

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Diplomová práce

Analýza sekundárních endosymbiontů u vybraných druhů
mšic (Aphididae a Adelgidae)

Bc. Andrea Jarošová

Školitel: PaedDr. Martina Žurovcová, Ph.D.

Školitel specialista: Ing. Jan Havelka, Ph.D.

České Budějovice

2012

Diplomová práce

Jarošová, A., 2012 : Analýza sekundárních endosymbiontů u vybraných druhů mšic (Aphididae a Adelgidae) [Analysis of secondary endosymbionts in selected species of aphids (Aphididae and Adelgidae). Mgr.Thesis, in Czech] –59 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Annotation

Three methods for the detection of endosymbionts were compared on *Diuraphis noxia* (Aphididae) and 8 genera of Adelgidae. Out of these methods (diagnostic PCR, RFLP, DGGE), DGGE was the most successful. In populations of *Diuraphis noxia* 12 bacterial species were detected with no geographical pattern but relation to host plant was suggested. In adelgids 11 species of bacteria were detected with no obvious pattern of coevolution.

Projekt byl financován GAČR, 522/09/1940, ze záměru Entomologického ústavu Z50070508 a Přírodovědecké fakulty JU.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích, 27. 4. 2012

.....

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce Martině Žurovcové za odborné vedení, pomocnou ruku a poskytnutí zázemí při zpracování mé diplomové práce. Dále děkuji Janu Havelkovi a Petru Starému za poskytnutí studovaného materiálu. Danče Chundelové a Aniče Sattranové děkuji za jejich pomoc, dobrou náladu a vytvoření příjemné atmosféry. Za cenné rady děkuji i Lucce Kučerové. A v neposlední řadě chci poděkovat také své rodině a přátelům, kteří mi byli oporou po celou dobu studia.

Obsah

1.	Úvod	1
1.1.	Aphididae	1
1.2.	Adelgidae	2
1.3.	Endosymbionti	3
1.4.	16S rDNA (malá ribosomální podjednotka u prokaryot)	4
1.5.	Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)	5
1.6.	Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP).....	6
2.	Cíle	7
3.	Metodika.....	8
3.1.	Materiál	8
3.2.	Extrakce DNA.....	8
3.2.1.	Izolace pomocí DNeasy Tissue Kit (QIAGEN)	8
3.2.2.	Izolace prostřednictvím „Squishing buffer“ (SB) (Gloor et al., 1993).....	8
3.2.3.	Izolace pomocí Invisorb Spin Tissue Mini Kit (Invitex).....	9
3.3.	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	9
3.3.1.	Použité primery	9
3.3.2.	Reakční směs	11
3.3.3.	PCR profil.....	11
3.4.	Standardní agarózová elektroforéza.....	12
3.5.	Purifikace PCR	13
3.5.1.	Čištění pomocí směsi ExoSAP	13
3.6.	Restrikční analýza RFLP (polymorfismus délky restrikčních fragmentů)	14
3.7.	Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)	15
3.7.1.	Příprava gelu.....	15
3.7.2.	Elektroforéza	17
3.7.3.	Izolace DNA z gelu a sekvenace	17
3.8.	Vyhodnocení a zpracování sekvencí.....	18
4.	Výsledky	19
4.1.	Diagnostické PCR.....	19
4.1.1.	<i>Diuraphis noxia</i>	19
4.1.2.	Adelgidae.....	19
4.2.	RFLP.....	20
4.3.	DGGE	21
4.3.1.	<i>Diuraphis noxia</i>	21
4.3.2.	Adelgidae.....	25
5.	Diskuze	33
5.1.	Extrakce DNA.....	33
5.2.	Diagnostické PCR.....	33
5.3.	DGGE	34
5.3.1.	Gel a elektroforéza.....	34
5.3.2.	<i>Diuraphis noxia</i>	34
5.3.3.	Adelgidae.....	35
5.4.	RFLP.....	36
6.	Závěr.....	37
7.	Literatura	38
8.	Přílohy	46

1. ÚVOD

Symbióza je z hlediska evoluce jedním z nejzajímavějších vztahů mezi organismy, neboť svým způsobem obohacuje oba zúčastněné druhy a zvyšuje tak i celkovou biodiverzitu. Z mnohobuněčných organismů se pak jeví hmyz jako skupina, která je vůči různým mikroorganismům nejvíce tolerantní a vazba k endosymbiontům může být od velice těsné až po téměř náhodnou. Z tohoto důvodu jsou zástupci hmyzu nejlepším materiálem pro studium mezidruhové symbiozy (Ishikawa, 2003). Z historického hlediska patří k prvním prozkoumávaným skupinám mšice, u kterých byli endosymbionti detekováni již v 19. století (Douglas, 2003). Jak se však v průběhu času ukazuje, vazba mezi mšicemi a endosymbionty je natolik komplikovaná a u různých čeledí může být velice odlišná, takže do dnešního dne není zcela kompletně popsána.

