alel a jejich distribuci a dává nám tak možnost vysledovat původ jednotlivých populací, jejich potenciální vývoj a další fakta důležitá pro boj s těmito škůdci (Hales, 1997;Footit a kol., 2008; Nordborg a Innan, 2002). Dává nám tedy veškeré informace, které potřebujeme pro vyšetření rizik spojených se mšicemi.

## 2 Cíle práce

- 1) Na základě literatury zhodnotit úspěšnost molekulárních markerů pro populační genetiku mšic (literární rešerše)
- 2) Vytipovat vhodný marker pro analýzu *D. Noxia*
- 3) Ověřit jeho použitelnost

## 3 Molekulární markery

Morfologické znaky dříve využívané v populačních a taxonomických studiích jsou nedostatečným vodítkem pro přesné určení druhů a charakteristik populací. Lze je použít pouze u dospělých jedinců a navíc jsou velmi ovlivňovány podmínkami prostředí (Powers a kol, 1989; Figueroa a kol, 1999). Oproti tomu molekulární marker je znak nebo část celkové informace, která vypovídá o podobnosti jedinců, populací nebo druhů pomocí charakteristických sekvencí DNA nebo aminokyselin v proteinech.

Molekulární markery tak mohou být vhodným nástrojem pro určení variability uvnitř populací i mezi nimi, stanovení hranic druhu a statutu populací, odhalování nových a kryptických druhů, řešení již existujících taxonomických a dalších problémů (Sunnuck, 2000; Meier, 2008).

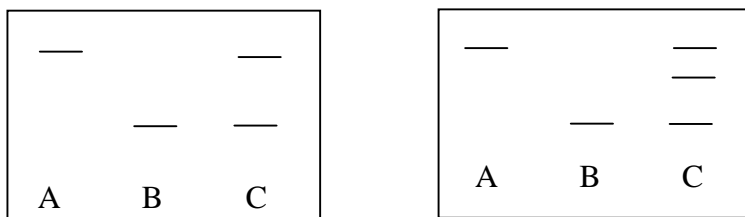
Pro řešení problémů, kterými se populační genetik zabývá je nutné vyvinout molekulární markery, které jsou dostatečně variabilní. Přílišná variabilita ale může být problematická, protože přináší i takové informace, které pro naši studii nepotřebujeme a mohou být spíše matoucí. Proto je vhodné se před započítím experimentu zamyslet a vybrat si takový marker, který může poskytnout informace o problému, o který se zajímáme (Sunnuck, 2000). Z celé řady molekulárních markerů se však jen některé osvědčily i pro výzkum *D. noxia* a příbuzných druhů.

### 3.1 Proteinové markery

Proteinovým markerem jsou především alozymy. Jsou to různé formy enzymu kódované rozdílnými alelami ve stejném lokusu. Často se liší v záměně aminokyseliny měnící elektrický náboj a proto se pro výzkum alozymů používá elektroforetické dělení. Následně jsou jednotlivé alozymy vizualizovány katalytickou reakcí specifického barvicího substrátu barveným enzymem (Hoelzel a Dover, 1991; Verrelli a Eanes, 2000). Pro elektroforetické dělení se využívají celulozoacetátové, agarózové, škrobové nebo polyakrylamidové gely, na kterých je možno dosáhnout lepších výsledků (Puterka, 1993; Verrelli a Eanes, 2000; Ward, Jann a Blackenhorn, 2004; Besold, Huck a Schmidt, 2008).

Jedná se o kodominantní marker (marker, který je schopný bezpečně rozpoznat homozygotního a heterozygotního jedince). Výstupem alozymové elektroforézy je zymogram. Alozymy pak mohou být monomerní nebo multimerní a v homozygotním stavu je od sebe nerozlišíme, protože na gelu vypadají jako jeden proužek o určité mobilitě. Monomerní enzym pak vykazuje dva proužky odpovídající daným alelám. Multimerní enzymy navíc vykazují i hybridní proužky, které svým

počtem odpovídají číslu  $n+1$  (u dimeru 3 proužky, u tetrameru 5 proužků). Na obrázku 3. je schéma gelu s detekovaným monomerním a multimerním enzymem.



**Obr. 3:** Schématický náčrt alocymového gelu znázorňující dva typy enzymů (vlevo monomerní enzym, vpravo heteromerní enzym; A-homozygot 1, B-homozygot 2, C-heterozygot)

Alozymy jsou oblíbeným markerem pro identifikaci jedinců, studium populační struktury, fylogenetickou rekonstrukci, určení hranic druhu (Hoy, 1994). Zdá se však, že u některých druhů mšic alocymové technologie selhávají. Navíc je zde problém s alozimy endosymbiontů. Některé problémy se ovšem dají překonat použitím komplexních homogenizačních pufrů, které zvyšují citlivost metody (Hales, 1997). Obvykle je problematická také nízká kvalita výstupní informace, limitovaná genealogická informace a navíc odhalují pouze malou variabilitu která zcela neodpovídá variabilitě genetické (Figueroa a kol. 1999; Sunnuck, 2000). Obecně platí, že mšice vykazují pouze malý alocymový polymorfismus, některé mšice dokonce v těchto studiích žádnou variabilitu nevykazují. Mezi mšicemi je nejpolymorfnější druh *Acyrtosiphon pisum* (Tomiuk a Wöhrmann, 1980).

### 3.2 Markery na úrovni DNA

Tyto markery jsou založeny na porovnávání specifických sekvencí DNA. V současnosti jsou známy stovky nebo dokonce tisíce sekvencí, které mohou být použity jako genetické markery. DNA markery mohou být využity u všech organismů, u kterých byla zvládnuta izolace DNA. Navíc vzorek DNA se dá izolovat i z mrtvých buněk a v případě využití metody PCR jí není třeba mnoho.

Asi nejstarší metodou zabývající se DNA analýzou byla metoda RFLP (restriction fragment length polymorfism, délkový polymorfismus restrikčních fragmentů). Jednalo se o vyhledávání rozdílů v homologních sekvencích DNA, detekovatelných přítomností nebo nepřítomností různě dlouhých fragmentů po rozštěpení restrikčními endoukleázami. Následné vyhodnocení se provádělo elektroforetickým dělením a určité sekvence pak byly zvýrazněny hybridizací se značenou sondou. Odkryl se tak druhově specifický patern (ncbi.nlm.nih.gov). Tato metoda se však již v dnešní době

nepoužívá. Jedná se totiž o metodu, která pro analýzu vyžaduje velké množství DNA. Navíc nebyla využita pro populačně genetické studie *D. noxia*.

### **3.2.1 Genetické markery založené na metodě PCR**

PCR (polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce) je velmi jednoduchá metoda, která využívá enzymatickou amplifikaci *in vitro* jednoho nebo několika vybraných úseků DNA. Metoda závisí na teplotních cyklech, během kterých je vzorek zahříván a ochlazován. Jako templát je využívána dvouvláknová DNA která je nejprve denaturována na jednovláknové řetězce. Po navázání primerů je syntetizován nový řetězec komplementární k templátovému vláknu. Celá reakce je katalyzována termostabilní DNA polymerázou.

Největší výhodou, avšak i nevýhodou metody PCR je její citlivost. Často pro úspěšnou amplifikaci stačí množství počátečního materiálu pouze z jediné buňky. Velkou výhodou je též snadná reprodukovatelnost a rychlost amplifikace (Loxdale a Lushai, 1998).

Nevýhodou enormní citlivosti této metody je, že při PCR reakci může být amplifikováno i malé množství kontaminující DNA. Pro eliminaci chybných výsledků z důvodu kontaminovaných vzorků se v dnešní době často využívá negativní nebo slepá kontrola.

Další komplikací je potřeba primerů. Kvůli nim je nutností znát alespoň část původní sekvence. Limitující je též délka DNA. Snadno lze amplifikovat úseky o délce 100 až 2500 bp. Pro amplifikaci delších úseků je již nutno použít náročnějších postupů a specializovaných DNA polymeráz.

Markery založené na PCR se využívají v mnoha oborech biologických věd, forenzních a lékařských laboratořích i dalších vědních oborech (Figuroa a kol., 1999; Sunnuck, 2000).

#### **3.2.1.1 RAPD - PCR**

„Polymorfismus náhodně amplifikované DNA“ (Random amplification of polymorphic DNA, RAPD-PCR) je multilokusová metoda založená na náhodné amplifikaci určitých segmentů pomocí jednoho primeru o délce 8 - 12 bp, přičemž není nutno znát žádnou část cílové sekvence. Takto krátký primer v kombinaci s nižší teplotou annealingu (35 – 38°C) zvyšuje pravděpodobnost nasednutí primeru ve více místech (tzv. nespecifický primer). Produkty RAPD PCR pak odpovídají oblastem transkribované DNA nebo opakujícím se motivům. Vyhodnocení se provádí gelovou elektroforézou a výsledné pruhy odpovídají fenotypovým datům přítomen/nepřítomen.

Tato metoda se stala oblíbenou hlavně pro svou relativně nízkou cenu a snadnost provedení. Navíc si můžeme zvolit jakoukoliv sekvenci a pokud se v genomu vyskytuje, bude pravděpodobně

vykazovat rozdíly mezi jednotlivými druhy.

Je to však metoda snadno ovlivnitelná spoustou vnějších vlivů, v důsledku čehož jsou její výsledky těžko reprodukovatelné a neporovnatelné. Navíc není kodominantní takže nerozlišuje homozygotní a heterozygotní loky (Figuroa a kol., 1999; Aikhionbare a kol., 1998).

Mšice produkují oddělené fragmenty lišící se v intenzitě a rozsahu od 100 – 2000 bp (Black a kol., 1992)

### **3.2.1.2 AFLP - PCR**

Amplified Fragment Length Polymorphism PCR (Amplifikovaný délkový polymorfismus restričních fragmentů) je metoda odhalující restriční patern pomocí PCR. Je to relativně snadno reprodukovatelná metoda a výsledky se dají poměrně snadno interpretovat. Její rozlišovací schopnost se vyrovná alozymovým studiím, RFLP-PCR, RAPD-PCR nebo i mikrosatelitním sekvencím.

Využívá se dvou restričních enzymů s připojenými adaptory (krátké sekvence). Enzymy štěpí DNA a adaptory se přitom váží na konce fragmentů, kde slouží jako primery.

Vzhledem k tomu, že jednotlivé restriční enzymy štěpí v několika místech, umožňuje tato metoda simultánní screening mnoha fragmentů a dokáže odhalit i kryptické druhy. Nevýhodou je, že se jedná o metodu spíše dominantní než kodominantní (Mueller a Wolfenbarger, 1999).

### **3.2.1.3 Mikrosatelitní DNA**

Mikrosatelity (Simple sequence repeats – SSR nebo Short tandem repeats – STR) se vyznačují opakováním několik nukleotidů dlouhé sekvence, přičemž jednotlivé alely se liší počtem opakování. Představují velkou část inter a intraspecifického polymorfismu. Vyskytují se jak v jaderné, tak v organelové DNA a opakovaný motiv je dlouhý 1-6 bp (Caterino a kol., 2000).

Mikrosatelity se jeví jako hypervariabilní a kodominantní marker. K velké variabilitě dochází v intronových oblastech díky hromadění mutací při rekombinaci nebo sklouzáváním vláken DNA polymerázy během replikace (Sunnuck, 2000).

Kromě obrovské variability a kodominance jsou také jediným markerem, který může poskytnout vodítka k tomu, které alely jsou si nejvíce příbuzné. V neposlední řadě je výhodou i to, že vztahy mezi alelami jsou již známé. (Mueller a Wolfenbarger, 1999).

Velkou výhodou je u mšic i to, že primery vyvinuté pro jiný druh lze s velkou úspěšností použít i na druh příbuzný (Wilson a kol., 2004, Weng a kol., 2007).

Záporem je, že bodové mutace v primerové oblasti mohou vést ke vzniku nulové alely a pro její identifikaci je nutno studovat také potomky (Selkoe a Toonen, 2006).

### **3.2.2 Sekvenační metoda**

Jedná se o metodu, s jejíž pomocí je možno určit pořadí nukleotidů v molekule DNA. V taxonomii byla tato metoda poprvé použita již na počátku 90. let 20. století (Meier, 2008). Základy moderního sekvenování položil v roce 1975 Frederick Sanger z Cambridge University. Nový řetězec DNA je podle templátového vlákna syntetizován *in vitro*. Modifikované baze (dideoxynukleotidtrifosfáty) znemožňují tvorbu fosfodiesterové vaby a ukončují tak reakci. Jejich zařazování je náhodné, vznikají tedy různě dlouhé fragmenty, které jsou nakonec rozděleny v kapilárové elektroforéze, tzv. Dye - terminator sequencing. Na rozdíl od Maxam - Gilbertovy metody jsou jednotlivé dideoxynukleotidtrifosfáty značeny fluorescenčními barvami s různou vlnovou délkou fluorescence a emitací a jednotlivé signály jsou automaticky zaznamenávány senzorem.

Hlavně díky využití fluorescenčního namísto radioaktivního barvení je nyní tato metoda velmi rozšířená a stala se nepostradatelnou při studiích biologických procesů, diagnostickém a forenzním výzkumu a také ve fylogenetických studiích.

Určitým problémem je částečně nespecifické vázání primerů, což ovlivňovalo přesnost výstupu sekvence. Přesnost sekvence je též ovlivněna sekundární strukturou DNA.

Jistým omezením je efekt barvení. Barvou značené terminátory v DNA fragmentech vykazují určitou variabilitu. V chromatogramu se pak po kapilárové elektroforéze objevují nerovnosti ve výšce špicí (Meier, 2008) .

Problémem je též prvních 15 až 40 bazí chromatogramu, jejichž kvalita čtení je velmi špatná. Stejně tak se kvalita zhoršuje po 700 až 900 bp. Pokud sekvenujeme po klonování, může sekvence obsahovat části klonovacího vektoru (Brown, 1994).

Pro vytvoření genetického markeru je možno využít v podstatě jakýkoliv zdroj DNA. Markerem pro analýzu mšic může být jakákoliv sekvence nukleární, mitochondriální nebo kterákoliv DNA obsažená v jejich endosymbiontech. Obecně platí, že kódující sekvence nacházející se v exonech bývají markerem ne příliš vhodným. Tyto sekvence kódují životně důležité proteiny a proti změnám v nich působí silné selekční tlaky. Naopak v intronových sekvencích se mutace hromadí poměrně rychle, takže jejich sekvence jsou pro výzkum vhodnější (Meier, 2008).

### 3.2.2.1 *Mitochondriální DNA*

Je to marker osvědčený pro genealogické a evoluční studie. mtDNA je asi nejdostupnější typ DNA v organismu. V každé buňce je několik stovek mitochondrií a v každé mitochondrii jsou stovky kruhových molekul DNA. Je děděn pouze maternálně, takže nabízí pouze jeden náhled do problému a nemůže poskytnout nenapadnutelné odpovědi (Ballard a Whitlock, 2004).

Díky čistě maternálnímu přenosu však většinou nerekombinuje, což usnadňuje interpretaci výsledků a navíc díky tomu mtDNA hromadí více mutací. Proto může být použita pro analýzu blízké příbuzných druhů a může dokonce vysvětlit genetickou variabilitu klonů (Figueroa a kol., 1999; Ballard a Whitlock, 2004; Footit a kol., 2008).

