

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky



# **Fylogeografie a genetická variabilita** ***Diuraphis noxia* (Aphididae)**

Diplomová práce

**Bc. Jiří Pašíkovský**

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

České Budějovice  
2011

## Magisterská práce

Pařík J., 2011: Fylogeografie a genetická variabilita *Diuraphis noxia* (Aphididae). [Fylogeography and genetics variability of *Diuraphis noxia* (Aphididae)., Mgr. Thesis, in Czech]-48p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### Annotation

The aim of this work was a research of the genetic variability of natural populations of Russian wheat aphid *Diuraphis noxia* (Aphididae) by means of microsatellite markers and markers for EPIC-PCR. First goal was to introduce the methods and optimise them for *Diuraphis noxia*. In the follow-up pilot study, specimens from 47 lines representing 12 populations from all over the world were analysed. Having used microsatellite markers, I proved expected variability among individual populations and within them. The highest genetic variability was detected between Chile and Algeria using markers for cytochrome C in EPIC-PCR. These findings can be used for further studies of the genetic variability of the aphid *Diuraphis noxia*.

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

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

## **Poděkování**

Chtěl bych poděkovat své školitelce PaedDr. Martině Žurovcové, PhD. za odborné vedení, dohled, rady, trpělivost a poskytnutí literatury. Dále děkuji Ing. Janu Havelkovi, PhD. za dodání studovaného materiálu. Také Mgr. Lucii Kučerové za její pomoc při statistických analýzách a v neposlední řadě patří velký dík Daniele Chundelové, Anně Sattranové a Andree Jarošové za pomoc při vykonávání laboratorní práce a vytvoření přátelské atmosféry. Poděkování patří také mojí rodině a přátelům, kteří mi byli oporou po celou dobu studia.

## Obsah

1. Seznam zkratk	1
2. Cíl práce	2
3. Úvod	3
3.1. Biologie a rozšíření mšice <i>Diuraphis noxia</i>	3
3.2. Hospodářský význam a studium genetické struktury populací	6
3.3. Molekulární markery	7
3.3.1. Mikrosatelity	7
3.3.2. EPIC-PCR (Exon-primed intron.crossing)	9
4. Materiál a metody	10
4.1. Materiál	10
4.2. Mikrosatelity	10
4.2.1. Extrakce DNA	10
4.2.1.1. Izolace pomocí kitu DNeasy Blood and Tissue	10
4.2.1.2. Izolace pomocí „Squishing Buffer“ (SB)	11
4.2.1.3. Izolace pomocí Invisorb Spin Tissue Mini Kit	11
4.2.2. PCR pro mikrosatelitní DNA	12
4.3. Gelová elektroforéza	13
4.3.1. Agarózový gel	13
4.3.2. Vertikální polyakrylamidová elektroforéza	15
4.3.2.1. Denaturing Urea-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) Based Microsatellite Analysis	15
4.3.2.2. Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis	16
4.4 EPIC-PCR	18
4.4.1. Izolace RNA	18
4.4.2. Reverzní transkripce	18
4.4.3. Použité primery pro EPIC-PCR a amplifikační profily	19
4.5. Reakční směsi pro PCR	21
4.6. Purifikace PCR produktu a klonování	21
4.6.1. Přečišťování pomocí směsi ExoSap-IT	21
4.6.2. Klonování	21
4.6.2.1. Ligace	21
4.6.2.2. Transformace bakterií	22
4.7. Sekvenační reakce	23
4.8. Statistická analýza	23
4.8.1. Analýza mikrosatelitů	23
4.8.2. Analýza EPIC-PCR	24
5. Výsledky	25
5.1. Testované markery	25
5.2. Mikrosatelity	25
5.3 EPIC-PCR	29
6. Diskuze	33
6.1. Extrakce DNA	33
6.2. Purifikace produktů sekvenační reakce	33

6.3. Testování markerů pro mikrosatelitní lokusy .....	33
6.4. Testování markerů pro EPIC-PCR .....	36
7. Závěr .....	37
8. Literatura .....	38
9. Přílohy .....	44

## 1. Seznam zkratek

DNA	-	deoxyribonukleová kyselina
mtDNA	-	mitochondriální DNA
AFLP	-	Amplified Fragment Length Polymorphism
ITS	-	Internal Transcribed Spacer
EF $\alpha$	-	elongační faktor $\alpha$
kbp	-	kilo base pair
tRNA	-	transferová ribonukleová kyselina
rRNA	-	ribozomální ribonukleová kyselina
mRNA	-	messenger RNA
totRNA	-	total RNA
CO	-	cytochrom oxidáza
ATP	-	adenosintrifosfát
Cyt B	-	cytochrom B
SSR	-	simple sequence repeats
VNTR	-	variable number tandem repeats
STR	-	short tandem repeats
PCR	-	polymerázová řetězová reakce
EPIC	-	exon-primed intron-crossing
Rh	-	relative humidity
$\mu$ l	-	mikrolitr
ml	-	mililitr
mg	-	miligram
mM	-	milimolární
BSA	-	bovine serum albumin
EDTA	-	kyselina ethylendiamintetraoctová
PAGE	-	polyakrilamidová gelová elektroforéza
dNTPs	-	deoxynukleotid trifosfát
ddH <sub>2</sub> O	-	double distilled water
UV	-	ultraviolet
X-gal	-	5-Bromo-4-chloro-3-indolyn-D-galaktozid
IPTG	-	Izopropyl-thio-D-galaktozid
APS	-	ammonium persulphate
cDNA	-	„complementary“ DNA
gDNA	-	genomová DNA
rpm	-	otáčky za minutu

## 2. Cíl práce

- Zavést metodu mikrosatelitních markerů a s jejich pomocí analyzovat genetickou variabilitu populací *Diuraphis noxia* (Aphididae) a určit fylogeografii tohoto druhu
- Otestovat vhodnost markeru EPIC-PCR pro uvedený druh *Diuraphis noxia* (Aphididae)

### 3. Úvod

#### 3.1. Biologie a rozšíření mšice *Diuraphis noxia*

Čeľad' Aphididae (mšicovití), jedna ze tří čeledí Aphidoidea, je v rámci řádu Hemiptera monofyletická a je příbuzná čeledím Adelgidae a Phylloxeridae, přičemž vzájemné vztahy mezi těmito třemi čeleděmi nejsou zatím zcela vyjasněné. Je to starobylá skupina, jejíž společný předek se vyskytoval přibližně před 250 miliony let. Jednotlivé podřády a čeledi se pravděpodobně začaly oddělovat v období jury před 150 miliony let (Martinez-Torres et al., 2001).

Na celém světě se vyskytuje kolem 4700 druhů Aphididae (mšicovitých) a zhruba 450 druhů se nachází na rostlinách, ale jen asi 100 druhů je úspěšně rozšířeno do zemědělského prostředí, kde mají zásadní ekonomický význam (Martinez-Torres et al., 2001). Zástupci čeledi mšicovití jsou celosvětově rozšířenými škůdci rostlin a jejich výskyt je vázán na rozšíření hostitele (Franzen et al., 2008).

Mšice mají mutualistický vztah s endosymbiotickými bakteriemi, které žijí ve specializovaných buňkách, bakteriocytech. Primárním endosymbiontem jsou bakterie druhu *Buchnera sp.* z čeledi Enterobacteriaceae (Martinez-Torres et al., 2001). Tyto bakterie dodávají mšicím potřebné esenciální aminokyseliny.

Mšice zhoubná (*Diuraphis noxia*, Kurdjumov) je řazena do řádu stejnokřídlí (Homiptera), čeledi mšicovití (Aphididae). Jedná se o významného škůdce pšenice (*Triticum aestivum*) a ječmene (*Hordeum vulgare*) (Ennahli et al., 2009), ale také planě rostoucích rostlin, které mohou poskytovat *Diuraphis noxia* biotypovou a genetickou diverzitu (Weiland et al., 2008). Van Emdea a Harrington (2007) uvádí, že první zmínka o *Diuraphis noxia* je datována již roku 1914 v ruské literatuře. Možná proto se také označuje jako „Russian wheat aphid“, tedy ruská mšice pšeničná.

Mšice zhoubná (*Diuraphis noxia*) má měkké žlutozelené vřetenovité tělo s voskovitým povrchem a její délka se pohybuje od 1,5 do 2,5 mm. Je to herbivorní hmyz s bodavě savým ústním ústrojím, které poškozují rostlinu sáním tekutin z rostlinných pletiv. Při přijímání potravy dochází k vylučování slin obsahujících enzymy, které způsobují poškození rostliny. Zároveň může při napadení rostliny docházet k přenosu virových a jiných chorob. Tyto choroby způsobují typické bílé či žluté pruhy na listech a také svinování listů do ruliček, které tak mšicím poskytují nepřímou ochranu před insekticidy, ale také před přirozenými predátory (Payton, 2004). V poškozených pletivech dochází k redukci chlorofylu a, b a karotenoidů, což vede k poklesu fotosyntézy (Franzen et al., 2008).



Aphididae, tedy i *Diuraphis noxia*, mají složitý způsob rozmnožování. Vyskytuje se zde jak holocyklický tak i anholocyklický způsob života (Hales et al., 1997).

Úplný cyklus (holocyklus) je dvouletý, vyznačuje se střídáním dvou hostitelů (pšenice x ječmen). Tento způsob rozmnožování se uplatňuje především v chladných podmínkách (van Emdena a Harringtona, 2007).

Neúplný cyklus (anholocyklus) je pouze jednoletý a samice zůstávají na jednom hostiteli. První pohlavní generace klade na podzim oplozená vajíčka, ze kterých se líhnou neokřídlené samice, které se rozmnožují nepohlavně, pomocí apomiktické partenogeneze. To znamená, že zde neprobíhá meióza, a proto ani genetická rekombinace. Při tomto způsobu rozmnožování dávají živorodé samice vzniknout dalším živorodým neokřídleným samicím (klonům). Tyto klony jsou geneticky identické, ale mohou se zde vyskytovat odlišné fenotypy. Vzniklé klony dospějí během 7 – 10 dnů a začnou produkovat vlastní potomstvo. Každá partenogenetická samice v embryonálním stádiu již obsahuje svojí vlastní dceru ještě před tím, než se narodí. Toto „teleskopické“ množení vede k rychlému nárůstu mšicí populace. 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 nakladou vajíčka na stonky rostlin (Hales et al., 1997).

Mohou vznikat jak okřídlené (alatae) tak i neokřídlené (apterous) formy v závislosti na okolním prostředí. Při nedostatku prostoru na původní hostitelské rostlině migrují okřídlené samice na jinou hostitelskou rostlinu a mohou tak pokračovat v rozmnožování (Obr. 1) (Hales et al., 1997).

Rozmnožovací schopnost tohoto hmyzu je obrovská. Během několika dní dokáže zničit až 70% úrody obilí (van Emden a Harrington, 2007).

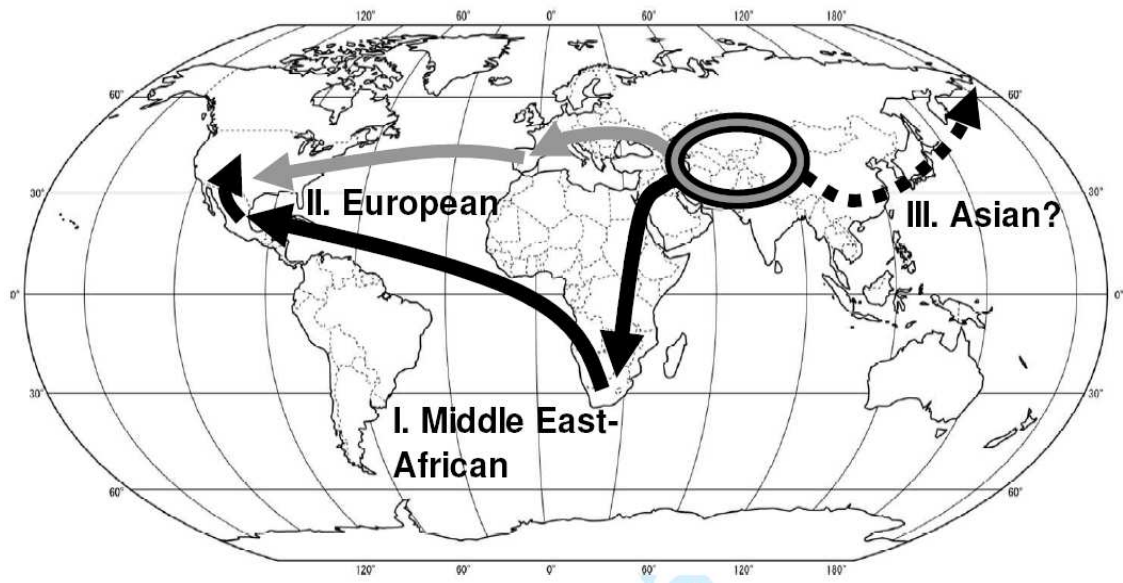
**Obr. 1:** Životní cyklus Aphididae

([http://nucleodecenio.blogspot.com/2007\\_09\\_01\\_archive.html](http://nucleodecenio.blogspot.com/2007_09_01_archive.html))



Původní výskyt mšice zhoubné (*Diuraphis noxia*) je v oblasti Afganistanu, Iránu a v zemích okolo Středoziemního moře. Koncem 70. let 20. století se začal tento škůdce šířit do severní a následně i do jižní Afriky a také Evropy. Začátkem 80. let 20. byla objevena na území Mexika (Gilchrist et al., 1984) a o šest let později se rozšířila do celé Severní a Jižní Ameriky (van Emden a Harrington, 2007). V České republice se *Diuraphis noxia* poprvé objevila na ječmeni zhruba před 15 lety (Starý et al., 2003). V dnešní době se vyskytuje po celém světě s výjimkou Austrálie.