Mšice (Aphidomorpha) jsou známy jako škůdci v zemědělství, lesnictví i zahradnictví, ale zároveň jsou i jednou z nejzajímavějších skupin hmyzu živícího se na rostlinách. Proto přitahují pozornost biologů, kteří je studují z hlediska jejich ekologie, fyziologie, biodiverzity, chování i genetiky. Počet druhů je odhadován na 5000 (Footitt *et al.*, 2008), z toho více jak 250 druhů patří mezi rostlinné škůdce (Blackman & Eastop, 2000). Kromě mechanického poškození škodí rostlinám také tím, že slouží jako přenašeče pro rostlinné viry (Chan *et al.* 1991).

1.1. Aphididae

Čeď Aphididae (Hemiptera: Sternorhyncha: Aphidoidea) spolu se svými blízkými příbuznými čeleděmi Adelgidae a Phylloxeridae (Hemiptera: Sternorhyncha: Phylloxeridoidea) tvoří skupinu hmyzu, která se živí sáním rostlinných šťáv a pro kterou jsou typické složité generační cykly (Dixon, 1998). Někteří autoři zahrnují všechny tři zmíněné skupiny do společné nadčeledi Aphidoidea (Blackman & Eastop, 1994; Havill & Footitt, 2007).

Partenogenetické samice se mohou vyskytovat buď jen v některých, nebo také ve všech generacích, a charakteristická je pro ně viviparie a rozmnožování bez oplodnění. U druhů, u kterých se asexuální reprodukce střídá se sexuální, hovoříme pak o cyklické partenogenezi.

Velikost těla se pohybuje mezi 1 a 10 mm (Dixon, 1998), ale přes svou drobnost dokážou napáchat značné škody, a to nejen v místě původu, ale i jako invazní druh (Starý,

1999; Messing *et al.*, 2007). Okřídlení jedinci mohou být unášeny větrem na velké vzdálenosti nebo mohou být rozšiřovány spolu rostlinami, na kterých žijí. Je to dáno nejen tím, že se jejich generační doba pohybuje kolem 10 dní, ale také tím, že již v těle nenarozené dcery se vyvíjí další samice, což mšicím umožňuje rychlé namnožení za velmi krátkou dobu (Dixon, 1998). To jim mj. poskytuje možnost přizpůsobovat se sezónním podmínkám (Heie, 1987).

Mšice se vyskytují téměř na celém světě, ale hlavní areál rozšíření tvoří mírný podnebný pás (Dixon, 1998).

Ačkoli část významných rostlinných škůdců patří mezi polyfágy (živí se na různých rostlinných hostitelích), většina mšic je druhově značně specifická. Jejich hostitele tvoří jeden nebo několik velmi příbuzných druhů rostlin (Eastop, 1973). Výjimkou je třeba *Myzus persicae*, které jako potrava slouží rostliny stovek druhů napříč čeleděmi (Dadd & Mittler, 1965).

1.2. Adelgidae

Pro zástupce čeledi Adelgidae, neboli korovnice, jsou charakteristické složité generační cykly spojené se střídáním generací i hostitelů. Narozdíl od Aphididae a Phylloxeridae se živí sáním rostlinných šťáv pouze na jehličnatých stromech a po celý život jsou oviparní. Areál jejich rozšíření lze nalézt na severní polokouli, ale některé druhy byly zavlečeny i do dalších koutů světa (Havill & Footit, 2007). Popsáno je kolem 70 druhů (Blackman & Eastop, 1994). U 50 zástupců korovnicovitých jsou popsány jejich životní cykly (Havill & Footit, 2007). Z těchto je 19 druhů holocyklických, 8 anholocyklických na hostiteli rodu *Picea* a 23 korovnic anholocyklických, ale žijících na sekundárním hostiteli. U nás se vyskytuje 17 druhů. Obecně jsou u korovnic rozlišovány dva typy životních cyklů, úplný a neúplný.