Velkým problémem mitochondriálních markerů je přenos pseudogenů z mitochondriálního genomu do jaderného, což je u populačních studií nežádoucí. Existují však metody a techniky redukující vliv pseudogenů při přípravě vzorků a analýze dat, ale efektivnost populačně genetických studií tím může být oslabena, protože mitochondrie existují ve velkém množství organismů a často vykazují jen minimální rozdíly mezi jednotlivými skupinami.

Navíc analýza mitochondriální DNA může vést k přílišnému zjednodušování a podhodnocování diverzity v důsledku častého zanikání alel, a tím vytváří nejistoty v genealogii (wikipedia.org; Mueller a Wolfenbarger, 1999; Ballard a Whitlock, 2004).

V dnešní době je asi největší výzvou na poli sekvenačních metod "DNA barcoding". Jedná se o taxonomickou metodu, díky které se dá podle sekvence dlouhé cca 700 bp umístěné v oblasti cytochrom oxidázy I (COI) určit druh živého organismu i původ neznámé tkáně (Meier, 2008). Touto metodou může být správně zařazeno i 96% všech mšic. Problém je pouze u rodů *Aphis* a *Illinoia* (Footit a kol., 2008).

Barcodová metoda však nefunguje u nepopsaných druhů, sběr ze vzácných druhů může být problémem, výsledek může být ovlivněn předchozí špatnou identifikací druhů a některé druhy živočichů mají navíc barcodovou sekvenci stejnou (Meier, 2008).



### 3.2.3 Genetické markery založené na analýze endosymbiontů

Primárním a také nejvíce studovaným endosymbiontem mšic je *Buchnera aphidicola*, bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae*. Je to gram negativní bakterie. Dospělá mšice nese asi  $5,6 \cdot 10^6$  jedinců.

Symbióza se mšicemi se vyvinula před 160 – 200 miliony let a přetrvala díky maternálnímu přenosu a kospeciaci. Mšice vyvinuly uvnitř svého těla bakteriocyty, které slouží symbiontům jako domov a chrání je. Endosymbionti na oplátku vytvořily způsob, jak produkovat obrovské množství esenciálních aminokyselin, kterých se mšicím v důsledku stravy založené na rostlinných šťávách nedostává.

V důsledku dlouhodobé symbiózy se mšicemi a nepřítomnosti rekombinace mají *Buchnera sp.* jeden z nejmenších genomů vyskytujících se v živých organismech. Mají pouze jeden kruhový chromozom a 2 nebo více plazmidů. V průběhu evoluce ztratili *Buchnera sp.* spoustu genů, mezi nimi i gen pro anaerobní respiraci a také gen pro polysacharidy vnější membrány díky čemuž nejsou patogenní. Jejich genom je však velmi stabilní.

Endosymbionti také produkují protein symbionin, který se váže na obal viru napadajícího rostliny a chrání virus uvnitř mšic. Tím zvyšuje pravděpodobnost přenosu viru z mšice na rostlinu, kterou se mšice živí.

## 4 Vyhodnocení molekulárních markerů

Každý z výše popsaných molekulárních markerů se v průběhu času ukázal být užitečným nástrojem pro odhalování mezidruhové i vnitrodruhové variability. Pomocí některých bylo možno určit způsoby šíření druhů a diverzifikace biotypů. Ukázali se též být vhodným nástrojem pro odhalování kryptických druhů. V následující části tedy shrnu jednotlivé úspěchy, kterých bylo pomocí výše popsaných metod dosaženo a vyhodnotím užitečnost těchto metod.

### 4.1 Alozymy

Puterka a kol. provedli v roce 1993 studii světových populací *D. noxia* založenou na alozymové analýze. Elektroforézu provedli na škrobovém gelu a zjistili, že nejpolymorfnější jsou u *D. noxia* alozymy  $\beta$ -esteráza ( $\beta$ -EST), fosfoglucoizomeráza (PGI) a fosfogluconátdehydrogenáza (6-PGD). Malou variabilitu vykazovali i alozymy fosfoglucomutáza (PGM), hexokináza 1 (HK1) a malátový enzym (ME). Také odhalili, že leucin aminopeptidáza (LAP) vykazuje u *D. noxia* pouze 1 lokus, zatím co u všech ostatních mšic 2 lokusy.

Simon a kol. zkoumali v roce 2003 druh *Acyrtosiphon pisum*, který se živí na rostlinách z čeledi Fabaceae a je nejbližším příbuzným druhu *Diuraphis noxia*. Pro výzkum si vybrali sympatrické populace živící se na hrachu (*Pisum*), tolici seté (*Medicago sativa*) a jeteli (*Trifolium*). Elektroforéza probíhala na celulozo-acetátovém gelu. Objevili nízkou genetickou variabilitu s průměrem 2,8 alely na lokus. Mezi 1028 jedinci bylo alozymy odhaleno pouze 48 genotypů. Dalších 18 jich bylo odhaleno pomocí odlišného zbarvení jedinců. Populace z hrachu, jetele a tolíce však odhalily odlišnosti ve fixovaných lokusech (Idh a Pep-GL na jeteli, Pep-LGG a Pep-GL na hrachu).

### 4.2 RAPD-PCR

RAPD-PCR se ukázalo být vhodným nástrojem pro odhalování mezidruhové variability a určování druhů. Black a kol. se v roce 1992 zabývali výzkumem *Diuraphis noxia*, *Schizaphis graminum* a *Acyrtosiphon pisum* pomocí RAPD-PCR. Všechny zkoumané mšice vykazovali velmi dobře rozpoznatelný RAPD-PCR patern. Stejně tak Figueroa a kol. v roce 1999 potvrdili, že RAPD-PCR může být vhodným nástrojem pro rozpoznání druhů *Sitobion avenae* a *Sitobion fragariae*.

Kromě mezidruhové variability však dokáže RAPD-PCR odhalit i variabilitu vnitrodruhovou. Například Aikhionbare a kol. zkoumali v roce 1998 mšici *Schizaphis graminum*, která je, stejně

jako *Diuraphis noxia*, škůdcem rostlin z čeledi Poaceae. Snažili se najít RAPD-PCR primery schopné snadno rozpoznat její biotypy B, E, C, F, G, H a I. Mezi desítkami zkoušených primerů našli 4 které byli reprodukovatelné a schopné tyto biotypy odlišit. Přitom zjistili, že biotyp H je úplně jiný než ostatní biotypy ale nejpříbuznější je biotypu B.

Ve svém výzkumu z roku 1992 objevili Black a kol. rozdílné paterny i mezi jednotlivými biotypy *S. graminum* a obrovskou vnitrodruhovou variabilitu u *A. pisum*. Navíc zkoumali populace *D. noxia* pocházející ze Sýrie a jižní Afriky a objevili mezi těmito populacemi zásadní rozdíly.

Puterka a kol se v roce 1993 zabývali výzkumem populací *Diuraphis noxia*. Vzorky pocházeli z celého světa. Pomocí sedmi primerů se jim podařilo amplifikovat 69 polymorfních pruhů v 18 populacích. Po rozboru zjistili, že na Ukrajině se vyskytují dva vzdálené genotypy. Jeden z nich koresponduje s genotypy nalezenými též v Jordánsku a Sýrii. Druhý, ukrajinský genotyp, genotyp nalezený v Kyrgyzstánu a moldavský genotyp byli unikátní. Naopak Turecký se lišil od zbytku mediteránu, ale byl stejný jako genotypy nalezené v USA, jižní Africe, Francii a Mexiku. Tento výzkum tak potvrdil hlavní směr šíření Ukrajina, Turecko, Francie, Afrika, Mexiko a USA.

V roce 2004 zkoumala Paytonová pro svou diplomovou práci biotypy *Diuraphis noxia* v USA. Z několika vyzkoušených primerů nakonec odhalil jistou variabilitu využitím dvou z nich. Primer B-04 odhalil variabilitu u biotypů RWA 2 a RWA 5, když u nich neobjevil band o délce 1200 bp. B-07 odhalil variabilitu mezi biotypy RWA 1 a RWA 5 kdy RWA 5 vykazoval band o délce 800 bp. Na základě svých výsledků podpořila teorii jedné invaze *Diuraphis noxia* do USA.

Tento výzkum znovu provedla a publikovala v roce 2009, kdy spolu se Shufranem zjistili, že variabilita je mezi biotypy *Diuraphis noxia* na území USA opravdu nízká. Vyzkoušeli znovu tytéž primery a v podstatě potvrdili již dříve zjištěné výsledky. Jedinými rozdíly byla nepřítomnost bandu o délce 1300 bp u RWA 2 a RWA 5 (1200 bp band v roce 2004) a také již nepředpokládali pouze jednu invazi. Naopak v této práci tvrdí, že biotypy RWA 1 a RWA 2 pocházejí z první invaze a ostatní biotypy ze druhé.

### **4.3 AFLP-PCR**

AFLP-PCR se zatím jeví jako velmi nadějný nástroj. Jako jedna z mála metod dokázala prokázat existenci genetických rozdílů mezi biotypy *Diuraphis noxia* v USA a tedy byla důkazem pro více než jen jednu invazi. Tento výzkum provedli Xiang Liu a kol. ("In press"). Zkoumali populace *Diuraphis noxia* z celého světa. Pomocí metody AFLP-PCR podpořili teorii dvou invazí do USA. První invaze podle nich nastala v 80. letech 20. století a spojuje do kmene nazvaného Střední

východ-Afrika biotypy RWA 1 a RWA 2. Tyto biotypy totiž skvěle korespondují s populacemi z Afriky, Středního východu a Mexika. Druhá invaze proběhla později a spojuje do kmene nazvaného Evropský biotypy RWA 3, RWA 4 a RWA 5, které jsou v USA poměrně vzácné. Tyto biotypy vykazují stejné sekvence, které se objevují u populací ze Španělska, Maďarska, Etiopie a České republiky. Nevylučují navíc třetí invazi. Populace sebraná ve Washingtonu se totiž liší jak od kmene Střední východ-Afrika tak od kmene Evropského. Tento biotyp může pocházet například z Ruska nebo Číny. Tyto země totiž nebyly zahrnuty do studie.

#### **4.4 Mikrosatelitní markery**

Mikrosatelitní markery se jeví jako nejvariabilnější markery vůbec. Vykazují vnitrodruhovou variabilitu téměř u všech druhů. Výjimkou byl výzkum *D. noxia* z roku 2003 který provedli Belay a kol. na Etiopských populacích. Tento výsledek a výsledek z analýzy COI a endosymbiontů je vedl k názoru, že v Etiopii se vyskytuje pouze jeden biotyp.

Figuroa a kol. našli v roce 1999 při hledání markerů vhodných pro rozlišení *S. avenae* a *S. fragariae* obrovskou variabilitu nejen mezi těmito druhy, ale i uvnitř druhu *S. avenae*. Simon a kol. (2003) pomocí mikrosatelitních markerů objevili u *A. pisum* variabilitu na různých hostitelích, ale ta byla menší než variabilita mezi různými populacemi sajícími na stejném hostiteli.

Dolatti a kol. (2005) studovali přírodní populace *D. noxia* v Íránu analýzou mikrosatelitů. Z 378 jedinců izolovali 50 genotypů a odhalili velký nedostatek heterozygotů. Objevili několik rozšířených a mnoho vzácných genotypů. To poukazuje na skutečnost, že *D. noxia* není v Íránu obligátně partenogenetická, jak se původně myslelo, ale v některých oblastech se vyskytuje i pohlavní rozmnožování. Vzácné genotypy se vyskytovaly převážně na severozápadě, kde jsou tvrdé zimy a tedy pravděpodobná přítomnost cyklické partenogeneze.

Obrovskou výhodou mikrosatelitních markerů je, že u mšic mohou být primery vyvinuté pro jeden druh celkem úspěšně použity pro druh příbuzný. Pokus, který by to dokázal provedli v roce 2004 Wilson a kol.. Zkoumali přenosnost genetických markerů z rodů *Aphis* a *Rhopalosiphum* na mšice z tribu *Macrosiphini*. Testovali 21 primerů a zjistili, že úspěšnost amplifikace mikrosatelitních sekvencí

je v rámci stejného rodu 80%, v rámci stejného tribu 59% a v rámci podčeledi 35%. Také potvrdili existenci tzv. X-vázaných lokusů, amplifikovaných pomocí primerů i z velmi vzdálených druhů.

Podobný pokus provedli v roce 2007 Weng a kol.. Oproti Wilsonovu experimentu ovšem počet primerů ještě rozšířili a používali primery jak pro genomové tak pro tzv. expressed sequece tags

(ESTs).

Analýzou zjistili, že mezidruhová přenosnost markerů je mnohem vyšší u ESTs, protože jsou konzervovanější. Nevykazují tedy takovou variabilitu, ale mohou být velmi levně vyvinuty pomocí ESTs databází. Proto jsou ESTs využívány pro studium diverzity mezi druhy, zatím co variabilnější genomové mikrosatelity bývají využívány pro studium diverzity uvnitř druhu. Pomocí primerů vyvinutých pro donorové druhy se jim podařilo naamplifikovat 65,1% ESTs mikrosatelitů a 46,9% genomových mikrosatelitů u cílových druhů. Potvrdil tak, že mikrosatelity mohou být s velkou úspěšností amplifikovány i za pomoci primerů původně vyvinutých pro jiné druhy.

## 4.5 mtDNA

Mitochondriální DNA se podle předešlých výzkumů jeví jako marker vhodný pro identifikaci druhů a některé části dokáží odkrýt i vnitrodruhovou variabilitu, hlavně mezi biotypy.

Většina výzkumů prováděných na mitochondriích mšic se zabývá barcodovou oblastí (oblast cytochrom oxidázy podjednotky 1, COI). Footitt a kol. v roce 2008 zjistili, že až 96% všech druhů mšic se dá pomocí barcode dobře určit. Problém se vyskytl pouze u rodů *Aphis* a *Illinoia*, které jsou si velmi příbuzné.

Shufran a kol. zkoumali v roce 2000 oblast COI u biotypů *Schizaphis graminum*. Tímto průzkumem objevili tři kmeny. První kmen sdružuje biotypy C, E, K, I, a J, které jsou hospodářsky významné. Druhý kmen sdružuje biotypy F, G a A. Třetí kmen sdružuje vzácné biotypy B, CRW a EUR. Úplně mimo tyto vyznačené kmeny se nachází vzácný biotyp H. Při rozboru jednotlivých kmenů zjistili, že biotypy G a A z druhého kmene jsou si navzájem velmi blízké a biotyp F je vzdálenější. Všechny tři jsou však velmi virulentní na pšenici (*Triticum*) a čiroku (*Sorghum*), i když se na těchto plodinách téměř nevyskytují. Zjistili také, že třetí kmen je vzdálený od kmene 1 a 2. Obecně se však zdá, že zkoumat vnitrodruhovou variabilitu pomocí oblasti COI není příliš vhodné. To potvrdili Birkle a Douglas ve svých pokusech s *Acyrtosiphon pisum* (1999) když nenalezly žádné rozdíly mezi biotypy z tolíce seté (*Megicago sativa*), hrachu (*Pisum*) a jetele (*Trifolium*).