**Obr. 2:** Migrace a oblasti výskytu *Diuraphis noxia* podle analýzy AFLP (Liu, X., et al., 2010).



### 3.2. Hospodářský význam a studium genetické struktury populací

Mšice jsou velmi významnými škůdci hospodářských plodin. Mohou poškozovat rostlinná pletiva, způsobovat odumírání rostlin a jsou významnými přenašeči nejružnějších rostlinných virů. Samotná *Diuraphis noxia* je spojována s přenosem viru žluté zakrslosti ječmene (Kiplagat, 2005). Proto je velmi důležité se výzkumem mšic zabývat.

Abychom mohli proti škůdcům účinně bojovat, musíme správně určit jeho druh. Mšice vykazují v rámci druhů obrovskou morfologickou plasticitu. Morfologické znaky umožňují identifikaci pouze u dospělých jedinců (Footitt a kol., 2008), a proto se jako nejvhodnější pro studium druhu jeví použití molekulárních markerů. Ty jsou schopny určit přesně druh jakéhokoliv organismu, ze kterého můžeme extrahovat DNA. Molekulární markery jsou hlavním nástrojem populační genetiky, která je důležitým prostředkem pro studium genetické struktury živých populací. (Footitt et al., 2008; Hales, 1997; Nordborg a Innan, 2002).

Dosavadní studie poukazují na použití několika markerů, jako jsou markery pro mtDNA, mikrosatelity či AFLP.

Shufrán et al. v roce 2007 nenalezli variabilitu u *Diuraphis noxia* na základě zkoumání oblasti COI u populací z USA, Mexika, Kanady, Francie, Turecka a jižní Afriky. Totéž

potvrdili i další studie z populací z Etiopie, České republiky, jižní Afriky, Turecka, Sýrie a pěti biotypů z USA (RWA 1 – RWA 5), kterými se zabývali Shufrán a Payton v roce 2009.

Dolatti et al. v roce 2005 studovali přírodní populace *Diuraphis noxia* v Íránu analýzou mikrosatelitů. Z 376 jedinců izolovali 50 genotypů a odhalili velký nedostatek heterozygotů. Objevili mnoho vzácných genotypů. To poukazuje na to, že *Diuraphis 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 tuhé zimy a tedy pravděpodobná přítomnost cyklické partenogeneze.

Výzkum zabývající se markery pro AFLP provedli (Liu, X. et al., 2010), kteří zkoumali populace *Diuraphis noxia* z celého světa. Pomocí metody AFLP-PCR podpořili teorii dvou invazí do USA (viz Obr. 1).

Ve své diplomové práci jsem studoval populace *Diuraphis noxia* z nejrůznějších částí světa. Testoval jsem genetickou variabilitu pomocí genetických markerů - mikrosatelitů vykazujících vysoký stupeň polymorfismu. Mikrosatelitní markery se jeví jako nejvariabilnější markery vůbec. Vykazují vnitrodruhovou variabilitu téměř u všech druhů.

Dále jsem se pokoušel o zavedení nové metody, která nebyla doposud použita při výzkumu Aphididae, tedy i *Diuraphis noxia*, a to metodu EPIC-PCR.

### **3.3. Molekulární markery**

Molekulární markery jsou silný nástroj, který usnadňuje studie v různých oblastech biologie, jak v teoretické tak aplikované biologii, vysvětlující otázky fylogeneze, evoluce, ekologie a populační dynamiky (Loxdale a Lushai, 1998).

#### **3.3.1. Mikrosatelity**

Mikrosatelity jsou tandemově se opakující sekvence nukleotidů o velikosti 1-6 bp, které se ve velké frekvenci vyskytují v jaderné i organelové DNA. Jsou známy jako SSR (simple sequences repeats), VNTR (variable number tandem repeats) nebo STR (short tandem repeats) (Ellegren, 2004; Li et al., 2002). Velikost mikrosatelitního lokusu je většinou mezi 5 a 40 opakováními, ale i větší řetězce jsou možné. Pro molekulárně-genetické studie jsou nejvíce využívané dinukleotidové, trinukleotidové a tetranukleotidové repetice.

Dinukleotidové repetice jsou nejběžnější u většiny druhů (Li et al., 2002). Trinukleotidové a hexanukleotidové repetice se nejpravděpodobněji vyskytují v kódující oblasti, protože nezpůsobují tzv. „frameshift“ (posun čtecího rámce) (Toth et al., 2000).

Mononukleotidové repetice jsou méně běžné, protože nastává problém během amplifikace (Li et al., 2002).

DNA obklopující mikrosatelity je označována jako „flanking regions“ (přilehlé oblasti). Sekvence těchto přilehlých oblastí je zpravidla identická u jedinců stejného druhu, ale občas i mezi rozdílnými druhy organismů. Tato přilehlá oblast nám také může pomoci při navrhování primerů pro amplifikaci mikrosatelitů během PCR (polymerase chain reaction) (Kimberly et al., 2006).

Mnoho mikrosatelitů má vysokou mutační rychlost, která se pohybuje mezi  $10^{-2}$  a  $10^{-6}$  mutací na lokus za generaci. Tato mutační rychlost generuje vysokou úroveň alelické diverzity, která je nutná pro genetické studie (Schlötterer, 2000). K velké variabilitě dochází v intronových oblastech díky hromadění mutací při rekombinaci nebo sklouzáváním polymerázy z vláken DNA během replikace (Sunnuck, 2000).

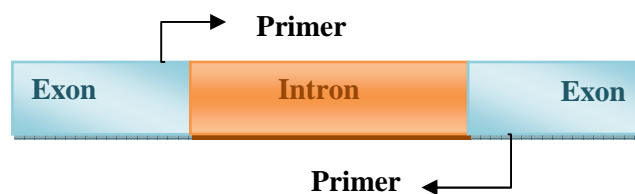
Stále více jsou mikrosatelity využívány ke genovému mapování a populačním studiím (Hammond et al., 1998). Mikrosatelitní marker má výhodu během amplifikace při PCR, protože je lokusově specifický, polymorfní a kodominantní (Loxdale a Lushai, 1998; Sefc et al., 2001; Wilson et al., 2003).

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

### 3.3.2. EPIC-PCR (Exon-primed intron-crossing)

Polymorfismus intronů nám ukazuje značný přínos ve variabilitě a byl úspěšně použit v populačně genetických výzkumech (Corte-Real et al., 1994; Daguin a Borsa, 1999; Lessa, 1992). PCR primery mohou být navrženy z přilehlých exonů, které následně slouží k amplifikacím příslušného intronu (Obr. 3). Proto je tento přístup nazván exon-primed intron-crossing (EPIC)-PCR (Palumbi, 1995).

**Obr. 3: EPIC-PCR, amplifikace intronu pomocí přilehlých exonů.**



EPIC-PCR má několik výhod:

1. Můžeme se vyhnout klonování a sekvenování cílových sekvencí, protože je možno použít primery z heterologního (odlišného) genu (Corte-Real et al., 1994).
2. Mezidruhová amplifikace by měla být jednodušší, než když jsou primery navrhovány v nekódující sekvenci, protože exonová sekvence je mezi druhy více konzervovaná.
3. Pro stejnou reakci uvnitř jednoho druhu jsou s menší frekvencí očekávány PCR artefakty jako např. prázdné alely. (Corte-Real et al., 1994).

## 4. Materiál a metody

Vzorky mšic z přírodních populací byly analyzovány standardním postupem, tj. po DNA extrakci a ověření její kvality proběhla amplifikace vybraných markerů a jejich statistická analýza. Vzhledem k tomu, že původně plánované mikrosatelitní lokusy se nedařilo amplifikovat, rozhodli jsme se provést i otestování vhodnosti dalšího markeru, EPIC-PCR.

### 4.1. Materiál

Vzorky mi poskytl Ing. Jan Havelka, Ph.D. (ENTÚ, Biologické centrum AV ČR), kterému byly zaslány z nejrůznějších vědeckých laboratoří z Evropy, Afriky, Jižní a Severní Ameriky (viz Příloha 1). Vzorky z jedné lokality byly sbírány alespoň 1m od sebe a následně uchovávány v 98% etanolu. V lahvičkách s nasbíranými vzorky byli pouze jedinci téhož klonu.

Dále jsem měl k dispozici mšice z jednoho klonu *Diuraphis noxia* z chovu (jedinci byli sbíráni na Jižní Moravě z ječmene – (*Hordeum vulgare*)). V laboratorních podmínkách byly chovány na pšenici (*Triticum aestivum*) při teplotě 18-20 °C, Rh 70 a 18 hodin světelného dne.

### 4.2. Mikrosatelity

Pro tuto metodu byla nutná extrakce DNA ze vzorků *Diuraphis noxia* a následně bylo provedeno ověření správné izolace DNA ze vzorků za použití úseku z mitochondriálního genu pro cytochrom oxidázu - podjednotka I (COI), kde byly na základě literatury použity standardní primery (LCO1490 a HCO2198) pro „DNA barcoding“ (Folmer et al., 1994).

#### 4.2.1. Extrakce DNA

Vzorky byly před analýzou ponechány několik minut na filtračním papíru při pokojové teplotě, aby se odpařily zbytky etanolu. K analýze bylo použito 3-6 jedinců z jednoho klonu. Veškerá práce byla dělána pomocí sterilních aerosolových špiček. Izolace DNA byla prováděna pomocí několika metod. A to pomocí extrakčního kitu DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN), extrakce pomocí „Squishing Buffer“ (SB) (Gloor et al., 1993) a izolace pomocí Invisorb Spin Tissue mini Kit (INVITEK).

##### 4.2.1.1. Izolace pomocí kitu DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN)

Izolaci jsem provedl dle návodu výrobce se závěrečnou elucí DNA rozdělenou do 2 frakcí (na místo jedné frakce). První o objemu 100 µl, která byla následně ponechána při teplotě 4°C, a druhá frakce o objemu 75 µl (zamražena na -20°C).

#### **4.2.1.2. Izolace pomocí „Squishing Buffer“ (SB) (Gloor et al., 1993)**

Pokud byly použity lihové vzorky, byli jedinci ponecháni 15-20 min ve 20 µl elučního pufru (TE, QIAGEN), který byl před přidáním SB odpipetován. K jedincům uchovávaným v -20°C byl SB přidán bez tohoto mezikroku.

Ke vzorkům v mikrozkuhavce (1,5 ml) bylo mikropipetou přidáno 50 µl SB (10 mM TRIS-Cl, pH 8,2, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl a 200 µg/ml proteinázy K) a pomocí upravené špičky (1000 µl zatavená nad kahanem) byl vzorek v tomto roztoku homogenizován.

Dále byl vzorek inkubován při 37°C 20-30 minut a následně byla provedena inaktivace proteinázy K při 95°C 2 minuty. Na závěr byl vzorek centrifugován 2 minuty při 11 000 rpm. Vyextrahovaná DNA byla rovnou použita pro PCR reakci nebo byla před dalším použitím zmražena na -20°C.

#### **4.2.1.3. Izolace pomocí Invisorb Spin Tissue Mini Kit (Invitek)**

Izolace dělána dle návodu výrobce se závěrečnou elucí DNA rozdělenou do 2 frakcí. První o objemu 100 µl (uchována při 4°C a ihned používána), druhá o objemu 50 µl (uskladněna v mrazicím boxu při teplotě -20°C).



#### 4.2.2. PCR pro mikrosatelitní DNA

Pro amplifikaci mikrosatelitní DNA jsem si na základě literatury vybral následující primery (Tabulka 1) (Dolatti et al., 2005; Shufran a Payton, 2009; Weng et al, 2007).

**Tabulka 1:** Přehled použitých primerů

Lokus	Velikost (bp)	Alely	MSA	Sekvence primeru 5' → 3'
ApEST34	120-1150	4	(TAT) <sub>21</sub>	F: TTGATACGAACACAATGGAA R: CGTGTATTTAGGTTATCGCC
ApEST39	245-365	2	(CATA) <sub>35</sub>	F: TAGATATCGCCCTGCAGTAT R: ATTGATATGCGAGGAAAGAA
SmS16b	166-250	2	(CA) <sub>14</sub>	F: GTAAAAGTAAAGGTTCCACG R: ATAAAACAAAGAGCAATTCC
Sgg2	320-270	2	(CA) <sub>23</sub>	F: GGTATTATCCCCGTAAGT R: GCCCGTATATAGTTAATGTATG ACAT
SmS23	122-156	3	(GA) <sub>14</sub>	F: CGTCGTTGTCATTGTCGTCG R: GGTCCGAGAGCATTATTAGG
Sa4Σ	150-176	4	(AC) <sub>5</sub> TT(AC) <sub>10</sub>	F: GACGTCGATATTAGCCTAGC R: GTGACGTATAACGCGATGCC

Požadovaná amplifikace DNA fragmentů probíhala na přístrojích Bioer XP cycler a Eppendorf Mastercycler. Po skončení PCR byly vzorky zchlazeny na 4°C. PCR profily jsou uvedeny v Tabulce 2.

**Tabulka 2:** PCR profily

	SmS23		SmS16b		Sa4Σ		Sgg2		ApEST34		ApEST39	
	teplota (°C)	doba (s)	teplota (°C)	doba (s)	teplota (°C)	doba (s)	teplota (°C)	doba (s)	teplota (°C)	doba (s)	teplota (°C)	doba (s)
<b>1. predenaturace</b>	94	120	94	180	94	120	94	120	94	120	94	120
<b>2c. denaturace</b>	94	60	94	30	94	30	94	30	94	40	94	40
<b>3c. annealing</b>	53	50	45	30	62	50	57	40	51	50	51	50
<b>4c. elongace</b>	72	60	72	30	72	60	72	60	72	50	72	50
<b>5. postelongace</b>	72	240	72	120	72	240	72	120	72	120	72	120
<b>6. uchovávání</b>	4	∞	4	∞	4	∞	4	∞	4	∞	4	∞
<b>cykly</b>	30		30		35		35		30		30	

### **4.3. Gelová elektroforéza**

Po skončení PCR reakce byla úspěšnost amplifikace DNA fragmentů, velikosti a množství, ověřena pomocí elektroforetické verifikace. Byla prováděna na agarózových a polyakrylamidových gelech.