Žádnou variabilitu nenašli ani Belay a kol. v roce 2003 při výzkumu *D. noxia*. Ti zkoumali populace z Etiopie a analýze podrobili též mikrosatelity a endosymbionty *Buchnera sp.*. Ani v jedné analýze však rozdíly nenašli a došli tedy k názoru, že v Etiopii se různé biotypy nevyskytují. Žádnou variabilitu v oblasti COI však nenašli ani při porovnání s referenčním vzorkem z Turecka.

Variabilita nebyla u *Diuraphis noxia* nalezena ani v roce 2007 Shufranem a kol., kteří zkoumali oblast COI u populací z USA, Mexika, Kanady, Francie, Turecka a jižní Afriky. Totéž u populací z Etiopie, České republiky, jižní Afriky, Turecka, Sirie a pěti biotypů z USA (RWA 1 – RWA 5) potvrdili u stejné mšice také Shufran a Payton v roce 2009.

Oblast COI není však pro fylogeografické studie jedinou vhodnou. Figueroa a kol. dokázali správně rozlišit druhy *Sitobion avenae* a *Sitobion fragariae* i pomocí mitochondriální oblasti cytochrom b (Cyt b), 16S RNA a první podjednotky NAD dehydrogenázy (ND-1).

Aikhionbare a Mayo zkoumali v roce 2000 biotypy B, C, E, F, G, H a I u mšice *Schizaphis graminum*. Sekvenovali části mitochondriálních oblastí pro 16S rRNA, cytochromu b (Cyt b), tRNA<sub>leu</sub>, tRNA<sub>ser</sub> a všech čtyř podjednotek NADH dehydrogenázy. Mezi jednotlivými biotypy tak objevili výraznou variabilitu. Nejvíce se lišili biotypy I a H v oblasti 1, která zahrnuje ND 1, 16S rRNA a spacer. Biotypy C, E a F byly v oblasti 2 (Cyt b, ND1, tRNA a spacer) stejné. Zjistili, že nejrozdílnější je biotyp B. biotypy F a C jsou navzájem sesterské, stejně tak jsou sesterské i biotypy E a G, které jsou příbuzné biotypu H, což je však v rozporu s výzkumem z roku 1998 který provedli na stejné mšici Aikhionbare a kol. za pomoci RAPD-PCR.

#### **4.6 Analýza endosymbiontů**

Analýza endosymbiontů nepatřila dlouhou dobu mezi oblíbené metody. Vykazují obvykle jen malou variabilitu (Abbott a Moran, 2002).

Gil a kol. v roce 2006 osekvenovali genomy endosymbiontické bakterie *B. aphidicola* ze mšic *A. pisum*, *S. graminum* a *Baezongia pistaciae* a zjistili, že jejich genom je velmi konzervovaný a má velikost 614-641 kb, což znamená, že je 10x menší než genom volně žijících příbuzných. Dospěli k názoru, že to je způsobeno neefektivní velikostí populace a striktně vertikální transmisí. Určitou variabilitu mezi endosymbionty z jednotlivých druhů mšic vysvětlili rozdílným životním stylem jednotlivých hostitelských mšic, který ovlivňuje genetickou výbavu endosymbiontů potřebou různých genů.

Pomocí analýzy endosymbiontů se však můžeme dozvědět spoustu informací o životních strategiích mšic a některé druhy tak lze i rozlišit.

MyLo Ly Thao a kol. (1998) přišli na způsob, jak pomocí analýzy leucinových plasmidů *B. aphidicola* rozlišit druhy *S. graminum* a *D. noxia*. Zjistili totiž, že *S. graminum* obsahuje 24 kopií plasmidu s geny pro leucin zatím co *D. noxia* pouze 1 kopii tohoto plasmidu. Vysvětlili to

tím, že *D. noxia* způsobuje velkou histolýzu rostlinných tkání, takže dokáže z potravy získat mnohem více aminokyselin než *S. graminum* a nemá tedy takové nároky na dodávky aminokyselin z endosymbionta. Navíc zjistili, že kromě leucinu mají endosymbionti z *D. noxia* utišeny také geny pro syntézu anthranylát syntázy. Není úplně jasné, proč je amplifikace TrpEG genu snížena utišováním a ne redukcí replik, ale předpokládají, že *Buchnera sp.* postrádají mechanismus redukce počtu repetitiv a jsou tedy nucené utišovat geny hromaděním změn v oblasti promotoru.

Výskyt fakultativních endosymbiontů je závislý na druhu hostitele. To prokázali Simon a kol. (2003) při výzkumu *A. pisum* z tolice seté (*Medicago sativa*), jetele (*Trifolium*) a hrachu (*Pisum*). Analyzovali čtyři fakultativní endosymbionty a některého z nich objevili u 86% populací. Po podrobnější analýze navíc zjistili, že populace sající na tolici mají symbiontů nejméně.

Endosymbionti vykazují i lokální variabilitu. Belay a Staufer (2003) zkoumali dnaN gen na chromozomu *Buchnera sp.* u *D. noxia* a také jejich plasmidy. V genu dnaN nenašli žádnou variabilitu ani mezi Etiopskými populacemi ani ve srovnání s populací Tureckou, u té však našli substituci v restriční oblasti Nla III na plasmidu TrpE která byla pro tuto tureckou populaci unikátní.

## **4.7 Výběr metody**

Pro studie genetické variability druhu je vhodných několik markerů. Mezi nimi mikrosatelity, mitochondriální geny, analýzy endosymbiontů, AFLP-PCR a alozymy. V naší laboratoři probíhá v současnosti několik výzkumů, které využívají některé z výše zmíněných metod. Alozymová analýza sice obvykle vykazuje nižší variabilitu, není to však pravidlem. Podle bakalářské práce Kučerové (2003) byly alozymové markery jediné, které dokázaly odhalit variabilitu mezi populacemi lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*, L.). Mitochondriální a dokonce ani mikrosatelitové markery nebyly v tomto případě dostatečně variabilní a RAPD-PCR markery byly naopak variabilní příliš.

I u ostatních druhů, u kterých odhalená variabilita není velká, jsou alozymy užitečné jako doplňková metoda. Jejich analýza je totiž jednoduchá, levná a pokud s ní má laboratoř zkušenosti, tak i rychlá. Navíc všechny nevýhody alozymových studií se dají obejít, pokud jako marker použijeme nukleotidovou sekvenci genu, která enzym kóduje, protože na úrovni

nukleotidů se obvykle projeví větší variabilita než při alozymové elektroforéze. Výhodou tohoto přístupu je, že máme již dopředu nějaké informace o studovaném enzymu a navíc můžeme použít vzorek uchovávaný v lihu.

Do analýzy můžeme zahrnout i introny, které jsou dobrým markerem pro odhalování populační struktury, fylogeografii apod.. Nejsou totiž pod selekčním tlakem, ale chovají se neutrálně a hromadí více mutací.

Rozhodla jsem se tedy na základě předchozích studií vytypovat několik alozymů, které v přírodních populacích *D. noxia* vykazovaly variabilitu, u těchto alozymů zjistit, jestli opravdu variabilní jsou a zda se dají barvit a následně jeden z testovaných enzymů vybrat a osekvenovat alespoň část jeho genu.



## 5 Experimentální práce

### 5.1 Analýza alozymů

#### 5.1.1 Studované alozomy

Puterka a kol. v roce 1993 testovali 20 alozymů na světových populacích *D. noxia*. Na základě jejich článku jsem do užšího výběru zvolila alozomy, které vykazovali v přírodních populacích *D. noxia* variabilitu. Pro analýzu jsem si tedy vybrala alozomy hexokinázu (HK; glykolýza), glukokinázu (GK; hexokináza typu 4, uplatňuje se v počátečním kroku glykolýzy), 6-fosfoglukonátdehydrogenázu (6-PGD; formuje ribulosa 5-fosfát z 6-fosfoglukonátu), malátdehydrogenázu (MDH; katalyzuje v Krebsově cyklu konverzi malátu na oxaloacetát), fosfoglukomutázu (PGM; syntéza, odbourávání a mobilizace glykogenu), fosfoglukoisomerázu (PGI; katalyzuje glykolýzu) a esterázu (EST; štěpí estery). Ty jsem po té podrobila alozymové elektroforéze na polyakrylamidovém gelu.

Pro analýzu byly použity mšice z jednoho klonu *D. noxia* z chovu (jedinci sbíráni na Jižní Moravě z ječmene - *Hordeum*). V laboratorních podmínkách byly chovány na pšenici (*Triticum*) při teplotě 18-20 °C, Rh 70 a 18 h světelného dne). Jako kontrolní skupiny jsem použila vzorky z *Myzus persicae* z chovu (jedinci sbíráni v jižní Francii a chování na *Faba vulgaris*, teplota, Rh a délka světelného dne stejná jako u *D. noxia*), *Drosophila yakuba* a *Folsomia candida* z chovů z laboratoře populační genetiky. *M. persicae* a *D. noxia* byly po sběru z rostlin zamrazeny a uloženy do -80°C. Pro alozymovou analýzu *D. yakuba* a *F. candida* byli použiti živí jedinci.

#### 5.1.2 Homogenizace

Studovaní jedinci (zmrazení i živí) byli zhomogenizováni pomocí elektrického homogenizátoru PELLET PESTLE® v 0,05 M Tris-Cl pufru (pH 7.0) s obsahem 20% glycerolu a 0,05% Triton-X 100.

### 5.1.3 Elektroforéza proteinů

K separaci alozymů jsem použila elektroforézu od firmy HOEFER SCINETIFIC INSTRUMENTS model SE 250 (USA). Na této elektroforéze bylo možno souběžně analyzovat dva gely o rozměrech 8 x 6 cm (š. x d.) a tloušťce 0,75 mm. Na jeden gel bylo možno nanést 15 nebo 10 vzorků, podle typu hřebenu (šířka zubů hřebenu 3 mm nebo 5 mm).

Pro analýzu EST, GK, 6-PGD, PGI a PGM byl použit pufrovací systém podle Davise (1964): Tris-HCl/ pH 8,3 (pH "Stacking gel" (SG) = 6,9; pH "Running gel" (RG) = 8,9), nastavena konstantní hodnota elektrického napětí (viz. Tab 1.). Pro analýzu HK a MDH byla použita metoda podle Stauffera a kol. (1992): Tris-glycin/ pH 7,8 (pH SG = 6,9; pH RG = 8,9), nastavena konstantní hodnota elektrického proudu (viz. tab. 1). Elektroforéza probíhala za teploty 4°C. Pufrovací systémy, složení polyakrylamidových gelů (PAG) a nastavení elektrických parametrů jsou sepsány v tabulce 1.

**Tab. 1:** Pufrovací systémy, složení PAG a nastavení elektrických parametrů

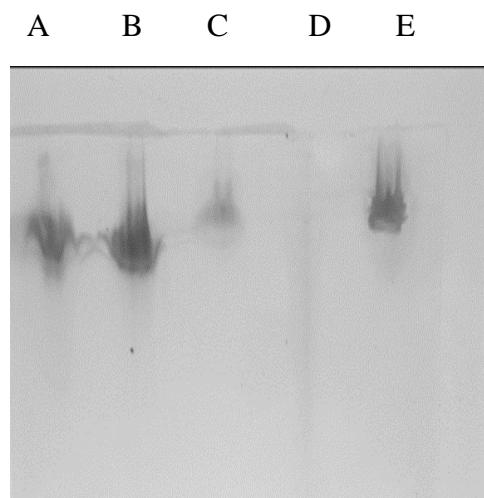
Alozym	Pufrovací Systém	Hustota RG	Hustota SG	Elektrické parametry
EST	Davis	7%	3,12%	50 V (15 minut), po zajetí do RG 130 V
GK	Davis	7%	3,12%	50 V (15 minut), po zajetí do RG 130 V
HK	Stauffer	2,5%	6%	60 mA
MDH	Stauffer	2,5%	6%	60 mA
PGI	Davis	7%	3,12%	50 V (15 minut), po zajetí do RG 130 V
PGM	Davis	7%	3,12%	50 V (15 minut), po zajetí do RG 130 V
6 PGDH	Davis	7%	3,12%	50 V (15 minut), po zajetí do RG 130 V

### 5.1.4 Detekce alozymů

Díky tomu, že jsem analyzovala pouze 4 vzorky, jsem mohla po elektroforetickém dělení gely rozřezat a detekovat několik proteinů najednou. Jednotlivé enzymy jsem detekovala pomocí specifického substrátového barvení podle Manchenka (1994). Výjimkou bylo barvení EST, pro kterou byl použit barvicí protokol podle Ritzengruber a Führera (1986), a také 6-PGD barvené podle Acquaha (1992). Barvicí protokoly jsou uvedeny v příloze 1.

Po obarvení jsem gely fixovala ve fixačním roztoku složeném z metanolu, destilované vody a ledové kyseliny octové v poměru 4:5:1 (Pasteur a kol. 1988). Zafixované gely jsem přenesla

do 10% roztoku kyseliny octové a gely dále fotografovala a prohlížela pod bílým světlem. Na obrázku 4. je ukázka gelu s nabarveným alozymem.

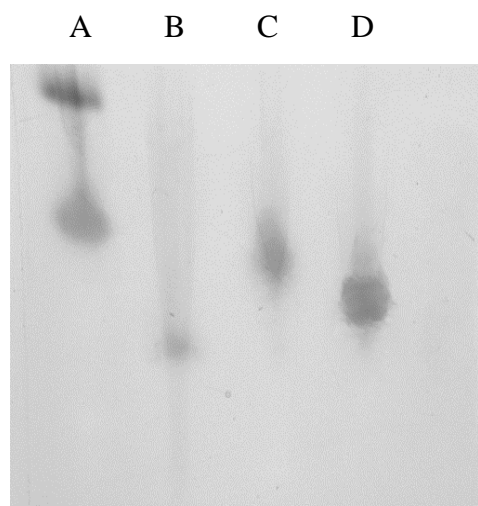


**Obr. 4:** Vzorová fotografie nabarveného alozymu (hexokináza)

A- *D. yakuba*, B- *F. candida*, C- *M. persicae*, D- *D. noxia* (okřídlená), E- *D. noxia* (bez křídel)

### 5.1.5 Vyhodnocení alozymové elektroforézy a výběr proteinu

Z alozymů, které se mi během analýzy podařilo nabarvit (Esteráza, fosfoglukomutáza, fosfoglukoizomeráza, malátdehydrogenáza, hexokináza) jsem si vybrala fosfoglukomutázu. Na obr. 5 je ukázka nabarvené fosfoglukomutázy.



**Obr. 5:** Fotografie obarveného alozymu fosfoglukomutáza

A- *D. yakuba*, B- *F. candida*, C- *M. persicae*, D- *D. noxia*

Fosfoglukomutáza je enzym který se účastní syntézy a odbourávání glykogenu, mobilizuje ho pro let a pohyb a katalyzuje vzájemnou přeměnu glukózy-1-fosfát a glukózy-6-fosfát. (Verrelli a Eanes, 2000; Barbosa a kol., 2003).