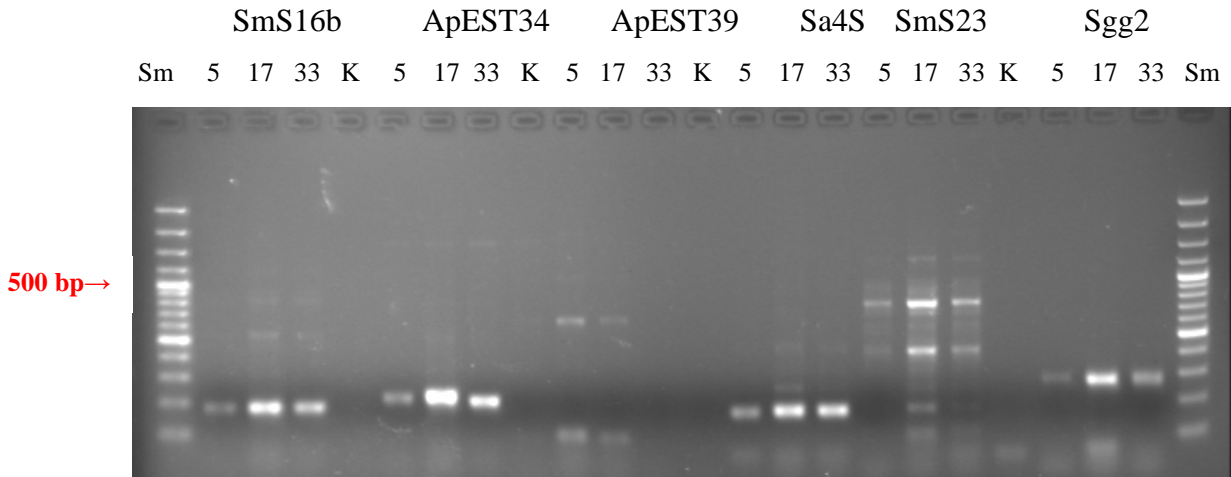
#### **4.3.1. Agarózový gel**

Elektroforetická verifikace byla prováděna na 1,5% gelu. 1,5 g agarózy (SeaKem LE Agarose, Cambrex) bylo rozpuštěno v 98,5 ml 1x TAE pufru (40 mM TRIS-Acetate, pH=8,0, 1 mM EDTA). Poté byla směs rozehřáta v mikrovlnné troubě, a následně ochlazena pod tekoucí vodou na cca 40-50 °C. Do směsi bylo přidáno 10 µl ethidium bromidu o koncentraci 0,5 µg/µl pro zviditelnění amplifikované DNA pod UV světlem. Tento rozpuštěný agarósový gel byl nalit do připravené formy s hřebínky zajišťujícími vznik jamek. Gel byl ponechán ve tmě a tuhnutí trvalo cca 30-40 minut při pokojové teplotě. Hotový gel byl použit rovnou k elektroforéze nebo uchováván v 1x TAE pufru při 4 °C v chladničce.

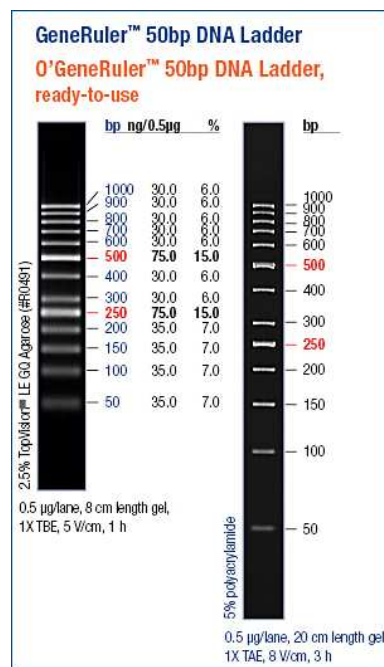
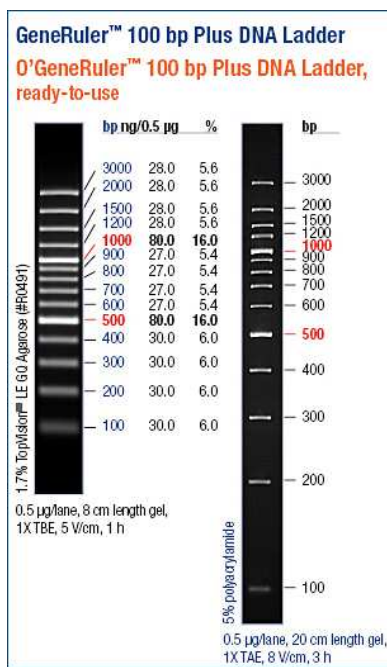
Na gel bylo nanášeno 3-4 µl vzorku smíchaného s 2,5 µl Loading Dye (30% glycerol, 0,05% bromfenolová modř) a elektroforéza běžela při napětí 120 V cca 40 minut. K odhadnutí velikosti a množství naampifikovaného DNA fragmentu byl použit velikostní marker GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, 50-1000 bp a GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, 100-3000 bp (Obr. 5). DNA byla zviditelněna pomocí UV transiluminátoru (UVP Transilluminator) spojeného s digitální kamerou, která nám sloužila k vytištění výsledné fotografie gelu (Obr. 4).

Pro elektroforetickou verifikaci byly dále zkoušeny a použity různé koncentrace agarózových gelu (1%, 1,5%, 2%, 3%). Mezi těmito gely nebyl viděn patrný rozdíl.

**Obr. 4:** Fotografie gelu s úspěšně naamplifikovanými vzorky 5, 17, 33 (*Diuraphis noxia*) za použití primerů SmS16b, ApEST34, ApEST39, Sa4S, SmS23 a Sgg2. Size marker GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, 100-3000 bp. K-negativní kontrola.



**Obr. 5:** GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, 100-3000 bp a GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, 50-1000 bp



### **4.3.2. Vertikální polyakrylamidová elektroforéza (PAGE)**

Pro lepší vyhodnocení PCR produktů jsem použil polyakrylamidový gel. Tento gel nám umožňuje detailnější rozdělení naamplifikovaných DNA fragmentů, kterého jsem nemohl docílit na agarózovém gelu. PAGE byla dělána na přístroji „Cleaver Scientific omniPAGE Maxi, VS20D“. Pro analýzu byly zvoleny dva protokoly na přípravu polyakrylamidového gelu.

#### **4.3.2.1. Denaturing Urea-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) Based Microsatellite Analysis (Sharma, 2009)**

Tento gel se skládá z 14 ml 5x TBE pufr (54 g TRIS, 27,5 g kys. Boritá, 20 ml 0,5 M EDTA, pH=8,3) 9,975 ml 40% zásobního roztoku akrylamidu, 11 ml dH<sub>2</sub>O a 29,4 g močoviny. Tento roztok byl zahříván na 60°C, aby došlo k rozpuštění močoviny.

Před naléváním připraveného roztoku do elektroforézy byl připraven druhý gel tzv. „zátká“, která nám slouží k utěsnění spodního konce skel. „Zátka“ byla připravena z 1,75 ml již zhotoveného roztoku, 17,5 µl 10% APS (10% ammonium persulphate) a 17,5 µl TEMED (Tetramethylethylenediamine). Tento gel rychleji polymerizuje a zabrání tím možnému unikání gelu z elektroforézy.

Dále bylo do roztoku přidáno 350 µl 10% APS a 35 µl TEMED. Pomocí injekční stříkačky (23 ml) byl výsledný roztok nanášen mezi skla. Po nalití byly přidány hřebínky k vytvoření jamek. Gel byl ponechán cca 60 minut polymerizovat. Do elektroforetické aparatury byl nalit 1x TBE pufr. Množství pufru (2-3 l) se odvíjelo na potřebě chlazení celé aparatury.

5 µl PCR produktu a 5 µl 2x Loading Dye (500mM EDTA, 0,005% bromfenolová modř, 95% formamid a ddH<sub>2</sub>O) bylo denaturováno při 95°C a následně nanášeno do připravených jamek. Vertikální elektroforéza běžela při napětí 1-8V/1 cm. Velikost gelu byla 15 cm.

Po rozebrání aparatury byl gel umístěn do barvicí lázně skládající se z 1x TBE a ethidium bromidu o konečné koncentraci 1 mg/ml. Barvení probíhalo cca 15-20 minut. DNA byla zviditelněna pomocí UV transiluminátoru (UVP Transilluminator) spojeného s digitální kamerou.

#### 4.3.2.2. Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Harwood, 2000)

Elektroforetická verifikace probíhala na 5% polyakrylamidovém gelu (15 cm). Tento gel se skládal z 2,5 ml 10x TBE pufr, 8,3 ml 30% zásobního roztoku akrylamidu, 38,8 ml dH<sub>2</sub>O a 350 µl 10% APS.

Před samotným naléváním připraveného roztoku do elektroforézy byl připraven druhý gel tzv. „zátká“, která nám slouží k utěsnění spodního konce skel. „Zátka“ byla připravena z 1,75 ml již zhotoveného roztoku, 17,5 µl 10 % APS a 17,5 µl TEMED. Tento gel rychleji polymerizuje a zabrání tím možnému unikání gelu z elektroforézy.

Dále bylo přidáno 50 µl TEMED, důkladně promícháno a pomocí injekční stříkačky (23 ml) nanášeno mezi skla. Po nalití byly vloženy hřebínky k vytvoření jamek. Gel byl ponechán cca 30 minut polymerizovat.

Do elektroforetické aparatury byl nalit 0,5x TBE pufr. Množství pufru (2-3 l) se odvíjelo na potřebě chlazení celé aparatury.

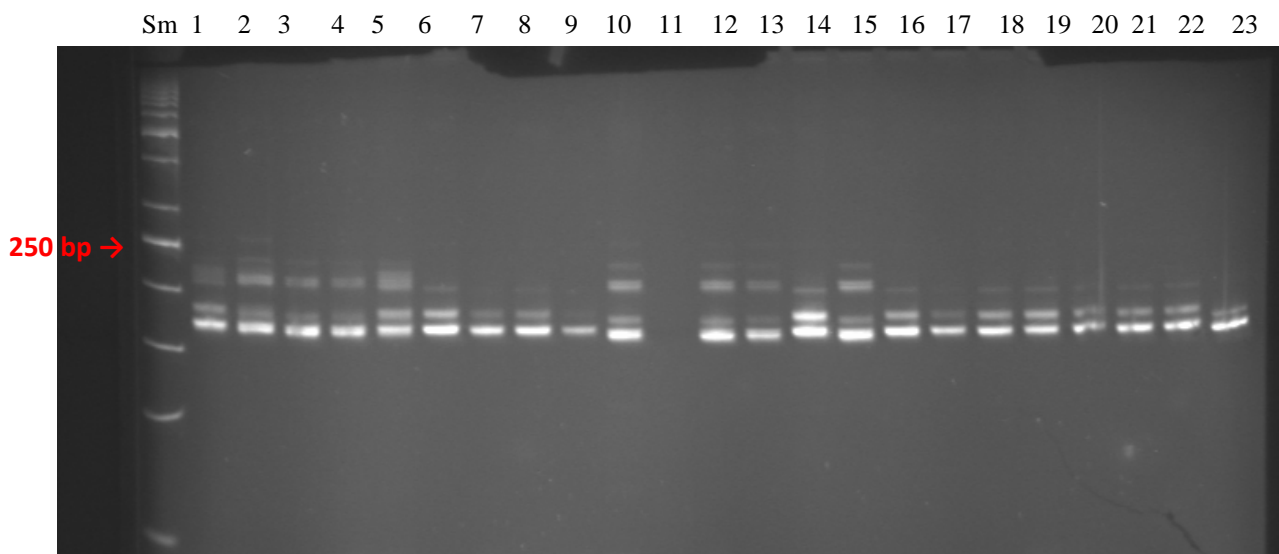
Do připravených jamek bylo napipetováno 6 µl PCR produktu smíchaného s 2 µl 5x sondovacího pufru, který se skládal z 0,15 g Ficollu, 0,85 ml 2,5x TBE a 0,5 mg bromfenolové modři.

Vertikální elektroforéza běžela při napětí 235 V cca 50-70 minut. K odhadnutí velikosti a množství naampifikovaného DNA fragmentu byl použit velikostní marker GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, 50-1000 bp a GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, 100-3000 bp.

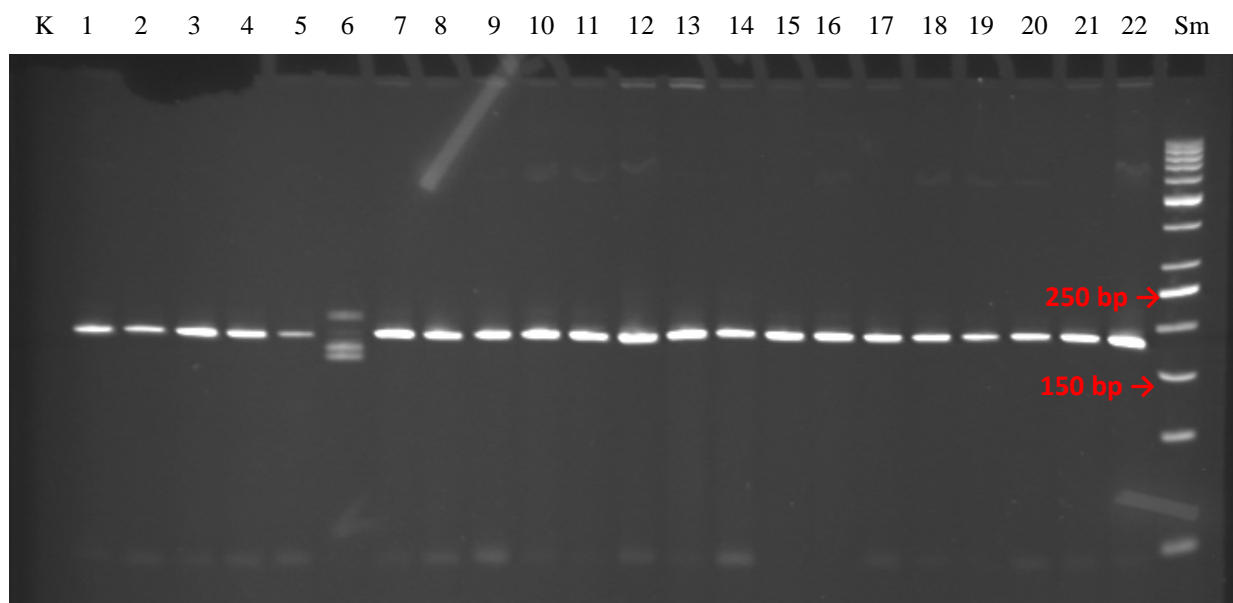
Po rozebrání aparatury byl gel umístěn do barvicí lázně skládající se z 0,5x TBE a ethidium bromidu o konečné koncentraci 1 mg/ml. Barvení probíhalo cca 20-30 minut.

DNA byla zviditelněna pomocí UV transiluminátoru (UVP Transilluminator) spojeného s digitální kamerou, která nám sloužila k vytištění výsledné fotografie gelu (Obr. 6 a 7).

**Obr. 6:** Fotografie polyakrylamidového gelu s úspěšně naamplifikovanými vzorky 1-23 (*Diuraphis noxia*), vzorek 11 se nepodařilo naamplifikovat. Za použití Sa4Σ primeru. Size marker GeneRuler™ 50 bp Plus DNA Ladder, 50-1000 bp.



**Obr. 7:** Fotografie polyakrylamidového gelu s úspěšně naamplifikovanými vzorky 1-22 (*Diuraphis noxia*), vzorek K je kontrola. Za použití SmS16b primeru. Size marker GeneRuler™ 50 bp Plus DNA Ladder, 50-1000 bp.



#### **4.4. EPIC-PCR**

Do této doby nebyla tato metoda použita při studiu mšic. Proto jsem se snažil tuto metodu zavést a následně použít při analýze *Diuraphis noxia*. Byla zde zkoumána variabilita na základě amplifikovaných intronů. Pro zjištění přesné velikosti intronů byla nutná izolace RNA a následný přepis do cDNA. Následně jsem porovnal velikosti PCR produktu mezi gDNA a cDNA a odečetl velikost intronu. cDNA je získána pomocí reverzní transkripce z mRNA, tudíž neobsahuje introny. Na agarózovém gelu vykazuje menší fragment oproti gDNA, která introny obsahuje (viz Obr. 8). Výsledná amplifikace byla ověřena na agarózovém gelu.

##### **4.4.1. Izolace RNA (RNA Blue, Top-Bio s.r.o.)**

RNA Blue je reagens schopná rychle izolovat nedegradovanou a čistou RNA.

totRNA (celková RNA) byla izolována z klonů *Diuraphis noxia* z chovu pomocí RNA Blue (Top-Bio s.r.o.) dle návodu výrobce s následujícími změnami.

Homogenizace byla prováděna v keramické misce, která byla předem vypálena (6h, 190°C), za pomoci tekutého dusíku s přidáním 500 µl RNA Blue. Poté byla homogenizovaná tkáň 5 minut ponechána inkubovat při pokojové teplotě, což vedlo ke kompletnímu rozvolnění nukleoproteinového komplexu, a následně bylo přidáno 500 µl RNA Blue. Vyizolovaná RNA byla uchována v -80°C. K homogenizaci bylo použito cca 15-25 jedinců *Diuraphis noxia*.

Dále bylo postupováno přesně podle návodu výrobce. Koncentraci a čistotu vyizolované totRNA jsem ověřil na spektrofotometru (absorbance měřena při 260 nm a 280nm).

##### **4.4.2. Reverzní transkripce**

Reverzní transkripce byla prováděna pomocí M-MLV reverzní transkriptázy (Top-Bio s.r.o.) dle návodu výrobce za pomoci enzymu M-MLV reverzní transkriptázy, která je získaná z myšího leukemického viru Moloney.

Pro reverzní transkripci cDNA jsem použil oligo(dT) primer a jako templát bylo použito 1000ng vyizolované totRNA.

##### **4.4.3. Použité primery pro EPIC-PCR a amplifikační profily**

Pro metodu EPIC-PCR byly vybrány na základě literatury následující primery (Tabulka 3) (Palumbi, 1996).

**Tabulka 3:** Přehled použitých primerů

Gen	Primer	Sekvence primeru 5' → 3'
Kreatin kináza	CK6-5'	GAC CAC CTC CGA GTC ATC TCZ ATG
	CK7-3'	CAG GTG CTC GTT CCA CAT GAA
	ARK7-3'	GT GCC AAG GTT GGT DGG GCA
Aktin	ACT I5'	GCT GTT TTC CCG TCC ATT GT
	ACT II3'	GTC CTT CTG CCC CAT ACC SAC CAG
Cytochrom C	cytC-C-5'	AAG TGT GCY CAR TGC CAC AC
	cytC-B-3'	CAT ATT GGT GCC GGG GAT GTA TTT CTT
Kalmodulin	Cal-1	GCC GAG CTG CAR GAY ATG ATC AA
	Cal-2	GT GTC CTT CAT TTT NCT TGC CAT CAT

Y=C,T; R=A,G; Z=C,G; S=C,A; D=G,T; N=A,G,T,C

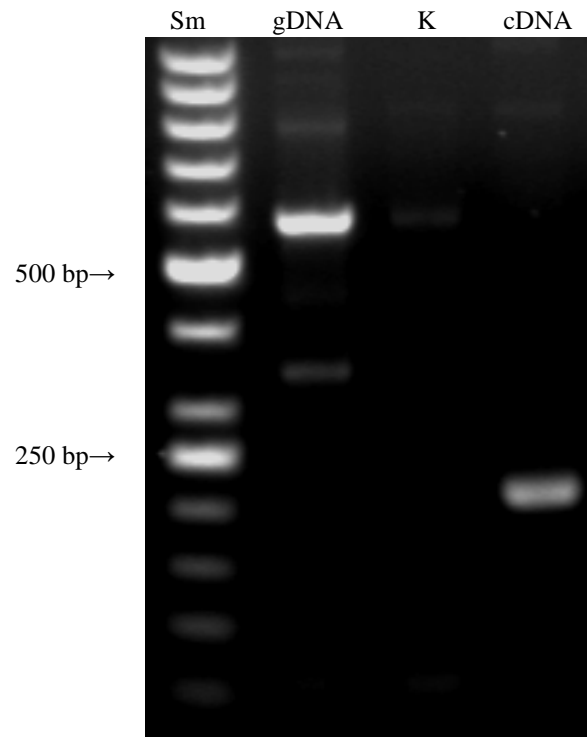
Požadovaná amplifikace DNA fragmentů probíhala na přístrojích Bioer XP cycler a Eppendorf Mastercycler. Po skončení PCR byly vzorky zchlazeny na 4°C. PCR profily jsou uvedeny v Tabulce 4.

**Tabulka 4:** PCR profily

	Kalmodulin		Kreatin kináza		Aktin		Cytochrom C	
	teplota (°C)	doba (s)	teplota (°C)	doba (s)	teplota (°C)	doba (s)	teplota (°C)	doba (s)
<b>1. predenaturace</b>	94	120	94	120	94	120	94	120
<b>2c. denaturace</b>	94	30	94	30	94	30	94	30
<b>3c. annealing</b>	55	30	57	40	55	30	61	45
<b>4c. elongace</b>	72	40	72	60	72	40	72	60
<b>5. postelongace</b>	72	120	72	120	72	240	72	120
<b>6. uchovávání</b>	4	∞	4	∞	4	∞	4	∞
<b>cykly</b>	40		35		40		35	



**Obr. 8:** Amplifikace cDNA a gDNA za pomoci primeru cytC-C-5' a cytC-B-3'. Verifikace na 1,5% agarózovém gelu. Size marker GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, 50-1000 bp. Zde můžeme pozorovat délkovou variabilitu mezi gDNA a cDNA. K- negativní kontrola.



#### **4.5. Reakční směsi pro PCR**

Reakční směs pro PCR reakci byla pro „mikrosatelity“ a EPIC-PCR stejná a byla míchána v 200 µl mikrozkušavce a vždy na ledu. Složení reakční směsi: 7,25 µl ddH<sub>2</sub>O, 1,25 µl 10x Ex Taq pufr (TaKaRa), 1 µl dNTPs 2,5mM (TaKaRa), 1 µl Primer Forward (5 µM), 1 µl Primer Revers (5 µM), 0,1 µl „UNIS“ Taq polymeráza (Top-Bio s.r.o.) a 1 µl DNA.

Výsledný objem namíchané reakční směsi byl 12,5 µl. Také jsem vyzkoušel přidání 0,5 µl BSA (Bovine Serum Albumin, 20mg/ml, Fermentas) do každé reakční směsi. BSA stabilizuje enzymy během reakce a zabraňuje jejich ulpívání na stěnách mikrozkušavky a může tak zvýšit účinnost reakce. Objem přidaného BSA se v každé reakci odečítá od objemu ddH<sub>2</sub>O.

#### **4.6. Purifikace PCR produktu a klonování**

Po ověření úspěšnosti amplifikace jak mikrosatelitních tak EPIC fragmentů jsem použil dvě metody (přímá sekvence PCR produktu a klonování) k získání sekvencí amplifikovaných oblastí.

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

Pro purifikaci produktů o vysoké čistotě byla použita enzymatické reakce skládající se z 0,5 µl ddH<sub>2</sub>O, 0,5 µl Exonuclease I (20 U/µl, Fermentas) a 1,0 µl Shrimp Alkaline Phosphatase (1 U/µl, Fermentas). Tato reakce byla míchána na ledu. Inkubace vzorků probíhala v Bioer XP cycleru při 37°C 30 minut a při 87°C 15 minut. Při 87°C dochází k inaktivaci enzymů. Výsledný produkt byl použit do sekvenační reakce nebo byl zamražen na -20°C.

##### **4.6.2. Klonování**

V případě že přímá sekvenace z PCR produktů přečištěných metodou Exo-Sap nebyla úspěšná, rozhodl jsem se dané vzorky zaklonovat a tím zvýšit výtěžek PCR reakce.

###### **4.6.2.1. Ligace**

Koncentrace a kvalita PCR produktu byla vyhodnocena pomocí elektroforézy na 1,5% agarózovém gelu s nízkým bodem tání (Low Melting Agarose) v 1x TAE pufru při napětí 120 V. Agarózový gel obsahoval ethidium bromid o koncentraci 0,5 µg/µl. Výsledný fragment

byl vyříznut na UV transluminátoru (UVP Transilluminator) a rozpuštěn v mikrozkušavce při 70°C cca 10 minut.

Ligační směs se skládala z 10 µl ddH<sub>2</sub>O, 7 µl rozpuštěné agarózy, 1 µl pDrive klonovacího vektoru (50 ng/µl, QIAGEN), 2 µl 10x ligačního pufru (Fermentas) a 1 µl T4 ligázy (400 U/ µl, Fermentas). Ligace byla prováděna cca 12 hodin při 4°C.

#### **4.6.2.2. Transformace bakterií**

Do 100 µl kompetentních buněk *Escherichia coli* DH5α bylo přidáno 2 µl merkaptoetanolu a 7 µl ligační směsi a jemně promícháno. Směs byla ponechána přibližně 20 minut na ledu. Následně byl proveden tzv. „tepelný šok“ ponořením této směsi na 40 sekund do 42°C teplé vodní lázně a vrácením zpět na led. Ke směsi bylo přidáno 500 µl tekutého LB média (250 ml dH<sub>2</sub>O, 2,5 g trypton, 1,25 g yeast extract, 2,5 g NaCl, 3,75 g agar, 500µl ampicilin). Takto připravená směs byla inkubována 50 minut při 37°C v třepačce.

Na Petriho miskách obsahujících tuhé LB medium a ampicilin o koncentraci 100 µg/ml bylo naneseo 50 µl X-gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyn-D-galaktozid, 20 mg/ml v dimethylformamidu) a 10 µl IPTG ( Izopropyl-thio-D-galaktozid, 200 mg/ml). Po zaschnutí bylo na Petriho misky naneseo 50-100 µl bakteriální směsi a rovnoměrně rozetřeno pomocí sterilní hokejky. Následně byly tyto Petriho misky přeneseny do termostatu nastaveného na teplotu 37°C.

Inkubace probíhala 12-15 hodin v termostatu, Petriho misky byly dnem vzhůru. Po inkubaci bylo možné identifikovat kolonie s integrovaným inzertem v plasmidech pomocí modro-bílé selekce na utilizaci galaktózy. Bílé kolonie byly přeočkovány na nové Petriho misky s ampicilinem.