Vyazuje také několik zajímavých vlastností. Bylo například prokázáno, že se účastní adaptačních procesů u *Drosophila melanogaster* a *Drosophila simulans* (Verrelli a Eanes, 2000; Flowers a kol. 2007). Navíc byla nalezena lokální diverzita.

Gu (1991) zjistil, že mezi populacemi obaleče *Epiphyas postvittana* pocházejícími z Austrálie nebo Nového Zélandu se vyskytuje odlišný patern. Lokální variabilitu objevili i Besold a kol. (2008), kteří zkoumali populace okáče poháňkového (*Coenonympha pamphilus*) pocházející z italského Monte Baldo a Německa. Odhalili také, že frekvence alel PGM nereaguje na změny klimatu v různých nadměrných výškách, ale reflektuje biogeografický patern.

Zajímavé také je, že fosfoglukomutáza nevykazuje typický geografický klín, který je běžně sledován u všech ostatních alozymů. Tento klín je pokládán za důkaz přírodní selekce a vlivu podmínek prostředí. To naznačuje, že přírodní selekce alel fosfoglukomutázy neprobíhá zcela standardním způsobem.

Naopak reakce na změny teplot byla prokázána u výkalnice hnojní (*Scathophaga stercoraria*), jejímž výzkumem se v roce 2004 zabývali Ward a kol.

Fosfoglukomutáza byla také jediný variabilní enzym při alozmové analýze brazilských populací zákeřnice druhu *Panstrongylus megistus*.

Kvůli účasti na adaptačních procesech, nepřítomnosti geografického klínu, lokální variabilitě přítomné u okáče, zákeřnice a obaleče, a variabilitě teplotní, přítomné u výkalnice se mi tento enzym jevil jako velmi zajímavý a hodný bližšího prozkoumání.

## **5.2 DNA analýza**

### **5.2.1 Navržení primerů**

Z alignmentu kódující sekvence pro fosfoglukomutázu (PGM) z druhů *Acyrtosiphon pisum* (kyjatka hrachová, accession number XM\_001948425), *Locusta migratoria* (saranče stěhovavá, FJ609649), *Apis mellifera* (včela medonosná, XM\_395366), *Drosophila grimshawi* (octomilka, XM\_001984373) a *Nasonia vitripennis* (vosička, XM\_001608097) byly vytipovány konzervované a nekonzervované úseky. Tyto druhy byly vybrány, protože na základě BLASTu jsou k sekvenci *Acyrtosiphon pisum* (nejbližší příbuzný druhu *D. noxia*) sekvenčně nejpodobnější. Primery byly navrženy do konzervovaných úseků (cca 10 bazí identických

aminokyselin v porovnávacím alignmentu) podle přesné cDNA sekvence *Acyrtosiphon pisum*.

Bylo navrženo celkem pět primerů: PgmA-Fw1, PgmA-Rev1, PgmB-Fw2, PgmB-Rev2a, PgmB-Rev2b. Seznam a detailní popis navržených primerů je uveden v tabulce 2., místa jejich nasednutí na DNA na obr. 6.

**Tab. 2:** Primery navržené pro amplifikaci genu pro PGM

PgmA-Fw1 <sup>1</sup>	AATGGAGGTCCTGCTCCAGA
PgmA-Rev1 <sup>1</sup>	TATTACGATCACCATCTCCATC
PgmB-Fw2 <sup>1</sup>	TACTTCACCAGATATGATTATGA
PgmB-Rev2a <sup>1</sup>	CACCACTACTGCCAGTACC
PgmB-Rev2b <sup>1</sup>	TCCTTACGTAATGACAGTTGG

<sup>1</sup> Mgr. Lucie Kučerová (nepublikováno)



**Obr. 6:** Místa nasednutí jednotlivých primerů

## 5.2.2 Extrakce RNA a reverzní transkripce

RNA byla extrahována z klonů *D. noxia* z chovu pomocí RNA Blue (Top-Bio s.r.o.) dle návodu dodavatele. RNA Blue je reagens schopná rychle izolovat nedegradovanou a čistou RNA.

Reverzní transkripce byla provedena pomocí enzymu M-MLV reverzní transkriptázy (Top-Bio s.r.o.), což je reverzní transkriptáza (RT) myšího leukemického viru Moloney. Reverzní transkripce byla provedena dle návodu výrobce. Pomocí takto získané cDNA byla dále testována funkčnost všech primerů. Složení reakční směsi a PCR profil jsou popsány v kapitolách 6.1.1 Reakční směs a 6.1.2 PCR profil.

cDNA byla využita hlavně proto, že u příbuzných druhů jsou k dispozici pouze cDNA sekvence a délka celé genomové sekvence není známa. Případný neúspěch při amplifikaci by tedy nemusel být důsledkem nefunkčnosti primerů u druhu *D. noxia*, ale také přílišné délky fragmentu.

### 5.2.3 Extrakce DNA

Vzorky byly sesbírány z různých oblastí z Afriky, Evropy, Asie a severní Ameriky a do naší laboratoře byly zaslány z jiných vědeckých pracovišť. Podrobnosti o všech vzorcích jsou uvedeny v příloze 2.. Vzorky mšic byly uchovávány v etanolu. Před samotnou extrakcí byly ponechány na filtračním papíru v pokojové teplotě, dokud se všechnen etanol neodpařil. Pro analýzu byly vyzkoušeny dvě metody izolace DNA. Metoda pomocí extrakčního kitu DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN) a extrakce pomocí Squishing Bufferu (Gloor a kol., 1993).

#### 5.2.3.1 Extrakce pomocí kitu

DNA byla extrahována pomocí Dneasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN). Izolace byla provedena dle návodu výrobce. Oproti návodu však byly provedeny dvě závěrečné frakce. První o objemu 100  $\mu$ l byla uchována v +4°C, druhá frakce o objemu 75  $\mu$ l byla uložena do -20°C.

#### 5.2.3.2 Extrakce pomocí Squishing Bufferu (Gloor a kol., 1993)

Ke vzorku bylo přidáno 50  $\mu$ l Squishing Buffer (10 mM TRIS-Cl, pH 8,2, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl a 200  $\mu$ g/ml proteinázy K) a pomocí upravené špičky byl vzorek smísený s tímto roztokem v mikrozkuhavce homogenizován.

Inkubace vzorku probíhala ve 37 °C po dobu 20-30 minut a poté bylo nutno vzorek zahřát na 95 °C aby se inaktivovala proteináza K. Vyextrahovaná DNA byla rovnou použita pro PCR reakci nebo byla před dalším použitím zmrazena do -20 °C.

### 5.2.4 Reakční směs

Reakce probíhala v objemu 12,6  $\mu$ l a obsahovala následující složky (dle návodu TaKaRa Ex Taq): 7,75  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O; 1,25  $\mu$ l 10x reakční pufr; 1,0  $\mu$ l dNTP's (koncentrace 2,5 mM od každého nukleotidu); 0,75  $\mu$ l reverzního primeru (5  $\mu$ M); 0,75  $\mu$ l forwardového primeru (5  $\mu$ M), 0,1  $\mu$ l polymerázy Unis (100 U, Top-Bio s.r.o.) a 1,0  $\mu$ l templátové DNA.

U vzorků, které nešly amplifikovat s použitím Taq polymerázy Unis a 10x bufferu se standardní koncentrací MgCl<sub>2</sub> (2 mM) byly vyzkoušeny další polymerázy s různými vlastnostmi. Combi taq DNA polymeráza znemožňuje zahájení polymerázové reakce před vlastní PCR. LA DNA polymeráza mix má lepší schopnost opravovat chyby vznikající během amplifikace DNA ("Proof reading activity"). DreamTaq<sup>TM</sup> polymeráza má vyšší citlivost a je vhodná pro delší PCR produkty a má i lepší výtěžnost oproti Taq DNA polymeráze. Také byly

měněny koncentrace  $MgCl_2$  dle návodu výrobce.

U některých vzorků však musela být využita metoda reamplifikace. Reakční směsi s amplifikovanou DNA z první amplifikace byly naředěny v poměru 1:20. Takto byla získána templátová DNA, s jejíž pomocí byly získány sekvence některých dalších populací zařazených do pozdějšího vyhodnocení.

Do reamplifikovaných vzorků bylo navíc přidáno 0,5  $\mu$ l BSA (bovine serum albumin, 5 mg/ml, Fermentas). BSA stabilizuje během reakce enzymy a zabraňuje jejich ulpívání na stěnách mikrozkmavky a může tak zvýšit účinnost reakce. Do reakce bylo též přidáno 0,25  $\mu$ l DMSO (dimetyl sulfoxid). DMSO inhibuje sekundární strukturu DNA, čímž usnadňuje průběh PCR reakce a může zvýšit množství produktu. Množství  $ddH_2O$  v reakční směsi bylo následně sníženo tak, aby výsledný objem mixu byl 12,6  $\mu$ l.

### **5.2.5 PCR profil**

Požadovaný fragment DNA byl amplifikován pomocí polymerázové řetězové reakce na termocykléru Bioer XP Cycler. Predenaturace probíhala 60s při 94 °C, po té následovalo 35 cyklů: Denaturace 30 s při teplotě 94 °C, annealing po dobu 40 s při 57 °C, elongace při 72 °C po dobu 50 s. Po těchto 35 cyklech probíhala postelongace při 72 °C po dobu 4 minuty. následné uchování bylo nastaveno na 4 °C.

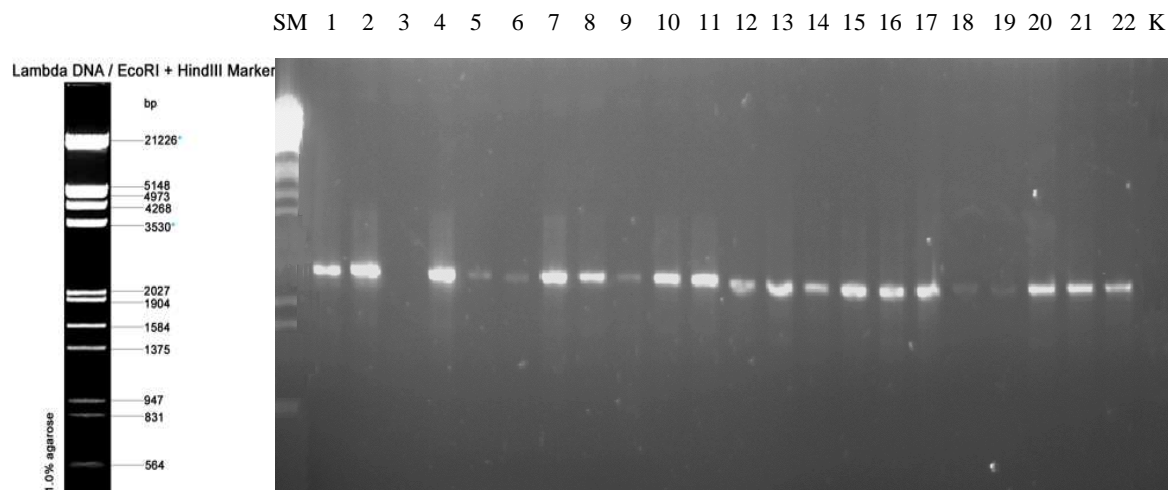
### **5.2.6 Gelová elektroforéza**

Gelové elektroforézy bylo užito ke kontrole přítomnosti PCR produktu a tedy úspěšnosti amplifikace, zjištění délky fragmentu a určení množství produktu.

Elektroforéza byla provedena na 1,5% agarózovém gelu: 1,5 g agarózy (SeaKem LE Agarose, Cambrex) bylo rozpuštěno v 98,5 ml 1x TAE pufru (50x TAE pufr: 40 mM TRIS, 20 mM kys. octové, 1 mM EDTA, pH = 8,4). Tato směs byla dále roztavena v mikrovlnné troubě, následně ochlazená na cca 40 °C a do takto vychlazené směsi bylo přidáno 10  $\mu$ l/100 ml ethidium bromidu (koncentrace 5  $\mu$ g/ml). Rozpuštěný agarózový gel byl nalit do připravené formy s vloženými hřebínky pro vytvoření jamek. Tuhnutí gelu probíhalo ve tmě při pokojové teplotě po dobu 30-40 minut. Na hotový gel byly rovnou nanášeny PCR produkty nebo byl uchováván ve 4 °C.

Při nanášení bylo smícháno 3  $\mu$ l PCR produktu s 2  $\mu$ l nanášecího pufru "Loading dye" (300  $\mu$ l 100% glycerol, 700  $\mu$ l  $ddH_2O$ , 0,5 mg bromfenolové modři). Elektroforéza probíhala při

pokožkové teplotě a elektrickém napětí 115 V. DNA byla následně vizualizována na UV transluminátoru (White/Ultraviolet Transilluminator). Velikost fragmentů a množství DNA bylo nakonec odhadnuto za pomoci žebříčku velikostí (size markeru) Lambda DNA/EcoRI+HindIII (Fermentas). Na Obr. 7 je fotografie úspěšně amplifikované DNA z první amplifikace.



**Obr. 7:** Fotografie gelu s úspěšně amplifikovanými vzorky (vlevo velikostní marker Lambda DNA/EcoRI+HindIII) SM - "size marker" Lambda DNA/EcoRI+HindIII, 1 - 22 vzorky *D. noxia*, K - Kontrolní reakce bez DNA.

### 5.2.7 Purifikace PCR produktu

Pro purifikaci produktů o vysoké koncentraci a čistotě bylo využito pouze enzymatické reakce, ve které bylo smícháno 0,5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O, 0,5  $\mu$ l enzymu Exonuclease I (20 U/ $\mu$ l, Fermentas) a 1,0 enzymu  $\mu$ l Shrimp Alkaline Phosphatase (1 U/ $\mu$ l, Fermentas). Inkubace vzorku probíhala v termocykléru Bioer XP cycler, nejprve 30 minut při 37 °C a následně 15 minut při 87 °C. Část produktu byla následně použita pro sekvenaci, zbytek byl zmražen.

Pro purifikaci PCR produktů o nedostatečné čistotě bylo nutno použít metody čištění pomocí DNA Clean & Concentrator<sup>TM-5</sup> (ZYMO RESEARCH). Čištění bylo provedeno dle návodu výrobce. Doba centrifugace však byla u všech kroků prodloužena z 5-10 s na 30s a v konečném kroku byl sloupeček promýván dvakrát 5  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O namísto jednou 6-10  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O.



### **5.2.8 Sekvenační reakce a její zpracování**

Přečištěný PCR produkt byl smíchán s vodou tak, aby se výsledné množství DNA pohybovalo mezi 5 a 20 ng. Ke směsi PCR produktu a vody bylo následně přidáno 2,5 pmol primeru tak, aby konečný objem byl přesně 7,5  $\mu$ l. Sekvenační reakce a její výsledné zpracování proběhlo na sekvenátoru ABI PRISM 3130xl od firmy Applied Biosystems v Laboratoři genomiky Ústavu molekulární biologie rostlin (Biologické centrum AV ČR).