Na důkaz správně zaklonovaného fragmentu bylo provedeno PCR. Jako templát posloužila část kolonie, která byla rozsuspendována v 20 µl ddH<sub>2</sub>O a na 5 minut dána do lázně o teplotě 94°C. Pro PCR reakci byly použity primery SP6 a T7 (Tabulka 5)

Amplifikační program se skládal z těchto kroků: predenaturace 94°C, 1 min., následovalo 30 cyklů (denaturace 94°C, 30 s, annealing 49°C, 30 s, elongace 72°C, 1 min.), reakci ukončila postelongace 72°C, 2 min..

Následovalo přečištění pomocí směsi ExoSap-IT® (USB) (Dugan et al., 2002) a namíchání sekvenační reakce.

**Tabulka 5:** Primery SP6 a T7

Primer	Sekvence primeru 5' → 3'
<b>SP6</b>	ATTTAGGTGACACTATAG
<b>T7</b>	TAATACGACTCACTATAGGG

#### 4.7. Sekvenační reakce

Do sekvenační reakce, míchána v 200 µl mikrozkušavkách, byla dána ddH<sub>2</sub>O, 0,5 µl primeru a 0,5-1,5 µl přečištěného PCR produktu tak, aby celkový objem činil 7,5 µl. Sekvenační reakce proběhla na sekvenátoru ABI PRISM 3130xl, Applied Biosystems v Laboratoři genomiky Ústavu molekulární biologie rostlin (Biologické centrum AV ČR).

#### 4.8. Statistická analýza

Kontrolní identifikace sekvencí byla provedena v databázi NCBI BlastSearch (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Získané sekvence byly uloženy ve formátu FASTA a následně vloženy do databáze NCBI BlastSearch, ve kterých byla sekvence porovnána s již existujícími databázemi. Výsledkem porovnávání je soubor sekvencí, které se procentuálně nejvíce shodují se zkoumanou sekvencí.

##### 4.8.1. Analýza mikrosatelitů

Pro analýzu populačně-genetických parametrů byl použit software Arlequin 3.1 (Excoffier, L. et al., 2005), ve kterém byly testovány mikrosatelitní lokusy. Data pro software Arlequin 3.1 byla vizuálně odečítaná z jednotlivých polyakrylamidových gelů. K příslušným alelám na gelu byla přiřazena písmena A nebo B (přítomnost či nepřítomnost alely) a následně vytvořena matice pro tento program (viz Příloha 2).

V programu Arlequin 3.1 byla počítána heterozygotnost - počet očekávaných ( $H_e$ ) a počet pozorovaných ( $H_0$ ) heterozygotů v populaci, počty alel - počet různých alel na vybraném lokusu bez ohledu na frekvenci jejich výskytu, fixační index ( $F_{ST}$ ) – pro vyjádření stupně divergence mezi jednotlivými populacemi a úroveň genetické variability mezi jednotlivými populacemi. Vyšší hodnoty  $F_{ST}$  signalizují snížení toku mezi populacemi a poukazují na vliv genetického driftu, kterým se v subpopulacích fixují odlišné alely.

Dále byl v tomto programu počítán Mantelův test (Mantel, 1967). Testoval jsem izolaci vzdáleností, pomocí níž se hodnotí, jestli koreluje genetická a geografická vzdálenost, přičemž

jsou zohledňována mnohonásobná porovnání. Využívá permutace pro determinaci rozložených dat. K testování daných dat a ke stanovení intervalu, kdy dochází k zamítnutí nulové hypotézy. Pro tento test je třeba dvou matic. Jedna matice zahrnuje genetické diference populací a druhá obsahuje přirozené logaritmy geografických vzdáleností ( $\ln$  vzdáleností) mezi dvojicemi populací.

V programu Arlequin 3.1 jsem vypočítal distanční matice pomocí  $F_{ST}$  (Weir a Hill, 2002, p. 734), Slatkinova linearizovaného  $F_{ST}$  (Slatkin, 1991, 1995) a M values (Slatkin, 1991). Genetické diference mezi dvěma populacemi byly dále počítány pomocí algoritmů: Nei (1972) distance pomocí programu GDA ver.1 (Lewis a Zaikyn, 2002).

Geografická vzdálenost byla určena výpočtem vzdálenosti přímou vzdušnou čarou mezi jednotlivými lokalitami (<http://maps.google.com/maps?showlabs=1>) (viz. Příloha 3).

V programu Arlequin 3.1 byla provedena analýza molekulární variance (AMOVA), jejímž výsledkem by měla být identifikace zdroje variability na základě frekvencí alel. Signifikance testu detekované genetické struktury (uvnitř populací, mezi populacemi a mezi všemi skupinami) je založena na neparametrických permutacích (Excoffier et al., 1992)

V programu GDA ver.1 byla vytvořena distanční matice (dle algoritmu Nei 72) (viz Příloha 5), která byla následně použita při Mantelově testu, a také vypočtena heterozygotnost - očekávaná ( $H_e$ ) a pozorovaná ( $H_0$ ).

#### **4.9.2. Analýza EPIC-PCR**

Sekvence byly upraveny v programu BioEdit verze 5.0.9. (Hall, 1999) a MEGA 4 (Tamura et al., 2007) a dále vytvořeny alignmenty (pomocí metody ClustalW) v programu MEGA 4. 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).

Nakonec byl v programu MEGA 4 vytvořen dendrogram pomocí algoritmu Neighbor-Joining (NJ) s použitím modelu genetické vzdálenosti Kimura 2-Parameter. Gapy (místa v jedné nebo více sekvencích v námi porovnávaném souboru dat, kde chybí jeden či více nukleotidů) byly zohledňovány jako variabilita, ne jako chybějící data (Pairwise deletion). Pro ověření správnosti stromu byla využita randomizační metoda bootstrap (10000 opakování). Při tvorbě dendrogramu u markeru CytC byla jako outgroup použita mšice *Acyrtosiphon pisum* (NCBI Reference Sequence: NM\_001126159.2).

## 5. Výsledky

### 5.1. Testované markery

V této práci byly testovány 2 typy markerů pro detekci genetické variability přírodních populací mšice *Diuraphis noxia*. Prvním typem byly mikrosatelitní lokusy (celkem šest lokusů), druhým byl intronový polymorfismus EPIC-PCR (čtyři lokusy). Celkem bylo analyzováno 47 jedinců ze 12 populací.

Z mikrosatelitních lokusů se podařilo úspěšně naamplifikovat všechny markery (viz Tabulka 1). Při opakovaných amplifikacích s markerem SmS23 jsem nedosáhl stejných výsledků jako při první amplifikaci, proto jsem tento marker vyřadil ze statistických analýz.

Z EPIC-PCR lokusů se mi podařilo naamplifikovat většinu markerů (viz Tabulka 3), kromě markerů pro kreatin kinázu.

### 5.2. Mikrosatelity

#### a) zavedení metody

Pro mikrosatelitní oblasti byly zvoleny markery z Tabulky 1. PCR profily byly zkoušeny a upravovány pro optimální amplifikaci požadovaných fragmentů. Po úspěšné amplifikaci všech markerů u většiny vzorků byla z počátku dělána verifikace na 1,5% agarózovém gelu. Byly zkoušeny i jiné koncentrace agarózových gelů (1% - 3%) a různé délky gelů, ale kvůli špatné separaci fragmentů na agarózovém gelu byl zvolen gel polyakrylamidový.

Z počátku byly optimalizovány podmínky pro výrobu polyakrylamidových gelů a byly zde zkoušeny dva různé protokoly na výrobu těchto gelů. Polyakrylamidové gely byly dělány v koncentracích od 5% - 12% a napětí se pohybovalo od 1-8 V na 1 cm gelu.

Dobré separace bylo dosaženo až za použití 6% Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Harwood, 2000) a při napětí 235 V. Po optimalizaci podmínek byly všechny amplifikované mikrosatelitní lokusy vyhodnoceny na tomto 6% polyakrylamidovém gelu. Elektroforetická separace se pohybovala cca od 50 – 70 minut.

#### b) statistická analýza

Pomocí vizuálního vyhodnocení polyakrylamidových gelů byla vytvořena matice, která byla příslušně upravená pro statistická vyhodnocení v programu Arlequin 3.1 a programu GDA ver.1 (viz 4.9.1. Mikrosatelitní analýzy). Do statistické analýzy nebyl použit marker SmS23,

neboť se nepodařilo pro většinu vzorků získat dostatečné množství produktu ani při opakované amplifikaci a změně podmínek PCR.

Do provedených statistických analýz byly zařazeny pouze lokality s více jedinci, neboť některé testy nelze pro populace zastoupené jediným vzorkem použít. Proto byly vyřazeny lokality Francie, Maďarsko, Chile a Moldavsko.

Z příslušné matice byla vypočítána v programu Arlequin 3.1 očekávaná ( $H_e$ ) heterozygotnost (Tabulka 6), fixační index (index genetické divergence) a v programu GDA ver.1 byla vypočítána pozorovaná ( $H_0$ ) i očekávaná heterozygotnost (Tabulka 7). Tyto tabulky ukazují, že nejvíce variabilní jsou vzorky z Turecka, České republiky a Tuniska.

**Tabulka 6:** Očekávaná heterozygotnost z programu Arlequin 3.1

Lokus	Tunisko	Egypt	Írán	Turecko	Alzir.	USA	Česko	Špan.	Průměr	s. d.	Celk.Het.
ApEST39	0,666	0,000	0,600	0,523	0,000	0,000	0,250	0,000	0,255	0,278	0,408
SmS16b	0,666	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,083	0,220	0,047
ApEST34	0,000	0,666	0,000	0,519	0,263	0,000	0,571	0,000	0,252	0,273	0,366
Sa4S	0,000	0,533	0,000	0,523	0,525	0,250	0,600	0,494	0,365	0,232	0,462
Sgg2	0,500	0,600	0,000	0,523	0,533	0,571	0,535	0,538	0,475	0,181	0,498
Průměr	0,366	0,360	0,120	0,418	0,264	0,164	0,391	0,206	0,286	0,105	0,356
s. d.	0,305	0,296	0,240	0,209	0,236	0,225	0,232	0,253	0,249	0,031	0,161

Největší očekávaná heterozygotnost z programu Arlequin 3.1 vychází pro Turecko (0,418) a Českou republiku (0,391).

**Tabulka 7:** Očekávaná i pozorovaná heterozygotnost z programu GDA ver.1 (podle algoritmu Nei 1972).

Populace	$H_e$	$H_0$	f
Tunisko	0,458	0,125	0,800
Egypt	0,360	0,533	-0,757
Írán	0,120	0,200	-1,000
Turecko	0,418	0,781	-0,954
Alžírsko	0,264	0,432	-0,714
USA	0,164	0,250	-0,666
Česko	0,391	0,600	-0,704
Španělsko	0,206	0,342	-0,756
Průměr	0,297	0,408	-0,500

V této tabulce můžeme vidět, že největší očekávaná heterozygotnost je v Tunisku (0,458), Turecku (0,418) a České republice (0,391). Největší pozorovaná heterozygotnost se vyskytuje v Turecku (0,781), České republice (0,600).

Dále byl u těchto populací vypočítán počet alel (Tabulka 8). Největší počet alel vykazuje Turecko společně s Českou republikou (1,800), tyto státy také vykazují největší variabilitu.

**Tabulka 8:** Počet alel u vybraných populací vypočítaný pomocí programu Arlequin 3.1  
**Počet alel**

Lokus	Tunisko	Egypt	Iran	Turecko	Alzirsko	USA	Cesko	Spanelsko	Průměr	s.d.	Celk. počet
ApEST39	2	1	2	2	1	1	2	1	1,500	0,500	3
SmS16b	2	1	1	1	1	1	1	1	1,125	0,331	2
ApEST34	0	2	1	2	2	1	2	1	1,375	0,696	3
Sa4Σ	1	2	1	2	2	2	2	2	1,750	0,433	3
Sgg2	2	2	1	2	2	2	2	2	1,875	0,331	2
Průměr	1,400	1,600	1,200	1,800	1,600	1,400	1,800	1,400	1,525	0,198	2,600
s.d.	0,800	0,490	0,400	0,400	0,490	0,490	0,400	0,490	0,495	0,123	0,490

Výsledky analýzy molekulární variance (AMOVA) ukazují, že celková hodnota variance je 0,707 (71%). Mezi skupinami je malá variance, variance mezi populacemi ve skupině činí 11,78% a variance mezi všemi vybranými populacemi je 83,67% (Tabulka 9).

**Tabulka 9:** Analýza molekulární variance (Weir, B. S. a Cockerham, C. C. 1984, Excoffier, L., Smouse, P., a Quattro, J. 1992, Weir, B. S., 1996)

Zdroj Variace	d.f.	Suma čtverců	Variance komponentů	Vysvětlená variabilita
Mezi skupinami	5	9,758	0,032	4,55
Mezi populacemi uvnitř skupin	2	2,364	0,083	11,78
Uvnitř populací	76	44,985	0,591	83,67
Celkem	83	57,107	0,70743	

Fixační index:

$F_{ST}$  : 0,163 – Udává rozdíly mezi všemi populacemi (16%)

$F_{SC}$  : 0,123 – Průměrná variance v rámci skupin (12%)

$F_{CT}$  : 0,045 – Nevykazuje téměř žádné rozdíly mezi skupinami (4%)



Fixační indexy  $F_{ST}$  a  $F_{SC}$  podle výsledku testu ukazují, že se tato čísla liší významně od nuly ( $P > 1\%$ ). Tento fakt nám říká, že se zde vyskytují genetické rozdíly mezi jedinci v populacích a mezi populacemi v rámci skupin.

$F_{CT}$  nám z výpočtů vyšel malý (4,55%) a podle testu se neodlišuje významně od nuly ( $P \gg 5\%$ ). Analýza variance (AMOVA) nedekovala žádný rozdíl mezi skupinami v závislosti na geografické vzdálenosti.

Mantelův test (Matrix correlation analysis) byl proveden na základě vypočtené genetické vzdálenosti pro párová porovnání pomocí algoritmů:  $F_{ST}$ , Slatkinova linearizovaného  $F_{ST}$ , M values a Nei (1972) distance vytvořenou v programu GDA ver.1 (viz Příloha 5). Tyto matice jsem použil do výpočtů pro Mantelův test, ve kterém byly porovnány s geografickými vzdálenostmi jednotlivých lokalit. Při použití těchto matic vyšly výsledky téměř stejně.

Korelační koeficient se pohybuje od -1 do 1, a čím je blíže těmto limitním hodnotám tak se test jeví jako neprůkazný). Pokud je hodnota  $P > 5\%$ , znamená to, že test je neprůkazný.

**Tabulka 10:** Výsledky pro Mantelův test počítaný různými algoritmy

<b>Algoritmus</b>	<b>P</b>	<b>Korelační koeficient</b>
<b><math>F_{ST}</math></b>	0,512	-0,046
<b>Slatkinova linearizovaného <math>F_{ST}</math></b>	0,406	0,019
<b>M values</b>	0,692	-0,18
<b>Nei (1972) distance</b>	0,864	-0,243

(Slatkin, 1991, 1995; Weir a Hill, 2002, p. 73)

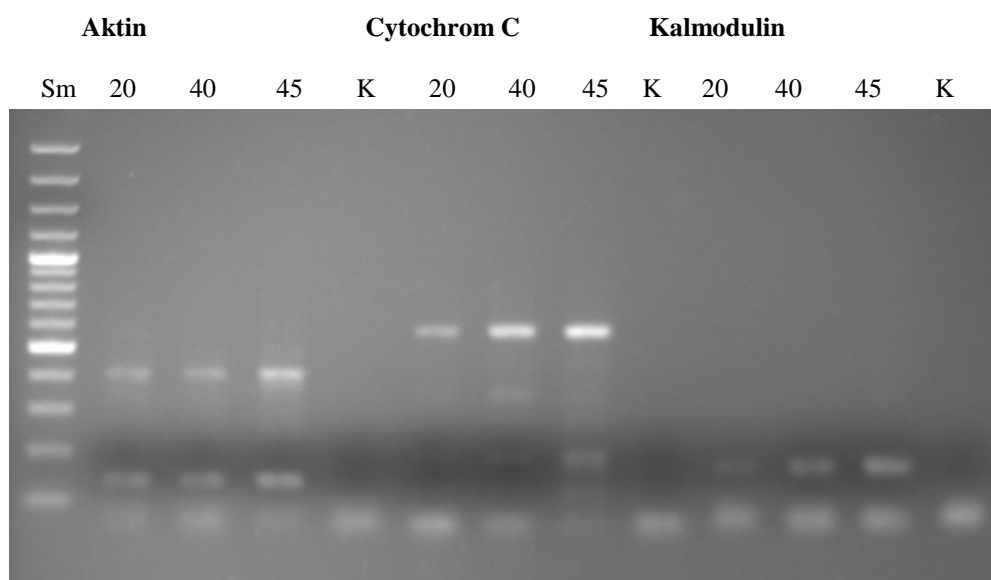
Výpočty u všech testovaných algoritmů vyšli neprůkazně ( $P \gg 5\%$ ). Výsledky ukazují, že zde není žádná korelace. Mantelův test nenašel žádné závislosti mezi geografickou a genetickou vzdáleností.

### 5.3 EPIC-PCR

Pro EPIC-PCR byly zvoleny markery z Tabulky 3. Po optimalizování PCR podmínek se podařilo naamplifikovat fragmenty pro tyto geny: kalmodulin, cytochrom C, aktin (Obr. 9). Nepodařilo se naamplifikovat marker pro kreatin kinázu. Elektroforetická verifikace byla prováděna na 1,5% agarózovém gelu při napětí 120 V.

Dále se podařilo naamplifikovat cDNA pro cytochrom C, která byla následně porovnána s gDNA (Obr. 8).

**Obr. 9 :** Fotografie 1,5% agarózový gel s naamplifikovanými fragmenty (kalmodulin, cytochrom C, aktin). Vzorky 20, 40, 45, K-negativní kontrola. Size marker GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, 100-3000 bp.



Jelikož na agarózovém gelu nebyl patrný žádný délkový polymorfismus, výsledné fragmenty s intronem byly sekvenovány pro zjištění variability na úrovni nukleotidů.

Do sekvenační reakce byly použity pouze primery cytC-C-5' a Cal-1, protože pomocí primerů ACT I5' se opakovaně nepodařilo sekvence získat. Při amplifikaci DNA se nepodařilo naamplifikovat všechny vzorky ze 47 jedinců sesbíraných v Evropě, Africe, Asii a USA. Proto k další analýze bylo použito pouze 21 sekvencí pro cytochrom C (Tabulka 11). Těchto 21 sekvencí bylo dále upraveno v programu MEGA 4 na jednotnou délku 425 bazí a použito pro další analýzy.

**Tabulka 11: Sekvenovaní jedinci**

Číslo vzorku	Země a oblast sběru	Datum	Hostitelská rostlina	Způsob uchování
1	Francie, Montpellier	12.2.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
6	Egypt, El-Sheikh Zuwayid	19.4.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
7	Egypt, El-Sheikh Zuwayid	5.4.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
9	Írán, Kerman, Kerman Province	20.4.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
12	Turecko, Sarayköy-Konya	26.6.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
14	Turecko, Karaağaç-Konya, Bahri Dagdas 1,	27.6.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
18	Turecko, Çumra-Konya02	2.7.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
20	Turecko, Meram-Konya	10.7.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
21	Turecko, Beyşehir1 - Konya	12.7.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
23	Alžírsko, Ain Kercha (Oum El Bouaghi Dept.)	17.4.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
25	Alžírsko, Kais (Khenchela Dept.)	9.5.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
26	Alžírsko, El Khroub (Constantine Dept.)	12.5.2008	<i>Triticum durum</i>	Etanol
27	Alžírsko, Hamla (Batna Dept.)	14.5.2008	<i>Triticum durum</i>	Etanol
29	Alžírsko, Tazoult-Lambese(Batna Dept.)	23.5.2008	<i>Triticum durum</i>	Etanol
31	USA, Couny line - Juniper Canyon, Blicketon	24.6.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
38	Česká republika, Litobratřice, Moravia	1.7.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
39	Česká republika, Bystřice p. Hostýnem, Moravia	16.7.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
40	Česká republika, Třebíč, Bohemia south	16.7.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
41	Chile, Chillian	xx.2.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
44	Španělsko, Salt, Girona	7.5.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
45	Španělsko, Vencillón	6.5.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol

Při analýze sekvencí bylo nalezeno 125 variabilních míst, parsimoniálně informativní variabilita byla nalezena na 44 místech (1,7 %).

V sekvencích se vyskytovalo průměrně 36,0% A, 41,8% T, 11,2% C a 11,0% G. Průměrný poměr AT/GC je 77,8/22,2. 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.

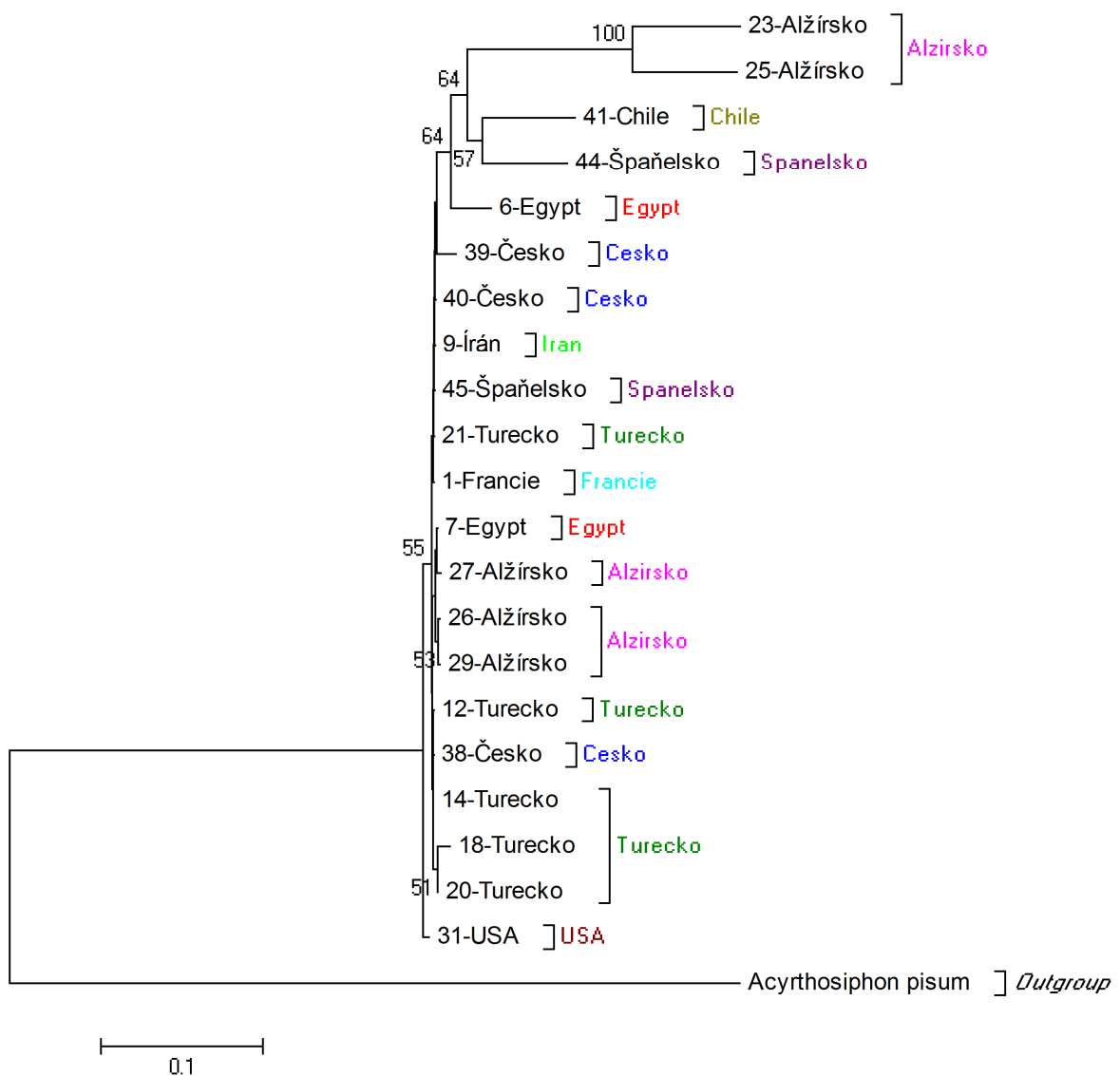
Tajimovo D je -1.795950,  $P > 0,1$ , což je statisticky nesignifikantní. To znamená, že se v daném úseku neprojevila žádná selekce. Ze získaných sekvencí byl následně vytvořen dendrogram znázorňující fylogenetické vztahy mezi jedinci *Diuraphis noxia* z různých zemí a oblastí (Obr. 14). Průměrná variabilita všech populací je 0,15. Variabilita mezi jednotlivými populacemi je uvedena v Příloze 4. Genetická variabilita byla analyzována i mezi jednotlivými zeměmi, ze kterých vzorky pocházely (Tabulka 12).

**Tabulka 12:** Variabilita mezi zeměmi (Mega 4, Kimura 2-Parameter, Pairwise deletion)

	A.pisum	Francie	Egypt	Írán	Turecko	Alžír.	USA	Česko	Chile	Španělsko
A.pisum	0,00									
Francie	0,964	0,00								
Egypt	1,009	0,019	0,00							
Írán	0,964	0,000	0,019	0,00						
Turecko	0,965	0,005	0,022	0,005	0,00					
Alžírsko	1,131	0,086	0,098	0,086	0,088	0,00				
USA	0,964	0,010	0,028	0,010	0,015	0,093	0,00			
Česko	0,978	0,005	0,024	0,005	0,008	0,089	0,015	0,00		
Chile	1,079	0,092	0,100	0,092	0,097	0,168	0,085	0,098	0,00	
Španělsko	1,044	0,044	0,060	0,044	0,049	0,120	0,048	0,049	0,104	0,00

Nejvyšší variabilita se pak vyskytuje mezi Chile a Alžírskem s hodnotou 0,168.

Byla také vypočítána variabilita uvnitř těchto zemí. Egypt vykazuje variabilitu 0,039, Alžírsko 0,138, Španělsko 0,087, Česko 0,01 a Turecko pouze 0,006. Chile, USA, Írán, Francie nebyly do analýzy zahrnuty, protože obsahují pouze jeden vzorek a nebylo tedy možno sekvenci s ničím porovnat.



**Obr. 10:** Dendrogram fylogenetických vztahů mezi jedinci *Diuraphis noxia* z různých zemí a oblastí dle Tab. 10 (Neighbor-Joining, Kimura 2-Parameter, Pairwise deletion, Bootstrap 10000). Čísla vedle větví znázorňují, v kolika procentech byly v "bootstrap" testu jedinci do těchto klastrů spojeni. Jako outgroup byla použita *A. pisum* (NCBI Reference Sequence: NM\_001126159.2).

## **6. Diskuze**

### **6.1. Extrakce DNA**

Ze tří vyzkoušených metod pro DNA extrakci byly izolace pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit i Invisorb Spin Tissue Mini Kit stoprocentně úspěšné a extrakce pomocí Squishing bufferu se podařila u většiny vzorků. U této extrakce docházelo však k rychlé degradaci DNA a proto byla tato izolace vhodná pouze pro předběžný screening vzorků. Nejvýhodnější metoda, izolace DNA z hlediska její dlouhodobé použitelnosti, se jeví použití DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN).