### **5.2.9 Analýza sekvencí**

Pro kontrolní identifikaci sekvencí byla použita srovnávací databáze NCBI BlastSearch (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Pro prohlédnutí a počáteční vyhodnocení sekvencí byl použit program BioEdit ver. 5.0.9. (Hall, 1999). V programu MEGA 4 (Tamura a kol. 2007) byly následně sekvence dle potřeby upraveny a byly z nich vytvořeny alignmenty. Poté byly pomocí metody ClustalW v tomtéž programu vytvořené alignmenty srovnány tak, aby si odpovídaly. V programu MEGA 4 byla též vypočítána průměrná délka a nukleotidové složení sekvencí, variabilita uvnitř druhu, uvnitř vzorků z jedné země a mezi vzorky z různých zemí. Byl určen počet variabilních míst, parsimoniální variabilita (variabilita alespoň ve dvou nukleotidech, která se vyskytuje minimálně u dvou sekvencí) a přítomnost delecí. Introny a exony byly určeny pomocí programu GeneSplicer podle organismu *Drosophila* (Partea a kol., 2001) a programu NetGene2 ver. 2.4 podle *C. elegans* jakožto zástupců skupiny invertebrata. Umístění intronů a exonů bylo následně potvrzeno porovnáním cDNA sekvence z klonu s DNA sekvencemi z jedinců v programu MEGA 4.

V programu DnaSP ver. 3 (Rozas a Rozas, 1999) byla následně provedena haplotypová analýza a pomocí testu neutrality Tajimovo D byla zjišťována přítomnost nebo nepřítomnost selekce.

Byl určen počet haplotypů (kombinace alel přítomná v jedinci, která je přenášena do další generace) a průměrná haplotypová diverzita.

Nakonec byl v programu MEGA 4 vytvořeny dendrogramy na základě metody Minimum Evolution (ME). Dendrogramy byly vytvořeny na základě modelu genetické vzdálenosti Kimura 2-Parameter. Gapy byly zohledňovány jako variabilita, ne jako chybějící data (Pairwise deletion).

Pro ověření správnosti stromu byla využita metoda bootstrap (10000 opakování). Haplotypová síť (network) byla vytvořena v programu Network 4.5.1.6 (Fluxus technology ltd.).

## 6 Výsledky

V rešeršní části práce byly prostudovány jednotlivé metody používané pro studium mšic a byly srovnány její výhody a nevýhody. Na základě této rešeršní práce bylo vybráno 7 alozymů které byly podrobeny další analýze.

V experimentální části práce pak byla testována nukleotidová variabilita genu, který kóduje enzym fosfoglukomutázu (PGM). Pro amplifikaci byla využita DNA extrahovaná ze 48 populací sesbíraných na všech kontinentech s výjimkou Austrálie.

### 6.1 Rešeršní práce

Pro studium mšic se využívá řada metod a molakulárních markerů. Pro *D. noxia* zatím bylo využito alozymové elektroforézy, RAPD-PCR, AFLP-PCR, mikrosatelitů, genetických markerů, z nichž je v dnešní době asi nejoblíbenější mtDNA a také analýzy endosymbiontů.

Alozymové studie jsou vhodným nástrojem pro identifikaci jedinců, studium populační struktury, fylogenetickou rekonstrukci, určení hranic druhu. nejsou však dostatečně variabilní pro studie zabývající se vnitrodruhovou variabilitou. RAPD-PCR sice vykazuje obrovskou variabilitu i uvnitř druhů, ale je to metoda snadno ovlivnitelná a špatně reprodukovatelná.

AFLP-PCR je naproti tomu metoda výhodná, dobře reprodukovatelná a vykazuje i obrovskou variabilitu, kterou se vyrovná i variabilitě v mikrosatelitech. Narozdíl od RFLP-PCR navíc nepotřebuje obrovské množství DNA. Mikrosatelity jsou markerem variabilním, odkrývajícím variabilitu i mezi klony. Naproti tomu v dnešní době oblíbená sekvenace mitochondriální oblasti COI vnitrodruhovou variabilitu, až na některé výjimky, nevykazuje.

Analýza endosymbiontů je užitečným nástrojem, už jen proto, že nám dovoluje zjistit více o těchto škůdcích a jejich životních strategiích.

### 6.2 Alozymová elektroforéza

Ze sedmi testovaných alozymů se dva nepodařilo nabarvit vůbec (6 – PGD, GK). Alozymy esteráza (EST), hexokináza (HK), fosfogluoizomeráza (PGI), malátdehydrogenáza (MDH) a fosfoglukomutáza (PGM) se podařilo nabarvit. Alozymy fosfogluoizomeráza a malátdehydrogenáza vykazovaly při prvním barvení i určitou variabilitu. Při dalších analýzách jiných vzorků se však již vždy objevila pouze jedna alela.

### 6.3 Gen pro fosfoglukomutázu (PGM)

Pro amplifikaci byly využity pouze primery Pgm B - Fw 2 a Pgm B - Rev 2b. Pomocí primerů Pgm A - Fw 1 a Pgm A - Rev 1 se vzorky amplifikovat nepodařilo. Primer Pgm B - Rev 2a jsem nepoužila proto, že spolu s primerem Pgm B - Fw 2 amplifikuje stejnou oblast jako primer Pgm B - Rev 2b, ale získaný úsek je kratší. Do sekvenační reakce byl použit pouze primer Pgm B - Rev 2b, protože pomocí primeru Pgm B - Fw 2 se opakovaně nepodařilo sekvence získat.

Jako první pak byla získána cDNA sekvence (300 bp) vyextrahovaná z jedinců z chovu, na které byla funkčnost primerů zkoušena. Funkční primery byly dále využity pro amplifikaci genomové DNA ze vzorků.

Při první amplifikaci DNA se podařilo naamplifikovat všechny vzorky ze 49 jedinců sesbíraných v USA, Africe, Asii a Evropě. Většina ze získaných PCR produktů však byla slabá. Z této první amplifikace však bylo přesto získáno prvních 13 sekvencí. Dalších 5 sekvencí bylo získáno až po reamplifikaci PCR produktů získaných při první amplifikaci, protože se vzorky nepodařilo znovu amplifikovat a to ani po změně polymerázy, koncentrace MgCl<sub>2</sub> nebo po přidání BSA či DMSO. Těchto 18 sekvencí (viz. tab. 3) bylo dále upraveno na jednotnou délku 990 bazí.

Tab. 3: Sekvenování jedinci

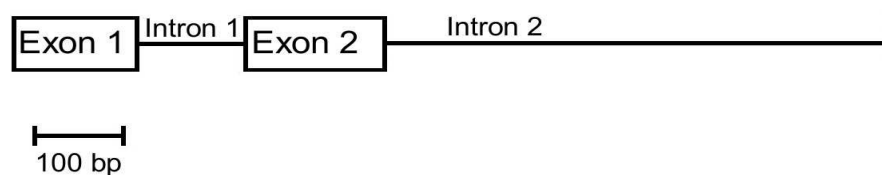
Značení	Číslo Vzorku	Země, oblast	Datum	Hostitelská rostlina	
				Rod	Druh
Tur_1	13	Turkey, Campus-Konya, Selguklu	26.6.2008	Triticum	aestivum
Tur_2	17	Turkey, Gumra-Konya01	2.7.2008	Triticum	aestivum
Tur_3	19	Turkey, Gumra-Konya03	2.7.2008	Triticum	aestivum
Tur_4	20	Turkey, Meram-Konya	10.7.2008	Triticum	aestivum
Tunis_1	24	Tunisia, Ain Djasser (Batna Dept.)	21.4.2008	Hordeum	vulgare
Tunis_2	25	Tunisia, Kais (Khenchela Dept.)	9.5.2008	Hordeum	vulgare
Tunis_3	27	Tunisia, Hemla (Batna Dept.)	14.5.2008	Triticum	durum
USA_1	31	USA, Couny line - Juniper Canyon, Blicketon WA	24.6.2008	Triticum	aestivum
USA_2	33	USA, Pear Ac. IAREC, Prosser, WA, Benton Co.	24.6.2008	Triticum	aestivum
USA_3	34	USA, Headquarter Unit IAREC Field H-21, Prosser, WA	24.6.2008	Hordeum	vulgare
Mold	35	Moldova, SE, Reyina district, Ciniseuti	11.7.2009	Triticum	vulgare
CZ_1	37	Czech Republic, Hrádek, Moravia meridionalis	1.7.2008	Hordeum	vulgare
CZ_2	38	Czech Republic, Litobratřice, Moravia meridionalis	1.7.2008	Hordeum	vulgare
CZ_3	40	Czech Republic, Třebíč, Bohemia south	16.7.2008	Hordeum	vulgare
Sp_3	44	Spain, Saltř, Girona	7.5.2008	Hordeum	vulgare
Sp_2	45	Spain, Vencilló	6.5.2008	Hordeum	vulgare
SP_1	46	Spain, Santa Maria del Camí (Barcelona Distr.)	14.5.2008	Hordeum	vulgare
Sp_4	47	Spain, La Pobla de Cérvoles (Lleida Distr.)	16.5.2008	Hordeum	vulgare

V sekvencích se vyskytovalo průměrně 40,2% A, 34,5% T, 10,7% C a 14,6% G. Průměrný poměr AT/GC je 74,7/25,3. Takto vysoký obsah nukleotidů A+T může způsobovat vyšší mutační rychlost a může být též důvodem, proč se některé vzorky nepodařilo znovu amplifikovat a sekvenovat. Nukleotidové složení a poměry nukleotidů AT/GC jednotlivých jedinců jsou uvedeny v příloze 4.

Analýzou pomocí specializovaných programů (GeneSplicer, NetGene 2 ver. 2.4) a následným porovnáním DNA sekvencí z jedinců s cDNA sekvencí z klonu byly dále určeny exony a introny. Programem NetGene 2 byla určena hranice konce intronu 1 a hranice počátku intronu 2 (viz tab 4). Program GeneSplicer se ukázal být méně přesným. Hranici počátku intronu 2 nedokázal rozpoznat. Potvrdil však hranici konce intronu 1 v místě 261. Počátek intronu 1 nedokázal určit ani jeden z programů, byl tedy určen porovnáním genomových DAN sekvencí z jedinců a cDNA sekvence z klonu. První exon se pak nachází mezi nukleotidy 1-141. Druhý exon leží mezi nukleotidy 262 – 420 (Obr. 8).

Tab. 4: Určení exonu a intronu pomocí programu NetGene 2

<b>Donor splice sites, direct strand</b>			
Pos 5'→ 3'	Strand	Confidence	5' intron exon 3'
421	+	1,00	TCTTGTCCAA^GTATGTAACA
<b>Acceptor splice sites, direct strand</b>			
Pos 5'→ 3'	Strand	Confidence	5' intron exon 3'
261	+	0,87	TTATAAACAG^GGTATAAGAG



**Obr. 8:** Uspořádání exonů a intronů v osekvenované oblasti

Bylo určeno i průměrné množství a poměry jednotlivých nukleotidů v exonech a intronech sekvenované oblasti (Tab. 5).

**Tab. 5:** Průměrné množství nukleotidů v exonech a intronech

	T	A	G	C	Poměry nukleotidů AT/GC
Exon 1	34,1	38,8	17,5	9,6	72,9/27,1
Exon 2	30,9	30,3	21,2	17,6	61,2/38,8
Intron1	39,9	39,4	11,5	9,2	79,3/20,7
Intron 2	34,6	44	12,4	9	78,6/21,4

Mezi sekvencemi bylo po další analýze nalezeno 33 variabilních míst (3,3 %), parsimoniální variabilita byla nalezena na 17 místech (1,7 %). Deset mutací se nacházelo v exonech, z toho 3 mutace byly tiché (substituce nukleotidu v tripletu nemění aminokyselinu v aminokyselinovém řetězci). Zbylých 23 mutací se nacházelo v intronech. Kromě těchto variabilních míst se v sekvencích haplotypu 5 nachází několik delecí. První se nachází v místě 496 bp, druhá je rozsáhlejší a leží mezi nukleotidy 625 – 632 a třetí delece, ta nejdelší, leží mezi nukleotidy 860 – 882. Všechny tyto delece se vyskytují ve druhém intronu.

Průměrná variabilita všech populací je 0,009. Variabilita mezi jednotlivými populacemi se směrodatnými odchylkami je uvedena v příloze 3.

Tajimovo D je -0,49398,  $P > 0,1$ , což je statisticky nesignifikantní. Znamená to tedy, že se v daném úseku neprojevila žádná selekce.

Genetická variabilita byla analyzována i mezi jednotlivými zeměmi, ze kterých vzorky pocházely (Tab. 6).

**Tab. 6:** Genetická variabilita mezi zeměmi (zeleně směrodatné odchylky)

	Turecko	Tunis	USA	Španělsko	Moldavsko	ČR
Turecko		0,002	0,001	0,001	0,005	0,005
Tunis	0,005		0,002	0,002	0,003	0,003
USA	0,002	0,005		0,001	0,005	0,005
Španělsko	0,004	0,008	0,004		0,005	0,005
Moldavsko	0,017	0,011	0,018	0,020		0,000
ČR	0,017	0,011	0,018	0,020	0,000	

Mezi Moldavskem a Českou republikou se podle analyzovaných vzorků žádná variabilita nevyskytuje. Nejvyšší variabilita se pak vyskytuje mezi Českou republikou a Španělskem (resp. Moldavskem a Španělskem) a má hodnotu 0,018.

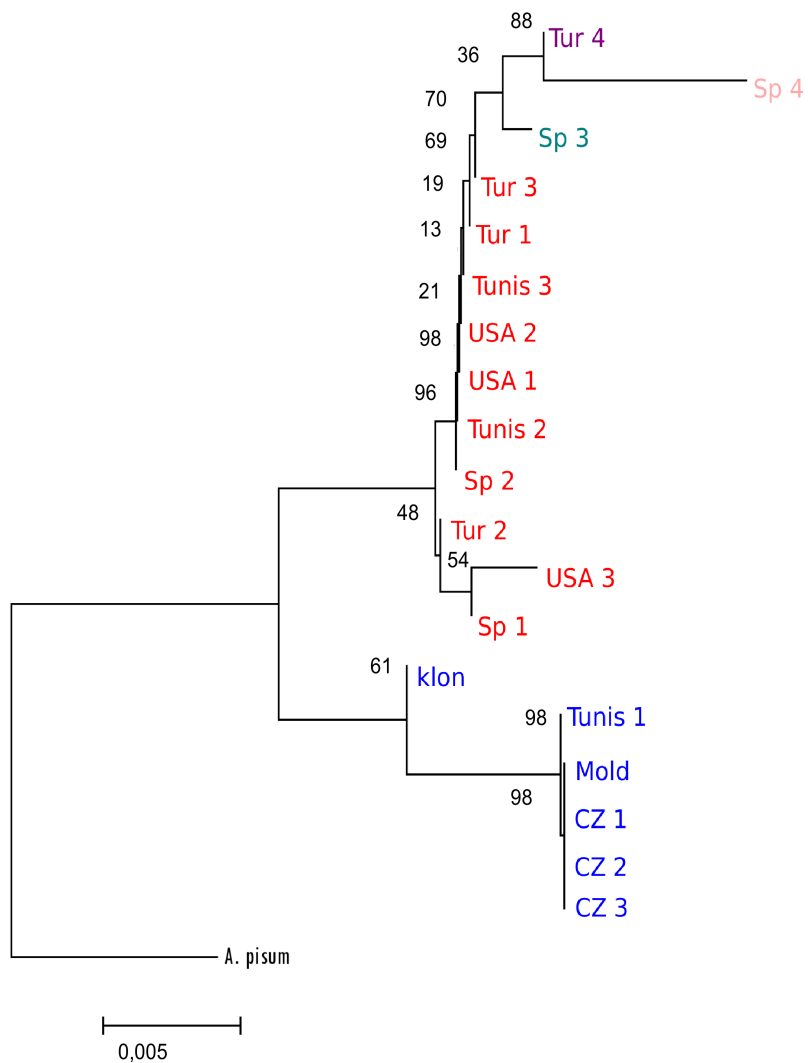
Byla též vypočítána variabilita uvnitř těchto zemí. Tato variabilita je však pouze nepatrná. Turecko, USA a ČR žádnou variabilitu nevykazují. Tunis a Španělsko vykazuje variabilitu pouze 0,001. Moldavská republika nebyla do analýzy zahrnuta, protože obsahuje pouze jeden vzorek a nebylo tedy možno sekvenci s ničím porovnat.