### **6.2. Purifikace produktů sekvenační reakce**

Byly používány dva různé postupy pro přečištění PCR produktu pro sekvenční reakci. První postup byl za použití směsi enzymů ExoSap-IT® (USB) (Dugan et al., 2002). Tato metoda přečištění byla velmi efektivní. I při malé výtěžnosti PCR reakce jsem nakonec získal dobře čitelné sekvence.

Jako druhá metoda bylo použito klonování. Pomocí této metody se ale nepodařilo získat dobře čitelné sekvence, i když byly po klonování vidět kolonie s integrovaným inzertem v plazmidech pomocí modro-bílé selekce na utilizaci galaktózy. S největší pravděpodobností nebyla tato metoda úspěšná díky vysokému výskytu A/T bohatých oblastí.

### **6.3. Testování markerů pro mikrosatelitní lokusy**

Pro testování variability pomocí mikrosatelitních markerů jsme se rozhodli na základě konzultace s H. Loxdalem. Po této zavedené metodě by bylo možné zavedení výrazně dražších metod, jako jsou např. fragmentační metody značené fluorescencí.

Na začátku práce jsem vybral celkem 6 markerů pro mikrosatelitní lokusy na základě publikací od Dolatti et al., 2005, Shufan a Payton, 2009 (v této práci použili stejné markery jako Dolatti et al., 2005) a Weng et al., 2007. Během optimalizace PCR podmínek bylo zkoušeno přidání BSA do reakční směsi, kde jsem ale nepozoroval žádné výrazné zlepšení amplifikace fragmentů. Při amplifikaci mikrosatelitních markerů byly dále zkoušeny různé teploty a časy pro annealing dokud nebyly nalezeny vhodné podmínky pro amplifikaci těchto markerů.

Pro elektroforetickou verifikaci mikrosatelitních markerů byly z počátku zvoleny agarózové gely o různých koncentracích (1% - 3%). Na těchto gelech se mi ale nepodařilo docílit dostatečné separace jednotlivých fragmentů z PCR reakce, i když byly zkoušeny i různé

délky agarózových gelů. Proto jsem přistoupil k použití polyakrylamidových gelů. Zde jsem musel nejprve optimalizovat podmínky pro výrobu samotných gelů a následně vybrat jejich vhodné koncentrace. Po provedení těchto úkonů se mi jako nejlepší varianta pro separaci mikrosatelitních markerů jeví použití 6% Polyacrylamide Gel Electrophoresis (Harwood, 2000). Do statistické analýzy nebyl použit marker SmS23, neboť se nepodařily ani opakované amplifikace pro většinu vzorků.

Výsledky mé práce získané při vyhodnocení mikrosatelitních markerů a jejich fragmentů byly porovnány se studii od Dolatti et al., 2005; Shufran a Payton, 2009 a Weng et al., 2007.

Porovnával jsem velikosti a počty svých amplifikovaných alel s velikostí a počtem alel, které byly uváděny v těchto studiích. Tyto velikosti a počty alel zpravidla odpovídali velikostem, které byly popsány v předložených studiích, jak můžeme vidět v Tabulce 13.

**Tabulka 13:** Porovnání amplifikovaných markerů s markery, které byly uváděny ve studiích od Dolatti et al., 2005; Shufran a Payton, 2009 a Weng et al, 2007.

<b>Markery</b>	<b>Markery z literatury (bp)</b>	<b>Počet alel</b>	<b>Mé markery (bp)</b>	<b>Počet alel</b>
<b>ApEST34</b>	120 - 1150	4	220 -240	2
<b>ApEST39</b>	245 - 365	2	110 - 130	2
<b>SmS16b</b>	166 - 250	2	170 - 190	1
<b>Sgg2</b>	320 - 270	2	290 - 310	2
<b>SmS23</b>	122 - 156	3	170 - 400	2
<b>Sa4Σ</b>	150 - 176	4	160 - 190	4

Výsledné rozdíly mohou vyplývat z odlišných metod amplifikace a separace fragmentů.

Z polyakrylamidových gelů byly provedeny vizuální odečty dat, které byly dále použity pro výrobu matic pro statistické programy. Při sestavování matic byly z analýzy odebrány lokality, ze kterých jsem měl k dispozici pouze jeden vzorek.

Na základě těchto úprav jsem stanovil největší pozorovanou heterozygotnost ( $H_0$ ), v programu GDA ver.1. Ta se nacházela u vzorků z Turecka (0.781) a České republiky (0.600).

Největší počet alel vykazuje Turecko společně s Českou republikou (1.800), tyto státy také vykazují největší variabilitu.

Výsledná pozorovaná heterozygotnost v Íránu ( $H_0 = 0,20$ ) koreluje i s výsledky pozorované heterozygosity ( $H_0 = 0,17$ ), které uvedl Dolatti et al., v roce 2005.

Výsledná vysoká variabilita v České republice a Turecku může být způsobena několika faktory. Turecko může být bráno jako jedno z prvních míst odkud se *Diuraphis noxia* rozšířila do celého světa. Bylo zde více původních populací, které následně migrovaly do okolních států, kde založily méně variabilní populace.

Dále zde může hrát značnou roli střídání pohlavního a nepohlavního rozmnožování, jak uvádí ve svých pracích Shufrán a Payton, 2009. Pohlavní rozmnožování celkově přispívá k větší genetické variabilitě. Proto by se tento jev mohl uplatňovat zejména v České republice, kde se *Diuraphis noxia* musí vyrovnat se střídáním ročních období a přes zimu musí uplatňovat pohlavní rozmnožování. Zde se jako velký hybatel genetické variability jeví klimatické podmínky. Také se zde s největší pravděpodobností projevil počet testovaných vzorků.

U osmi testovaných lokalit (Egypt, Írán, Turecko, Alžírsko, USA, Česko, Chile, Španělsko) byl analýzou 5 mikrosatelitních lokusů zjištěn  $F_{ST} = 0,163$  – genetická divergence mezi těmito lokalitami je poměrně vysoká. Z celkové genetické variability můžeme pouze 12% připsat rozdílům mezi populacemi uvnitř skupinami, zatímco 83% celkové genetické variability se vyskytuje uvnitř populací.

Pomocí Mantelova testu a analýzy AMOVA nebyly na úrovni skupin nalezeny žádné rozdíly, které by byly způsobeny geografickými vlivy.

Mikrosatelitní lokusy se ukázaly být dobrým markerem pro studování genetické diverzity u *Diuraphis noxia* a při zavedení dalších markerů, které by prokazovaly vysokou variabilitu, by se tato metoda mohla daleko více používat při určování genetické variability u mšic.



#### 6.4. Testování markerů pro EPIC-PCR

Ve své práci jsem se pokoušel o zavedení této metody pro *Diuraphis noxia*. Jednalo se o první pokusy aplikace metody EPIC-PCR pro čeled' Aphididae (mšicovití), kde jsme předpokládali délkovou variabilitu amplifikovaných fragmentů.

Bylo vybráno 9 markerů. Po optimalizaci PCR podmínek byly výsledné fragmenty úspěšně rozděleny na 1,5% agarózovém gelu. Úspěšně byly použity markery pro tyto geny: kalmodulin, cytochrom C, aktin. Kalmodulin a cytochrom C se podařilo osekvenovat. Pro další analýzy byly použity pouze sekvence pro cytochrom C, neboť sekvence pro kalmodulin nebyly získány z dostatečně velkého počtu jedinců.

Porovnával jsem stejný fragment cytochromu C amplifikovaný z cDNA a gDNA, abych získal informaci o celkové velikosti intronů (viz Obr. 8). Fragment amplifikovaný z gDNA migruje v 1,5% agarózovém gelu jako fragment o délce 580 bp, zatímco fragment amplifikovaný z cDNA má délku 240 bp. Délka intronu tedy je 340 bp.

Sekvence pro cytochrom C se podařilo získat z 21 jedinců. Ve všech získaných sekvencích o délce 423 bazí bylo nalezeno 125 variabilních míst a z toho 44 parsimoniálních.

Na základě těchto sekvencí byla stanovena průměrná variabilita všech populací 0,15. Nejvyšší variabilita se pak ukázala mezi Chile a Alžírskem s hodnotou 0,168 (viz Tabulka 11). Tento výsledek koresponduje i se značnou vzdáleností mezi oběma lokalitami. Největší variabilita uvnitř jednotlivých lokalit se projevila v Alžírsku 0,138.

Tato variabilita může být způsobena tím, že Alžírsko není tak vzdálené od ostatních okolních lokalit, kde se *Diuraphis noxia* vyskytuje, a mohli sem migrovat jednotlivé populace nezávisle na sobě. Také zde může hrát roli to, zda se v době sběru vzorku neuplatňovalo více pohlavní rozmnožování, které přispívá k větší genetické variabilitě.

Ze získaných sekvencí jsem zkonstruoval dendrogram, který by měl zachytit fylogeografii, tedy postup šíření *Diuraphis noxia* z místa původu do dalších zemí. Výsledek dendrogramu nám však ukazuje, že zde nebylo úspěšné rozdělení vybraných populací podle geografické příslušnosti. Domnívám se, že to může být způsobeno migrací jednotlivých populací *Diuraphis noxia* z nedalekých okolních států.

## 7. Závěr

Podařilo se ověřit vhodnost použití 5 mikrosatelitních markerů k určení genetické variability přírodních populací *Diuraphis noxia*. Dále byla úspěšně zavedena metoda EPIC-PCR a pomocí 3 primerů se podařilo naamplifikovat fragmenty pro kalmodulin, aktin a cytochrom C. Touto prací byly vytvořeny základní genetické podklady pro celkový ekologický výzkum druhu *Diuraphis noxia*.

V této práci byla také potvrzena variabilita nejen mezi populacemi, ale také mezi jedinci uvnitř skupin. To může naznačovat značnou flexibilitu a velmi rychlé adaptování *Diuraphis noxia* na změnu životních podmínek.

Největší variabilita se vyskytovala v ancestrálních populacích a v populacích z temperátních lokalit, kde se výrazně více uplatňuje střídání pohlavního a nepohlavního rozmnožování. Tento fakt odpovídal i dřívějším studiím (Liu, X. et al., 2010, Starý, 1996; Weiland et al., 2008).

## 8. Literatura

**Corte-Real HBSM, Dixon DR, Holland PWH (1994).** Intron-targeted PCR: a new approach to survey neutral DNA polymorphism in bivalve populations. *Marine Biology*, 120, 407-413.

**Daguin C., Borsa P (1999).** Genetic characterisation of *Mytilus galloprovincialis* Lmk. in North West Africa using nuclear DNA markers. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 235, 55-65.

**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.

**Dugan, K. A., Lawrence, H. S., Hares, D. R., Fisher, C. L., Budowle, B., (2002).** An improved method for post-PCR purification for mtDNA sequence analysis. *Journal of Forensic Science*, 47(4):811-8.

**Ellegren, H. (2004).** Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat. Rev. Genet.*, 5, 435-445.

**Ennahli, S., El Bouhssini, M., Grando, S., Anathakrishnan, R., Niide, T., Starkus, L., Starkey, S., Smith, C. M. (2009):** Comparison of categories of resistance in wheat and barley genotypes against biotype 2 of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Kurdjumov). *Arthropod-plant Interactions* 3: 45-53.

**Excoffier, L., Smouse, P., and Quattro, J. (1992).** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.

**Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider (2005).** Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.

**Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., (1994).** DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3: 294-299.

**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.

**Franzen, L. D., Gutsche, A. R., Heng-Moss, T. M., Higley, L. G., Macedo, T. B. (2008):** Physiological responses of wheat and barley to Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko) and bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hemiptera: Aphididae). *Arthropod-plant Interactions* 2: 227-235.

**Gilchrist, L. I., Rodriquez, R., and Buenett, P. A. (1984).** The extent of Free State atreak dinase and *Diuraphis noxia* in Mexiko. In Burnett PA (ed) Proceedings of Barley Yellow Dwarf Virus Workshop, pp 157-163, El Batan Mexico.

**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.

**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.

**Hammond, R.L., Saccheri, I.J., Ciofi, C., Coote, T., Funk, S. M., McMillan, W. O., Bayes, M. K. Taylor, E. and Bruford, M.W. (1998)** Isolation of microsatellite markers in animals. Pp. 279-285 in Karp. A., Isaac, P. G. And Ingram, D. S. (Eds) *Molecular tools for screening biodiverzity*. London, New York, Molbourne, Madras, Chapman and Hall.

**Harwood, A. J., (2000).** The Nucleic Acid Protocol Handbook: Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Humana Press Inc., Totowa, NJ.

**Kimberly A., Selkoe and Robert J., Toonen (2006).** Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615-629.

**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.

**Laurent Excoffier Guillaume Laval, and Stefan Schneider (2006).** Arlequin 3. 1. CPMG, Institute of Ecology and Evolution, University of Bern.

**Lessa, E. P., (1992).** Rapid surveying of DNA sequence variation in natural populations. *Mol. Biol. Evol.* 9: 323-330.

**Lewis, P. O., and Zaykin, D. (2001).** Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. Version 1.0 (d16c).

**Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T.,Beiles, A. and Nevo, E. (2002).** Microsatellites: genomic distribution, stative functions, and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.*, 11, 2453-2465.

**Liu, X.; Marshal, J.; Starý, P.; Edwards, O.; Puterka, G. J.; Dolatti, L.; El Bouhssini, M.; Malinga, J.; Lage, J.; Smith, C.; "in press"(2010).** 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.

**Mantel, N. (1967).** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27: 209-220.

**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.

**Nordborg, M.; Innan, H.; (2002).** Molecular population genetics, *Current Opinion in Plant Biology*, 5: 69-73.

**Palumbi, S. R., (1995).** Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. In: *Molecular Systematics* 2nd edn (eds Hillis D., Moritz C.), pp. 205-247. Sinauer, Sunderland, MA.