Jednotlivé populace byly poté rozděleny do pěti haplotypů. Přehled populací náležejících do jednotlivých haplotypů je uveden v tab. 7. Haplotypová diverzita je 0,064 (směrodatná odchylka 0,097).

**Tab. 7:** přehled haplotypů

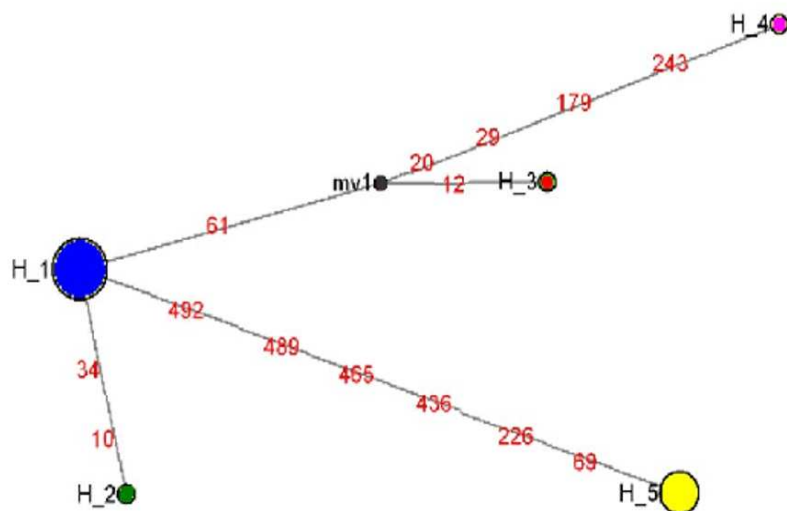
Haplotyp	Značení	No.
1	Tur_1	13
	Tur_2	17
	Tur_3	19
	SP_1	20
	Sp_2	24
	Tunis_2	25
	Tunis_3	27
	USA_1	31
	USA_2	33
	USA_3	34
	2	Tur_4
3	Sp_3	37
4	Sp_4	38
5	Mold	40
	CZ_1	44
	CZ_2	45
	CZ_3	46
	Tunis_1	47

Ze získaných sekvencí byl následně vytvořen dendrogram znázorňující fylogenetické vztahy mezi jedinci *D. noxia* z různých zemí a oblastí (obr. 9) a dále byla vytvořena síť (network) znázorňující vztahy mezi haplotypy (Obr. 10).



**Obr. 9:** Dendrogram fylogenetických vztahů mezi jedinci *D. noxia* z různých zemí a oblastí (Minimum Evolution, Kimura 2-Parameter, Pairwise deletion, Bootstrap 10000). Čísla vedle větví znázorňují, v kolika procentech byly v "bootstrap" testu jedinci do těchto klastrů spojeni. Barevně jsou pak odlišeny jednotlivé haplotypy. Názvy jedinců viz. tab. 5. Jedinec "Klon" pochází z chovu a pro analýzu byla použita jeho cDNA sekvence. Jako outgroup byla použita *A. pisum*.





**Obr. 10:** Síť (Network) fylogenetických vztahů mezi haplotypy *D. noxia*. Červená čísla uvádějí místo, ve kterém došlo k mutaci vedoucí k tomuto haplotypu. Velikost kruhů znázorňuje četnost jedinců v haplotypu. Barevně haplotypy odpovídají značení na dendrogramu fylogenetických vztahů mezi jedinci.

## 7 Diskuze

### 7.1 Literární rešerše

Na základě prostudovaných článků se zdá, že často využívaný marker, COI, nevykazuje vnitrodruhovou variabilitu a vzhledem ke své konzervovanosti není ani vždy vhodným markerem pro určování druhů a mezidruhové studie. RAPD-PCR je pro vnitrodruhové analýzy variabilní dostatečně, ale je to metoda snadno ovlivnitelná a špatně reprodukovatelná. Naopak mikrosatelity a AFLP-PCR se jeví jako dostatečně variabilní, dostatečně citlivé a relativně snadno reprodukovatelné metody. Pomocí AFLP-PCR bylo například dokázáno, že *D. noxia* neinvadovala do USA jen jednou jak to ukazují RAPD-PCR a dokonce i mikrosatelity, ale nejméně dvakrát, možná dokonce třikrát. Také potvrdila teorii více hlavních směrů šíření. Alozymy se jeví jako nejméně variabilní, neodhalují skutečnou genetickou diverzitu. Jedná se však o metodu velmi zajímavou. Navíc geny, které alozymy kódují, jsou v dnešní době stále ještě neprobádané a dávají prostor pro původní výzkum.

Gen *Pgm* jsem si vybrala kvůli jeho účasti na adaptačních procesech, lokální a teplotní variabilitě sledované u některých organismů a nepřítomnosti geografického klínu.

### 7.2 Alozymová elektroforéza a detekované alozymy

Při alozymové elektroforéze byla využita metoda podle Steinera a Joslyna (1979). Podle článku Puterky a kol. (1993) bylo vyzkoušeno též několik modifikací, ale tyto modifikace se neosvědčily. Vypadá to, že snížení pH pufrů tak, jak to Puterka a kol. navrhovali, nepůsobí na alozymy příznivě. Gely se i při nižším elektrickém napětí tavily a nebylo pak možno alozymy detekovat.

Ze sedmi testovaných alozymů se dva nepodařilo nabarvit vůbec (6-PGD, GK). To může být důsledek nedostatečného množství enzymu ve vzorku. Tato možnost je však nepravděpodobná, protože pro analýzu mšic bylo využito více jedinců z jednoho klonu. pravděpodobnější je možnost, že chemikálie použité při barvení byly již staré, případně je možné, že použitý pufrovací systém nebyl vhodný pro analýzu těchto alozymů. Alozymy hexokinázu (HK), fosfoglucoizomerázu (PGI), malic dehydrogenázu (MDH), esterázu (EST) a fosfoglukomutázu (PGM) se nabarvit podařilo. Vzhledem k tomu, že byly barveny pouze klony z chovu, nevykazovaly vzorky variabilitu. Při prvním barvení se sice u malátdehydrogenázy a

fosfoglucoizomerázy objevil ještě i druhý band, ten se však při analýze dalších vzorků, které byly sesbírány na jiné rostlině, znovu neobjevil při žádné další analýze.

### **7.3 Extrakce DNA**

DNA byla extrahována ze vzorků uchovávaných v etanolu. Byly vyzkoušeny dva způsoby izolace. Úspěšnější byla izolace pomocí kitu DNeasy Blood and Tissue. Extrakce pomocí "Squishing Buffer" se zdařila také, ale vzorky se nepodařilo sekvenovat. To je pravděpodobně proto, že vzorky byly v etanolu uchovávané příliš dlouho a extrakce pomocí Squishing Bufferu již nebyla dostatečně účinná, nejspíš v důsledku částečné degradace DNA, která se již při izolaci nerenaturovala, případně kvůli přítomnosti inhibitorů. Zdá se tedy, že extrakce pomocí DNeasy Blood and Tissue kitu je výhodnější a může být snadno použita i pro extrakci starších vzorků.

### **7.4 Metodika PCR**

Při prvním pokusu se podařilo amplifikovat všechny vzorky vyextrahované z různých populací. Pro tuto amplifikaci byla použita polymeráza Taq DNA Unis. Některé ze vzorků však byly příliš slabé na to, aby se daly sekvenovat. Po této první amplifikaci se již nepodařilo vzorky znovu amplifikovat. Při hledání řešení bylo vyzkoušeno několik DNA polymeráz. Kromě „klasické“ Taq DNA Unis byl též vyzkoušen Combi taq DNA polymeráza, LA DNA polymeráza mix a DreamTaq™ polymeráza. Žádná z nich však již vzorky neamplifikovala.

Zkoušela jsem též zvýšit výtěžnost reakce změnami koncentrace hořčíku. Ani to však nepomohlo stejně jako přidání BSA nebo DMSO. To je zřejmě důsledkem částečné degradace DNA, která se již při amplifikaci nerenaturovala. Možností je také přítomnost inhibitorů.

Pro získání alespoň několika dalších sekvencí byla použita metoda reamplifikace. I zde jsem vyzkoušela všechny již dříve zmíněné polymerázy. Amplifikace však proběhla pouze za použití Taq polymerázy Unis. I při reamplifikaci jsem zkoušela změnit koncentraci MgCl<sub>2</sub>, ale nejlepších výsledků bylo dosahováno při koncentraci 2mM, což je standardní koncentrace MgCl<sub>2</sub> v 10x pufru dodávaném firmou TaKaRa.

## 7.5 Purifikace PCR reakce

Ze dvou metod využitých při purifikaci se jeví jako výhodnější metoda enzymatické purifikace. Touto metodou bylo možno purifikovat i vzorky s menším množstvím DNA. Pro čištění přes sloupeček je nutno mít vzorek s vysokým množstvím DNA a proto je často nutno využít několika násobnou amplifikaci, což celý proces značně prodražuje. Výsledný vzorek navíc není významněji lépe přečištěn než při enzymatické purifikaci. Avšak v případě, že DNA nebyla dostatečně čistá, v reakci se vyskytovalo několik nespecifických produktů a správný fragment musel být z gelu vyříznut, potom to byla jediná možnost jak DNA purifikovat.

## 7.6 Gen pro fosfoglukomutázu

Ačkoliv bylo navrženo 5 primerů, pro analýzu byla použita pouze dvojice Pgm B - Fw 2a Pgm B - Rev 2b. Primer Pgm B - Rev 2a nebyl použit proto, že amplifikuje stejnou část genu jako primer Pgm B - Rev 2b.

Dvojice primerů Pgm A - Fw 1 a Pgm A - Rev 1 nebyla použita, protože při testování na cDNA z chovu žádný produkt neamplifikovala. Tato dvojice primerů je navržena na začátek cDNA sekvence *Acyrtosiphon pisum*. Množství produktu při reverzní transkripci však s narůstající délkou fragmentů klesá. Je tedy možné, že tyto dva primery mohou být funkční a při PCR reakci neamplifikovaly žádný produkt pouze proto, že pro reakci nebylo možno získat potřebné množství dostatečně dlouhých řetězců cDNA a genomovou DNA tyto primery amplifikovat budou. Případně lze navrhnout reverzní primer do již osekvenované oblasti a získat tak cDNA produkt, který bude obsahovat dostatečné množství řetězců pro amplifikaci pomocí primerů Pgm A - Fw1 a Pgm A - Rev 1.

Dále byla získána cDNA sekvence z klonu a i přesto, že se DNA ze všech populací podařilo alespoň jednou amplifikovat, osekvenovat se podařilo pouze 18 z nich (37,5%). To je pravděpodobně důsledek částečné degradace DNA extrahované ze vzorků dlouhodobě uchovaných v lihu. Neúspěšná sekvenace však může být i důsledek vysokého obsahu nukleotidů A a T, které se zde vyskytují v repetících a znesnadňují tak sekvenaci.

V získaných 18 sekvencích (většina z nich o délce 990 bp) bylo nalezeno 33 variabilních míst, z toho 17 parsimoniálních. Deset variabilních míst bylo nalezeno i v exonu. Tři z těchto mutací je tichých. To znamená, že 6 mutací aminokyseliny mění. To je na exon obrovské číslo. Může však být důsledkem chyb v sekvenování. Nukleotidové složení intronů a exonů se také liší. Jak v intronech tak v exonech výrazně předvládá množství nukleotidů A/T. V exonech je však až téměř

o polovinu více nukleotidů G/C než v intronech. To může být snaha kódující sekvence ochránit. Nukleotidy G a C totiž nepodléhají tak rychle mutacím.

Jedinci byly dále na základě získaných sekvencí rozděleni do 5 haplotypů. Haplotyp 1 odpovídá kmeni střední Asie – Afrika (Liu a kol., "In press") a kopíruje první předpokládanou trasu šíření z Ukrajiny do Turecka, Francie, Afriky a odtud do Ameriky (Puterka, 1993; Payton, 2002; van Emden a Harrington, 2006). Haploty 5 je sesterskou skupinou haplotypu 1 a koresponduje s kmenem evropským (Starý a kol., 2002; Liu a kol., "In press"). V tomto kmeni se však objevuje též jedna populace z Tunisu, což nasvědčuje tomu, že se tento kmen dále šíří.

Oproti práci Liu a kol. ("In press") se však nepodařilo na základě tohoto markeru potvrdit, že by populace pocházející ze státu Washington (USA) nepatřily ani do jednoho z výše zmíněných kmenů. Na základě této práce patří Washingtonské populace do haplotypu 1, tedy kmene střední Asie – Afrika. Haplotypy 2, 3 a 4 jsou odvozené od haplotypu 1 a každý z nich obsahuje jen jednu populaci. Dendrogram vytvořený metodou Minimum Evolution sdružuje všechny tři haplotypy do jedné skupiny a za sesterské považuje haplotyp 2 a haplotyp 4. Já se však v tomto bodě přikláním k networku vytvořenému pro haplotypy v programu Network, který určuje jako sesterské haplotyp 3 a haplotyp 4, protože oba dva pocházejí ze Španělska.

Haplotypy 2, 3 a 4 obsahují každý pouze jednu sekvenci. Sekvence těchto jedinců byly získány jako poslední až po reamplifikaci a vykazují velkou variabilitu v jinak velmi konzervovaném úseku. Populace patřící do těchto haplotypů byly z nedostatku času sekvenovány pouze jednou a nemohly tedy být opraveny případné chyby vnesené reamplifikací a sekvenací. Je tedy možné, že tyto jedinci ve skutečnosti nepatří do samostatných haplotypů, ale jsou součástí haplotypu 1.

Nejvyšší genetická variabilita mezi zeměmi, z nichž jedinci pocházeli (Česká republika/Španělsko, 0,02) odráží přítomnost tří haplotypů nalezených mezi jedinci pocházejícími ze Španělska, ale sekvence jedinců z České republiky jsou shodné.

Na základě provedeného výzkumu se zdá, že gen pro fosfoglukomutázu může být pro odhalování vnitrodruhové variability lepší než RAPD-PCR. Na rozdíl od Puterky a kol. (1993), kteří turecké jedince zařadili pouze do jednoho haplotypu, odhlalila analýza genu pro fosfoglukomutázu haplotypy 2. S mikrosatelity nebo COI oblastí nelze výsledek srovnávat, protože jak analýzy COI tak testy na mikrosatelitech byly prováděny pouze v rámci jedné země.

## 8 Závěr

Mikrosatelity a AFLP-PCR se na základě rešerše jeví jako metody, které dokáží nejlépe odkrýt případnou variabilitu a proto jsou vhodné pro vnitrodruhové studie. Naopak analýza pomocí COI se ve všech studiích, kde byla použita pro studie vnitrodruhové variability, projevila jako marker nedostatečně variabilní a je tedy nevhodné jí jako vnitrodruhový marker používat. RAPD-PCR je metoda, která sice odkrývá obrovskou variabilitu, ale je náročná a nereprodukovatelná. Proto se domnívám, že další výzkumy by se měly zaměřit hlavně na výzkum mikrosatelitů a AFLP-PCR.

V experimentální práci bylo testováno sedm alozymů. Dva z nich (PGM, MDH) vykazovali při první analýze variabilitu. Tato variabilita se již sice znovu neobjevila, přesto by se však mohlo jednat o alozymy, jejichž geny by bylo vhodné podrobněji prostudovat.

Ze 49 vzorků, ze kterých byla DNA extrahována, se podařilo naamplifikovat a osekvenovat 18 z nich. I v tomto limitovaném množství sekvencí se však podařilo objevit 33 variabilních míst a několik delecí, na jejichž základě byly populace rozděleny do 5 haplotypů. Haplotypy 1 a 5 odpovídají dvěma kmenům které předpokládají ve své práci Liu a kol. ("In press"). Haplotypy 2, 3 a 4 mohou být výsledkem divergence haplotypu 1 nebo možné chyby při sekvenaci. Je zde tedy prostor pro další analýzy, které by teorii o existenci haplotypů 2, 3 a 4 potvrdily nebo vyvrátily.

Na základě sekvencí získaných z 18 jedinců se zdá, že gen pro fosfoglukomutázu je fragmentem vcelku variabilním a může být vhodným markerem pro určování haplotypů a některé studie zabývající se variabilitou přírodních populací.

## 9 Použitá literatura

- Abbot, P.; Moran, A.; 2002.** Extremely low levels of genetic polymorphism in endosymbionts (*Buchnera*) of aphids (*Pemphigus*) , *Molecular Ecology*, 11: 2649-2660
- Acquaah, G.; 1992:** Practical Protein Electrophoresis for Genetic Research, *Dioscorides Press*, Portland, Oregon, 131 pp
- Aikhionbare, F. O.; Pruess, K. P.; Mayo, Z. B.; 1998.** Greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes characterized using random amplified polymorphic DNA, *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 14: 105-108
- Aikhionbare, F. O.; Mayo, Z. B.; 2000.** Mitochondrial DNA sequences of greenbug (*Homoptera: Aphididae*) biotypes , *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*, 16: 199 – 205
- Ballard, J. W. O.; Whitlock, M. C.; 2004.** The incomplete natural history of mitochondria, *Molecular ecology*, 13: 729-744
- Barbosa, S. E.; Dujardin, J. P.; Soares, R. P. P.; Pires, H. H. R.; Margonari, C.; Romanha, A. J.; Panzera, F.; Linardi, P. M.; Duque-De-Melo, M.; Pimenta, P. F. P.; Pereira, M. H.; Diotaiuti, L.; 2003.** Interpopulation Variability Among *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae) from Brazil , *Journal of Medical Entomology*, 40 (4): 411-420
- Barrette, R. J.; Crease, T. J.; Hebert, P. D. N.; 1994.** Mitochondrial DNA diversity in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* / *National Research Council Canada = Génome / Conseil national de recherches Canada*, 37(5): 858-865.
- Belay, T.; Smith, C. M.; Stauffer, Ch.; 2003.** Biotypic status of the RWA, *Diuraphis noxia*, in Ethiopia, *Mitt. Dtsch. Ges. Allg. Angew. Ent.*, 15: 1-4
- Besold, J.; Huck, S.; Schmitt, T.; 2008.** Allozyme polymorphisms in the small heath, *Coenonympha pamphilus*: recent ecological selection or old biogeographical signal?, *Annales Zoologici Fennici*, 45: 217-228
- Birkle, L. M. and Douglas, A. E.; 1999.** Low genetic diversity among pea aphid (*A. pisum*) biotypes of different plant affiliation, *Heredity* 82: 605-612
- Black IV, W. C.; DuTeau, N. M.; Puterka, G. J.; Nechols M J. R.; Pettorini, J. M.; 1992.** Use of the Random Amplified Polymorphic DNA Polymrase Chain Reaction (RADP-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (*Homoptera: Aphididae*), *Bulletin of Entomological Research*, 82: 151-159
- Brown, T. A.; 1994.** DNA sequencing: The Basics, *Oxford, IRL press*, 101 pp

- Caterino, M. S.; Soowon, Ch.; Sperlink, F. A. H.; 2000.** The Current State of Insect Molecular Systematics: A Thriving Tower of Babel, *Annual Review of Entomology*, 45: 1-54
- Davis, B. J.; 1964.** Disc electrophoresis: II. Method and applications on human serum protein, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 121: 404-427
- Dolatti, L.; Ghareyazie, S.; Moharramipour, S.; Noori-Dalooi, M. R.; 2005.** Evidence for regional diversity and host adaptation in Iranian populations of the Russian wheat aphid, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 114: 171-180
- Ferrari, J.; Via, S.; Godfray, H. Ch. J.; 2008.** Population differentiation and genetic variation in performance on eight hosts in the pea aphid complex, *Evolution*, 62 (10): 2508-2524
- Figuroa, Ch. C.; Simon M J.-Ch.; Le Gallic, J.-F.; Miemeyer, H. M.; 1999.** Molecular markers to differentiate two morphologically-close species of the genus *Sitobion*, *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 92: 217-225
- Flowers, J. M.; Sezgin, E.; Kumagai S.; Duvernell D. D.; Matzkin, L. M.; Schmidt, P. S., Eanes W. F.; 2007.** Adaptive Evolution of Metabolic Pathways in *Drosophila*, *Molecular Biology and Evolution*, 24 (6): 1347-1354
- Fluxus Technology Ltd 1999-2009.** Network © Copyright
- Footit, R. G.; Maw, H. E. L.; Von Dohlen, C. D.; Hebert, P. D. N.; 2008.** Species identification of aphids (*Insecta: Hemiptera: Aphididae*) through DNA barcodes, *Molecular Ecology Resources*, 8: 1189-1201
- 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
- Gil, R.; Sabater-Muñoz, B.; Perez-Brocal, V.; Silva, F. J.; Latorre A.; 2006.** Plasmids in the aphid endosymbiont *Buchnera aphidicola* with the smallest genomes. A puzzling evolutionary story, *Gene*, ([www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)), 370: 17-25
- Gu, H.; 1991.** Electrophoretic variation at flight-related enzyme loci and its possible association with flight capacity in *Epiphyas postvittana*, *Biochemical Genetics*, 29(7/8): 345-354.
- Hales, D. F.; Tomiuk, J.; Wöhrmann, K.; Sunnuck, P.; 1997.** Evolutionary and genetic aspects of aphid biology: A review, *European Journal of Entomology*, 94: 1-55
- Hall, T. A.; 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- Hebsgaard, S.M.; Korning, P.G.; Tolstrup, N.; Engelbrecht, J.; Rouze, P.; Brunak, S.** Splice



- site prediction in *Arabidopsis thaliana* DNA by combining local and global sequence information, *Nucleic Acids Research*, 1996, Vol. 24, No. 17, 3439-3452. **Brunak, S.; Engelbrecht, J.; and Knudsen, S.:** Prediction of Human mRNA Donor and Acceptor Sites from the DNA Sequence, *Journal of Molecular Biology*, 1991, 220, 49-65.
- Hoelzel, A. R.; Dover, G. 1991.** Molecular genetic ecology, *IRL press at Oxford University Press, Oxford*, 75 pp
- Hoy, M. 1994.** Insect Molecular Genetics: An Introduction to Principles and Applications, *Academic Press, San Diego, Inc.*, 540 pp
- Kiplagat, O.; 2005.** The Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko): Damage on Kenyan wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties and possible control through resistance breeding, *Thesis Wageningen University, The Netherlands, CIP-DATA Koninklijke bibliotheek, Den Haag*, 137 pp
- Kučerová, L.; 2003.** Stanovení vnitrodruhové variability lýkožrouta smrkového (*Ips typographus*, L.) na základě alozymů, [Intraspecific variability determination of the Norway spruce bark beetle (*Ips typographus*, L.) based on allozymes. Bc. Thesis, in Czech.] - 42 p., *Faculty of Biological sciences, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.*
- Lai, Ch.-Y.; Baumann, P.; Moran, N.; 1996.** The Endosymbiont (*Buchnera* sp.) of the Aphid *Diuraphis noxia* Contains Plasmids Consisting of trpEG and Tandem Repeats of trpEG Pseudogenes, *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (2): 332-339
- Liu, X.; Marshal, J.; Starý, P.; Edwards, O.; Puterka, G. J.; Dolatti, L.; El Bouhssini, M.; Malinga, J.; Lage, J.; Smith, C.; "in press".** Global Phylogenetics of *Diuraphis noxia* (Kurdjumov), an invasive aphid species: evidence for multiple invasion into North America, *Journal of Heredity*.
- Loxdale, H. D.; Lushai, G.; 1998.** Molecular markers in entomology, *Bulletin of Entomological Research*, 88: 577-600
- Manchenko, G. P.; 1994.** Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoretic Gels, *CRC Press, Boca Raton, Florida*
- Martinez-Torres, D.; Moya, A.; Hebert, P. D. N.; Simon, J.-C., 1997.** Geographic distribution and seasonal variation of mitochondrial DNA haplotypes in the aphid *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae), *Bulletin of Entomological Research*, 87: 161-167
- Martinez-Torres, D.; Buades, C.; Latorre, A.; Moya, A.; 2001.** Molecular Systematics of Aphids and Their Primary Endosymbionts, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 20 (3): 437– 449

- Meier, R.; 2008.** DNA Sequences in Taxonomy: Opportunities and Challenges. Pp. 95-128. Book chapter for 'The New Taxonomy' Systematics Association Special Volume edited by Q. Wheeler.
- Moya, A.; Latorre, A.; Sabater-Muñoz , B.; Silva, F. J.; 2002.** Comparative Molecular Evolution of Primary (*Buchnera*) and Secondary Symbionts of Aphids Based on Two Protein-Coding Genes , *Journal of Molecular Evolution*, 55: 127-137
- Mueller, U. G.; LaReesa Wolfenbarger, L.; 1999.** AFLP genotyping and fingerprinting, *TREE, Elsevier Science Ltd.*, 14: 389-394
- Nordborg, M.; Innan, H.; 2002.** Molecular population genetics, *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 69-73
- Partea, M.; Lin, X.; Salzberg, S. L.** GeneSplicer: a new computational method for splice site prediction. *Nucleic Acids Res.* 2001 Mar 1, 29 (5): 1185-90
- Pasteur, N.; Pasteur, G.; Bonhomme, E.; Catalan, J.; Britton-Davidian, J.; 1988.** Practical Isozyme Genetics, *Ellis Horwood Limited, Chichester*, 215 pp
- Payton, T. L.; 2004.** Genetic variation within and between Russian Wheat Aphid, *Diuraphis noxia* (Kurdjumov), biotypes found in the united states, *Diplome Thesis, Horticulture Oklahoma State University Stillwater, Oklahoma*, 51 pp
- Powers, T. O.; Jensen, S. G.; Kindler, S. D.; Stryker, C. J.; Sandall, L. J.; 1989.** Mitochondrial DNA Divergence Among Greenbug (Homoptera: Aphididae) Biotypes, *Entomological Society of America*, 82(3): 298-302
- Puterka, G. J.; Black, W. C.; Steiner, W. M.; Burton, R. L.; 1993.** Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers, *Heredity*, 70: 604-618
- Rozas, J.; Rozas, R.; 1999** DnaSP version 3: an integrated program for molekular analysis, *Bioinformatics*, 15: 174-175
- Ritzengruber, O.; Führer, E.; 1986.** Isoenzymanalyse verschiedener Populationen von *Pityogenes chalkographus* L. (Coleoptera: Scolytidae), *Z. Ang. Entomol.*, 101: 187-194
- Shufran, K. A.; Burd, J. D.; Anstead, J. A.; Lushai, G.; 2000.** Mitochondrial DNA sequence, divergence among greenbug (*Homoptera: Aphididae*) biotypes: evidence for host-adapted races *Insect Molecular Biology*, 9 (2): 179-184
- Shufran, K. A.; Kiekman, L. R.; Puterka, G. J.; 2007.** Absence of Mitochondrial DNA Sequence

- variation in RWA (*Hemiptera: Aphididae*) populations consistent with a single introduction into the United States, *Journal of the Kansas entomological society* 80 (4): 319-320
- Shufran, K. A.; Payton, T. L.; 2009.** Limited genetic variation within and between RWA (*Hemiptera:Aphididae*) biotypes in the US, *Journal of Economic entomology*, 102(1): 440-445
- Simon, J. -C.; Carré, S.; Boutin, M.; Brunier-Leterme, M.; Sabater- Muñoz, 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 B*, 270: 1703-1712
- Selkoe, K. A. and Toonen, R. J.; 2006.** Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite marers, *Ecology Letters*, 9: 615-629
- Starý, P.; Basky, Z.; Tanigoshi, L. K.; Tomanovicć, Z.; 2003.** Distribution and history of Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Kurdj.) in the Carpathian Basin (Hom., Aphididae), *Anzier für Schädlingskunde Journal of Pest Science*, 76: 17-21
- Stauffer, C.; Leitinger, R.; Simsek, Z.; Schreiber, J. D. Führer, E.; 1992.** Allozyme variation among nine Austrian *Ips typographus* L. (Co.. Scolytidae) populations, *Journal of Applied Entomology*, 114: 17-25
- Steiner, W. W. M.; Joslyn, J.; 1979.** Electrophoretic techniques for the genetic study of mosquitoes, *Mosquito News*, 39: 35-54
- Sunnuck, P.; 2000.** Efficient genetic markers for population biology , *TREE, Elsevier Science Ltd.*, 15: 199-203
- 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
- Thao, M. L.; Baumann, L.; Baumann, P.; Moran, N.; 1998.** Endosymbionts (*Buchnera*) from the Aphids *Schizaphis graminum* and *Diuraphis noxia* Have Different Copy Numbers of the Plasmid Containing the Leucine Biosynthetic Genes , *Current Microbiology*, 36: 238–240
- Tomiuk, J.; Wöhrmann, K.; 1980.** Enzyme Variability in Populations of Aphids, *Theoretical and Applied Genetics*, 57: 125-127
- Turak, E.; Hales, D. F.; 1994.** An Allozyme Method for Identifying Individual Aphids of Morphologically Similar Taxa (*Hemiptera: Aphididae*), *Journal of the Australian Entomological Society*, 33: 57-59