**Palumbi, S. R., (1996).** Nucleic Acids II: The Polymerase Chain Reaction. Chapter 7 of *Molecular Systematics II*, Sinauer Press, pp. 241-246.

**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.

**Sefc, K. M., Lefort, F., Grando, M. S., Scott, K. D., Steinkellner, H. and Thomas, M. R. (2001).** Microsatellite markers for grapevine: A state of the art. *Molecular Biology and Biotechnology of Grapevine* (ed. by KA Roubelakis-Angelakis). Kluwer Academic, The Netherlands.

**Shufan, 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.

**Shufan, 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.

- Schlötterer, C. (2000).** Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109, 365-371.
- Slatkin, M., (1991).** Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genet. Res. Camb.* 58: 167-175.
- Slatkin, M. (1995).** A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.
- Starý, P., Basky, Z., Tanigoshi, L. K., Tomanovic, Z., (2003).** Distribution and history of Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Kurdj.) in the Carpathian Basin (Hom., Aphididae), *Anzeiger für Schädlingkunde Journal of Pest Science*, 76: 17-21.
- 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.
- Toth, G., Gaspari, Z. and Jurka, J. (2000).** Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome Res.*, 10, 967-981.
- van Emden, H. F.; Harrington, R.; (2007).** Aphids as Crop Pests, *CAB International, Oxford*, 699 pp.
- 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.

**Weir, B. S. and Cockerham, C. C. (1984).** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.

**Weir, B. S., (1996).** Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data. Sinauer Assoc., Inc., Sunderland, MA, USA.

**Weir, B. S., and Hill, W. G. (2002).** Estimating F-statistics. *Annu Rev Genet* 36, 721-750.

**Wilson, G. A. and Rannala, B. (2003).** Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics*, 163, 1177-1191.

**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.

Internetové zdroje:

[www.nucleodecenio.blogspot.com/2007\\_09\\_01\\_archive.html](http://www.nucleodecenio.blogspot.com/2007_09_01_archive.html)

[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

**Sharma, S. and Yadav, B. R., (2009).** Denaturing Urea-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) Based Microsatellite Analysis.

<http://www.protocol-online.org/prot/Protocols/Denaturing-Urea-Polyacrylamide-Gel-Electrophoresis--PAGE--Based-Microsatellite-Analysis-3466.html>.



## 9. Přílohy

**Příloha 1:** Vzorčky použité při extrakci DNA

<b>Číslo vzorku</b>	<b>Země a oblast sběru</b>	<b>Datum</b>	<b>Hostitelská rostlina</b>	<b>Způsob uchování</b>
1	Francie, Montpellier	12.2.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
2	Tunisko, Enfida	22.4.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
5	Tunisko, Hergla	21.4.2008	<i>Lolium perenne</i>	Etanol
6	Egypt, El-Sheikh Zuwayid	19.4.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
7	Egypt, El-Sheikh Zuwayid	5.4.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
8	Egypt, Rafah	20.3.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
9	Írán, Kerman, Kerman Province	20.4.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
10	Írán, Birjand, South Khorashad Province	20.5.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
11	Írán, Birjand, Bojdi Plain, South Khorasan	21.5.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
12	Turecko, Sarayköy-Konya	26.6.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
13	Turecko, Campus-Konya, Selçuklu	26.6.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
14	Turecko, Karaağaç-Konya, Bahri Dagdas 1,	27.6.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
15	Turecko, Karaağaç-Konya, Bahri Dagdas 2,	27.6.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
16	Turecko, Karaağaç-Konya, Bahri Dagdas 3,	27.6.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
17	Turecko, Çumra-Konya01	2.7.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
18	Turecko, Çumra-Konya02	2.7.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
19	Turecko, Çumra-Konya03	2.7.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
20	Turecko, Meram-Konya	10.7.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
21	Turecko, Beyşehir1 - Konya	12.7.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
22	Turecko, Beyşehir2 - Konya	12.7.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
23	Alžírsko, Ain Kercha (Oum El Bouaghi Dept.)	17.4.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
24	Alžírsko, Ain Djasser (Batna Dept.)	21.4.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
25	Alžírsko, Kais (Khenchela Dept.)	9.5.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
26	Alžírsko, El Khroub (Constantine Dept-)	12.5.2008	<i>Triticum durum</i>	Etanol
27	Alžírsko, Hamla (Batna Dept.)	14.5.2008	<i>Triticum durum</i>	Etanol
28	Alžírsko, Ain Djasser (Batna Dept.)	15.5.2008	<i>Triticum durum</i>	Etanol
29	Alžírsko, Tazoult-Lambese(Batna Dept.)	23.5.2008	<i>Triticum durum</i>	Etanol
30	Alžírsko, Bouzina(Batna Dept.)	23.5.2008	<i>Triticum durum</i>	Etanol
31	USA, Couny line - Juniper Canyon, Blicketon	24.6.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
32	USA, Turpint Ridge Rd., Blicketon WA Benton	24.6.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
33	USA, Pear Ac. IAREC, Prosser, WA, Benton Co.	24.6.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
34	USA, Headquarter Unit IAREC Field H-21, Prosser,	24.6.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
36	Česká republika, Hodonice, Moravia meridionalis	1.7.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
38	Česká republika, Litobratřice, Moravia	1.7.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
39	Česká republika, Bystřice p. Hostýnem, Moravia	16.7.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
40	Česká republika, Třebíč, Bohemia south	16.7.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
41	Chile, Chillian	xx.2.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
42	Maďarsko, Budapest	xx.2.2008	<i>Triticum aestivum</i>	Etanol
43	Španělsko, Alguaire, Lleida Distr.	30.4.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
44	Španělsko, Salt, Girona	7.5.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
45	Španělsko, Vencillón	6.5.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol

46	Španělsko, Santa Maria del Camí (Barcelona)	14.5.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
47	Španělsko, La Pobla de Cérvoles (Lleida Distr.)	16.5.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
48	Španělsko, Cubells (Lleida Distr.)	4.6.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
49	Španělsko, Calaf (Barcelona Distr.)	4.6.2008	<i>Hordeum vulgare</i>	Etanol
50	Moldavsko, SE, Regina	11.7.2009	<i>Triticum vulgare</i>	Etanol

## Příloha 2: Matice pro statistické vyhodnocení

### LOKUS

ApEST39 SmS16b ApEST34 Sa4S Sgg2

#### LOKALITA

FRANCIE1	AA	AA	??	AA	AB
TUNISKO2	BB	BB	??	AA	AA
5	AA	AA	??	AA	AB
EGYPT 6	AA	AA	AB	AB	AB
7	AA	AA	AB	AB	AB
8	AA	AA	??	AA	AB
IRAN 9	AB	AA	AA	AA	AA
10	AB	AA	AA	AA	AA
11	AB	AA	AA	AA	AA
TURECKO12	AB	AA	AA	AB	AB
13	AB	AA	AB	AB	AB
14	AB	AA	AB	AB	AB
15	AB	AA	AB	AB	AB
16	AB	AA	AB	AB	AB
17	AB	AA	AB	AB	AB
18	AB	AA	AB	AB	AB
19	AB	AA	AB	AB	AB
20	AB	AA	AB	AB	AB
21	AB	AA	AB	AB	AB
22	AB	AA	AB	AB	AB
ALZIRSKO23	??	AA	??	AB	AB
24	AA	AA	AA	AB	AB
25	AA	AA	AA	AB	AB
26	AA	AA	AA	AA	AB
27	AA	AA	AB	AB	AB
28	AA	AA	AB	AB	AB
29	AA	AA	AA	AB	AB
30	AA	AA	AA	AB	AB
USA31	AA	AA	AA	AB	AB
32	AA	AA	AA	AA	AB
33	AA	AA	AA	AA	AB
34	AA	AA	AA	AA	AB
CESKO36	AB	AA	AB	AB	AB
38	BB	AA	AB	??	AB
39	BB	AA	AB	AB	AB
40	BB	AA	AB	AB	AA
CHILE41	AA	AA	AA	AA	AB
MADARSKO42	BB	AA	AA	AB	AB
SPANELSKO43	AA	AA	AA	AA	AB
44	AA	AA	AA	AA	AB
45	AA	AA	AA	AB	AB
46	AA	AA	AA	AB	AB
47	AA	AA	AA	AB	AB
48	AA	AA	AA	AB	AB
49	AA	AA	AA	AB	AB
MOLDAVSKO50	AB	AA	AA	AB	AA

### Příloha 3: Geografické vzdálenost mezi jednotlivými lokalitami v kilometrech

	Francie	Tunisko	Egypt	Írán	Ture.	Alžír.	USA	Mold.	Česko	Chile	Maďar.	Španěl.
Francie	0											
Tunisko	1188	0										
Egypt	3054	2237	0									
Írán	4949	4375	2401	0								
Turecko	2543	1959	894	2385	0							
Alžírsko	956	474	2599	4644	2348	0						
USA	8740	9745	10588	11268	10207	9500	0					
Moldav.	2065	2086	1885	2972	1046	2238	9184	0				
Česko	1315	1683	2431	3811	1786	1738	8668	918	0			
Chile	10868	11482	12963	15271	13258	11215	10225	13369	12570	0		
Maďarsko	1272	1561	2108	3608	1462	1547	9079	809	320	12644	0	
Španělsko	397	1191	3100	4955	2661	826	8735	2231	1431	11099	1537	0

### Příloha 4: Variabilita mezi populacemi (Mega 4, Kimura 2-Parameter, Pairwise deletion)

	A.pisum	1-Francie	6-Egypt	7-Egypt	9-Írán	12-Turec	14-Turec	18-Turec	20-Turec									
A.pisum	0,00																	
1-Francie	0,964	0,00																
6-Egypt	1,062	0,034	0,00															
7-Egypt	0,956	0,005	0,039	0,00														
9-Írán	0,964	0,000	0,034	0,005	0,00													
12-Turec	0,956	0,003	0,036	0,003	0,003	0,00												
14-Turec	0,956	0,003	0,036	0,003	0,003	0,000	0,00											
18-Turec	0,980	0,013	0,047	0,013	0,013	0,010	0,010	0,00										
20-Turec	0,967	0,005	0,039	0,005	0,005	0,003	0,003	0,008	0,00									
21-Turec	0,964	0,000	0,034	0,005	0,000	0,003	0,003	0,013	0,005									
23-Alžír	1,307	0,208	0,218	0,207	0,208	0,207	0,207	0,211	0,211									
25-Alžír	1,434	0,203	0,223	0,198	0,203	0,202	0,202	0,207	0,207									
26-Alžír	0,977	0,005	0,039	0,005	0,005	0,008	0,008	0,018	0,010									
27-Alžír	0,968	0,008	0,042	0,003	0,008	0,005	0,005	0,015	0,008									
29-Alžír	0,968	0,008	0,042	0,003	0,008	0,005	0,005	0,015	0,008									
31-USA	0,964	0,010	0,042	0,015	0,010	0,013	0,013	0,023	0,015									
38-Česko	0,956	0,003	0,036	0,003	0,003	0,000	0,000	0,010	0,003									
39-Česko	1,014	0,013	0,047	0,018	0,013	0,015	0,015	0,020	0,018									
40-Česko	0,964	0,000	0,034	0,005	0,000	0,003	0,003	0,013	0,005									
41-Chile	1,079	0,092	0,102	0,098	0,092	0,095	0,095	0,107	0,098									
44-Španěl	1,124	0,087	0,109	0,093	0,087	0,090	0,090	0,102	0,093									
45-Španěl	0,964	0,000	0,034	0,005	0,000	0,003	0,003	0,013	0,005									
	21-Turec	23-Alžír	25-Alžír	26-Alžír	27-Alžír	29-Alžír	31-USA	38-Česko	39-Česko	40-Česko	41-Chile	44-Španěl	45-Španěl					
21-Turec	0,00																	
23-Alžír	0,208	0,00																
25-Alžír	0,203	0,138	0,00															
26-Alžír	0,005	0,203	0,203	0,00														
27-Alžír	0,008	0,212	0,202	0,008	0,00													
29-Alžír	0,008	0,203	0,202	0,003	0,005	0,00												
31-USA	0,010	0,209	0,207	0,015	0,018	0,018	0,00											
38-Česko	0,003	0,207	0,202	0,008	0,005	0,005	0,013	0,00										
39-Česko	0,013	0,212	0,207	0,018	0,020	0,020	0,023	0,015	0,00									
40-Česko	0,092	0,277	0,273	0,092	0,101	0,095	0,085	0,095	0,108	0,00								
41-Chile	0,087	0,239	0,246	0,093	0,096	0,096	0,087	0,090	0,103	0,092	0,00							
44-Španěl	0,000	0,208	0,203	0,005	0,008	0,008	0,010	0,003	0,013	0,087	0,116	0,00						
45-Španěl	0,000	0,208	0,203	0,005	0,008	0,008	0,010	0,003	0,013	0,000	0,092	0,087	0,00					

**Příloha 5:** Distanční matice vytvořena v programu GDA ver.1 (podle algoritmu Nei 1972).

	Egypt	Irán	Turec.	Alžír.	USA	Česko	Chile	Španělsko
Egypt	0,00							
Irán	0,343	0,00						
Turecko	0,222	0,233	0,00					
Alžírsko	0,339	0,085	0,188	0,00				
USA	0,421	0,038	0,185	0,103	0,00			
Česko	0,344	0,073	0,124	0,163	0,027	0,00		
Chile	0,357	0,268	0,211	0,050	0,296	0,360	0,00	
Španělsko	0,418	0,066	0,157	0,134	0,006	0,012	0,331	0,00