- van Emden, H. F.; Harrington, R.; 2007.** Aphids as Crop Pests, *CAB International, Oxford*, 699 pp
- van Ham, R. C. H. J.; Martinez-Torres, D.; Moya, A.; Latorre, A.; 1999.** Plasmid-Encoded Anthranilate Synthase (TrpEG) in *Buchnera aphidicola* from Aphids of the Family Pemphigidae, *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (1): 117-125
- Verrelli, B. C.; Eanes, W. F.; 2000.** Extensive Amino Acid Polymorphism at the Pgm Locus Is Consistent With Adaptive Protein Evolution in *Drosophila melanogaster*, *Genetics*, 156: 1737-1752
- Ward, P. I.; Jann, P.; Blackenhorn, U.; 2004.** Temperature-mediated seasonal variation in phosphoglucomutase allozyme frequency in the yellow dung fly, *Scathophaga stercoraria*, *Molecular Ecology*, 13: 3213–3218
- Weiland, A. A.; Peairs, F. B.; Randolph, T. L.; Rudolph, J. B.; Haley, S. D.; Puterka, G. J.; 2008.** Biotypic Diversity in Colorado Russian Wheat Aphid (*Hemiptera: Aphididae*) Populations, *Journal of Economic Entomology*, 101(2): 569-574
- Weng, Y.; Azhaguvel, P.; Michaels, G. J.; Rudd, J. C.; 2007.** Cross-species transferability of microsatellite markers from six aphid (*Hemiptera: Aphididae*) species and their use for evaluating biotypic diversity in two cereal aphids, *Insect Molecular Biology*, 16 (5): 613-622
- Wilson, A. C. C.; Massonnet, B.; Simon, J.-C.; Prunier-Leterme, N.; Dolatti, L.; Llewellyn, K. S.; Figueroa, Ch. C.; Ramirez, C. C.; Blackman, R. B.; Estoup, A.; Sunnucks, P.; 2004.** Cross-species amplification of microsatellite loci in aphids: assessment and application, *Molecular Ecology Notes*, 4: 104-109
- Zhang, D.-X.; Hewitt, G. M.; 2003.** Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects, *Molecular Ecology*, 12: 563-584

## 10 Přílohy

### Příloha 1: Barvicí protokoly pro použité alozymy (množství pro obarvení jednoho gelu)

#### PGI – fosfoglukoizomeráza

##### *Barvicí roztok*

0,2 M Tris – Cl pufr (pH 7,0)	12,5 ml
D-fruktóza-6-fosfát	10 mg
0,5 M MgCl <sub>2</sub>	1,25 ml
G6PDH (NAD-dependentní forma)	3,5 µl (40 U)
1% NAD	0,5 ml
1% MTT	0,25 ml
1% PMS	0,25 ml

1) Gel inkubovat v digestoři zahřáté na 37°C, dokud se nevytvoří dobře rozeznatelné proužky

2) Slít barvicí roztok a umístit gel na 10 min do fixačního roztoku

3) Slít fixační roztok a umístit gel do 10% roztoku kyseliny octové

#### PGM – fosfoglukomutáza

##### *Barvicí roztok*

dH <sub>2</sub> O	5 ml
TrisA	5 ml
0,5 M MgCl <sub>2</sub>	0,5 ml
Glukóza-1-fosfát	75 mg
G6PDH (NAD-dependentní forma)	3 µl (17 U)
1% NAD	0,5 ml
1% MTT	0,25 ml
1% PMS	0,25 ml

Dále stejný postup jako u PGI

### MDH – malátdehydrogenáza

#### *Barvicí roztok*

TrisA	8,75 ml
2 M kyselina jablečná (pH 7,0)	1 ml
0,5 M MgCl <sub>2</sub>	0,075 ml
1% NAD	0,5 ml
1% MTT	0,25 ml
1% PMS	0,125 ml

Dále stejný postup jako u PGI

### HK – hexokináza

#### *Barvicí roztok*

0,2 M Tris – Hcl (pH 8,0)	12,5 ml
0,5 M MgCl <sub>2</sub>	0,25 ml
ATP	0,0625 g
D(+) - glukóza	1,25 g
G6PDH (NAD-dependentní forma)	3 µl (17 U)
1% NAD	0,5 ml
1% MTT	0,25 ml
1% PMS	0,125 ml

Dále jako u PGI

### GK – glukokináza

#### *Barvicí protokol*

TrisA	10 ml
ATP	20 mg
α – glukóza	50 mg
0,5 M MgCl <sub>2</sub>	1 ml
G6PDH (NAD-dependentní forma)	3 µl (17 U)
1% NAD	1 ml
1% NADP	0,5 ml
1% MTT	1 ml

1% PMS	0,5 ml
dH <sub>2</sub> O	10 ml
Dále stejně jako u PGI	

### 6-PGDH – 6 – fosfoglukonát dehydrogenáza

#### *Barvicí protokol*

0,1 M Tris – Hcl (pH 8,0)	2 ml
6-PGDH	5 µg
0,5% MgCl <sub>2</sub>	0,1 ml
1% NADP	0,1 ml
1% MTT	0,1 ml
1% PMS	0,1 ml

Dále stejně jako u PGI

### EST – esteráza

- 1) Inkubace v 50 ml fosfátového pufru (14,1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> v 50 ml objemu, pH 7,0)
- 2) Přidat 0,5 g Fast Blue RR do 1,5 ml substrátového pufru (1 g 2-naftylacetátu, 50 ml acetonu a 50 ml H<sub>2</sub>O)
- 3) Smíchat substrátový pufr s Fast Blue RR se 45 ml fosfátového pufru a gel inkubujte 15 minut v 37°C

## Příloha 2: Vzorčky použité při extrakci

Číslo Vzorčku	Země a oblast sběru	Datum	Hostitelská rostlina		Způsob Uchování
			Rod	Druh	
1	France, Montpellier	12.2.2008	Hordeum	vulgare	Etanol
2	Tunisia, Nfidha	22.4.2008	Hordeum	vulgare	Etanol
3	Tunisia, Sousse, Kondar	9.4.2008	Hordeum	vulgare	Etanol
4	Tunisia, Hergla	21.4.2008	Triticum	aestivum	Etanol
5	Tunisia, Hergla	21.4.2008	Lolium	perenne	Etanol
6	Egypt, El-Sheikh Zweid, North Sinai	19.4.2008	Hordeum	vulgare	Etanol
7	Egypt, El-Sheikh Zweid, North Sinai	5.4.2008	Hordeum	vulgare	Etanol
8	Egypt, Rafah, North Sinai	20.3.2008	Hordeum	vulgare	Etanol
9	Iran, Kerman, Kerman Province	20.4.2008	Triticum	aestivum	Etanol
10	Iran, Birjand, South Khorasan Province	20.5.2008	Triticum	aestivum	Etanol
11	Iran, Birjand, Bojd Plain, South Khorasan Province	21.5.2008	Triticum	aestivum	Etanol
12	Turkey, Sarezönü-Konya	26.6.2008	Triticum	aestivum	Etanol
13	Turkey, Campus-Konya, Selguklu	26.6.2008	Triticum	aestivum	Etanol
14	Turkey, Karataz-Konya, Bahri Dagdas 1, Agronomy Parcel	27.6.2008	Triticum	aestivum	Etanol
15	Turkey, Karataz-Konya, Bahri Dagdas 2, Agronomy Parcel	27.6.2008	Triticum	aestivum	Etanol
16	Turkey, Karataz-Konya, Bahri Dagdas 3, Agronomy Parcel	27.6.2008	Triticum	aestivum	Etanol
17	Turkey, Gumra-Konya01	2.7.2008	Triticum	aestivum	Etanol
18	Turkey, Gumra-Konya02	2.7.2008	Triticum	aestivum	Etanol
19	Turkey, Gumra-Konya03	2.7.2008	Triticum	aestivum	Etanol
20	Turkey, Meram-Konya	10.7.2008	Triticum	aestivum	Etanol
21	Turkey, Beysehir 01-Konya	12.7.2008	Triticum	aestivum	Etanol
22	Turkey, Beysehir 02-Konya	12.7.2008	Triticum	aestivum	Etanol
23	Tunisia, Ain Kercha (Oum El Bouaghi Dept.)	17.4.2008	Hordeum	vulgare	Etanol
24	Tunisia, Ain Djasser (Batna Dept.)	21.4.2008	Hordeum	vulgare	Etanol
25	Tunisia, Kais (Khenchela Dept.)	9.5.2008	Hordeum	vulgare	Etanol
26	Tunisia, Khorub (Constantine Dept-)	12.5.2008	Triticum	durum	Etanol
27	Tunisia, Hemla (Batna Dept.)	14.5.2008	Triticum	durum	Etanol
28	Tunisia, Ain Djasser (Batna Dept.)	15.5.2008	Triticum	durum	Etanol
29	Tunisia, T'zouket (Batna Dept.)	23.5.2008	Triticum	durum	Etanol
30	Tunisia, Bouhmar (Batna Dept.)	23.5.2008	Triticum	durum	Etanol
31	USA, Couny line - Juniper Canyon, Blicketon WA	24.6.2008	Triticum	aestivum	Etanol
32	USA, Turpint Ridge Rd., Blicketon WA Benton Co.	24.6.2008	Triticum	aestivum	Etanol
33	USA, Pear Ac. IAREC, Prosser, WA, Benton Co.	24.6.2008	Triticum	aestivum	Etanol
34	USA, Headquarter Unit IAREC Field H-21, Prosser, WA	24.6.2008	Hordeum	vulgare	Etanol
35	Moldova, SE, Reyina district, Ciniseuti	11.7.2009	Triticum	vulgare	Etanol
36	Czech Republic, Hodonice, Moravia meridionalis	1.7.2008	Hordeum	vulgare	Etanol
37	Czech Republic, Hrádek, Moravia meridionalis	1.7.2008	Hordeum	vulgare	Etanol
38	Czech Republic, Litobratřice, Moravia meridionalis	1.7.2008	Hordeum	vulgare	Etanol
39	Czech Republic, Bzstřice p. Hostýnem, Moravia Meridionalis	16.7.2008	Hordeum	vulgare	Etanol
40	Czech Republic, Třebíč, Bohemia south	16.7.2008	Hordeum	vulgare	Etanol
41	Chile, Chillian	xx.2.2008	Triticum	aestivum	Etanol
42	Hungary, Budapest	xx.2.2008	Triticum	aestivum	Etanol
43	Spain, Algvare, Leida Distr.	30.4.2008	Hordeum	vulgare	Etanol
44	Spain, Saltř, Girona	7.5.2008	Hordeum	vulgare	Etanol
45	Spain, Vencilló	6.5.2008	Hordeum	vulgare	Etanol
46	Spain, Santa Maria del Camí (Barcelona Distr.)	14.5.2008	Hordeum	vulgare	Etanol
47	Spain, La Pobla de Cérvoles (Lleida Distr.)	16.5.2008	Hordeum	vulgare	Etanol
48	Spain, Cubells (Lleida Distr.)	4.6.2008	Hordeum	vulgare	Etanol
49	Spain, Calaf (Barcelona Distr.)	4.6.2008	Hordeum	vulgare	Etanol



### Příloha 3: Variabilita mezi populacemi (Zeleně směřované odchylky)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1		0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0	0,003	0,001	0,004	0,004	0,004	0,004	0,005
2	0,000		0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,005	0,000	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
3	0,002	0,000		0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0	0	0,001	0,004	0,004	0	0,004	0,005
4	0,000	0,003	0,002		0,001	0,001	0,001	0,001	0,003	0,001	0	0,003	0,002	0,004	0,004	0,004	0,004	0,006
5	0,000	0,000	0,000	0,002		0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0	0,003	0	0	0	0,004	0,004	0,01
6	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000		0,000	0,000	0,002	0,000	0	0,003	0,001	0,004	0,004	0,004	0,004	0,005
7	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000		0,000	0,002	0,000	0	0,003	0,001	0,004	0,004	0,004	0,004	0,005
8	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000		0,002	0,000	0	0,003	0,001	0,004	0,004	0,004	0,004	0,005
9	0,005	0,000	0,005	0,01	0,005	0,005	0,005	0,005		0,002	0,003	0,004	0,001	0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
10	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005		0	0,003	0,001	0,004	0,004	0,004	0,004	0,005
11	0,002	0,003	0,002	0,004	0,002	0,002	0,002	0,002	0,007	0,002		0,003	0,002	0,004	0,004	0,004	0,004	0,006
12	0,008	0,015	0,008	0,007	0,009	0,009	0,009	0,009	0,014	0,009	0,008		0,004	0,005	0,005	0,005	0,005	0,008
13	0,001	0,000	0,001	0,004	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,004	0,013		0,005	0,005	0,005	0,005	0,005
14	0,017	0,016	0,017	0,019	0,017	0,017	0,017	0,017	0,022	0,017	0,019	0,026	0,018		0,000	0,000	0,000	0,000
15	0,017	0,016	0,017	0,019	0,017	0,017	0,017	0,017	0,022	0,017	0,019	0,026	0,018	0,000		0,000	0,000	0,000
16	0,017	0,016	0,017	0,019	0,017	0,017	0,017	0,017	0,022	0,017	0,019	0,026	0,018	0,000	0,000		0,000	0,000
17	0,017	0,016	0,017	0,019	0,017	0,017	0,017	0,017	0,022	0,017	0,019	0,026	0,018	0,000	0,000	0,000		0,000
18	0,012	0,012	0,012	0,016	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,012	0,016	0,030	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	

### Příloha 4: Nukleotidové složení a poměry nukleotidů AT ku GC v jednotlivých populacích

	Frekvence nukleotidů (%)				Poměry nukleotidů AT/GC
	T	A	G	C	
Tur1	34,5	40,5	14,4	10,6	75/25
Tur2	34,2	38,4	15,3	12	72,6/27,3
Tur3	34,5	40,5	14,4	10,6	75/25
Tunis2	34,6	40,4	14,4	10,6	75/25
Tunis3	34,5	40,5	14,3	10,6	75/24,9
USA1	34,6	40,4	14,4	10,6	75/25
USA2	34,6	40,4	14,4	10,6	75/25
USA3	34,6	40,3	14,5	10,6	74,9/25,1
Sp1	33,3	40,1	15,5	11,1	73,4/26,6
Sp2	34,6	40,4	14,4	10,6	75/25
Tur4	34,4	40,7	14,4	10,6	75,1/25
Sp3	34,7	40,5	14,2	10,6	75,2/24,8
Sp4	34,5	40,2	14,5	10,7	74,7/25,2
Mold	34,7	40,4	14,7	10,3	75,1/25
CZ1	34,7	40,4	14,7	10,3	75,1/25
CZ2	34,7	40,4	14,7	10,3	75,1/25
CZ3	34,7	40,4	14,7	10,3	75,1/25
Tunis1	34,7	40,4	16,3	12	75,1/28,3
<b>Průměr</b>	<b>34,5</b>	<b>40,2</b>	<b>14,6</b>	<b>10,7</b>	<b>74,7/25,3</b>