Úplný cyklus (holocyklus) je dvouletý, vyznačuje se střídáním dvou hostitelů a pouze druhy s tímto generačním cyklem se rozmnožují sexuálně. Primárním hostitelem je smrk (*Picea* spp.) a mezi sekundární hostitele patří zástupci několika dalších rodů jehličnatých stromů – *Abies*, *Larix*, *Pseudotsuga*, *Tsuga* nebo *Pineus* (Havill & Footit, 2007). Druhý vývojový cyklus - anholocyklus trvá jen jeden rok, korovnice se při něm rozmnožují pouze partenogeneticky a setrvávají na jednom hostiteli. Tím může být jakýkoli jehličnan z výše uvedených rodů.

1.3. Endosymbionti

Symbiotický vztah mezi hmyzem a bakteriemi je poměrně běžný (Buchner, 1965; Dasch *et al.*, 1984). Více než 10 % hmyzích druhů se při svém vývoji a přežití spoléhá na intracelulární bakterie (Bauman *et al.*, 2006). Tím, že jsou určité skupiny hmyzu potravně úzce specializované, potřebují k životu další zdroj živin, které jim jejich nevyvážená strava neposkytuje. Jako mnoho zástupců mšicosavých (Sternorrhyncha) se i mšice živí sáním rostlinných šťáv a spoléhají se při tom na bakteriální endosymbionty, kteří jim nedostatky v jejich jednoduše potravě doplní (Baumann *et al.*, 1998; Douglas, 1998). Tyto bakterie např. recyklují glutamát, který je jejich hostiteli produkován jako odpadní látka metabolismu, a vytvářejí z něj pro mšice esenciální aminokyseliny (Whitehead & Douglas, 1993).

Primární endosymbiont

Mšice představují jeden z nejprostudovanějších případů takové symbiomy (Moran, 2001). Téměř všechny obsahují primárního endosymbionta rodu *Buchnera* patřícího mezi γ -proteobakterie (Munson *et al.*, 1991). U čeledi Phylloxeridae tento symbiont chybí.

Tyto symbiotické bakterie se nalézají ve specializovaných buňkách nazývaných bakteriocyty a jsou vertikálně přenášeny z matky na potomstvo (Buchner, 1965; Baumann *et al.*, 1998). K maternálnímu přenosu dochází ještě před narozením jedince nebo snesením vajíčka a prostředníkem je zde hemolymfa. Soužití mšice a této bakterie je evolučně staré a odhaduje se, že k infekci došlo asi před 150 milióny lety (von Dohlen & Moran, 2000)

Buchnera aphidicola je blízce příbuzná druhu *Escherichia coli*, od které divergovala před zhruba 420 milióny lety (Unterman *et al.*, 1989), avšak během evoluce došlo ke značné redukci jejího genomu, který svou velikostí i počtem genů představuje jen 15 % svého původního stavu (Shigenobu *et al.*, 2000)

Sekundární endosymbiont

Kromě primárního endosymbionta vlastní mnoho mšic další zástupce bakteriální říše, kteří jsou nazýváni sekundární či fakultativní (Buchner, 1965; Untermann *et al.*, 1989; Sandström *et al.*, 2001). Stejně jako *Buchnera aphidicola* jsou i sekundární endosymbionti přenášeny maternálně (Burke *et al.*, 2009), avšak při krmení na kontaminované rostlině, je běžný i horizontální přenos (Sandström *et al.*, 2001; Russell *et al.*, 2003).

Tyto mikroorganismy poskytují svým hostitelům různé výhody. Může jimi být možnost lépe zužitkovat hostitelskou rostlinu (Tsuchida *et al.*, 2004), teplotní tolerance (Montllor *et al.*, 2002), či schopnost kompenzovat ztrátu primárního endosymbionta (Koga *et al.*, 2003). Jiné druhy jim zase poskytují značnou ochranu proti různým přirozeným nepřátelům, kterými mohou být patogenní houby (Scarborough *et al.*, 2005), viry (Hedges *et al.*, 2008), parazitoidi (Oliver *et al.*, 2003; Vorburger *et al.*, 2010) či parazitičtí nematodi (Jeanike *et al.*, 2010).

Některé sekundární symbiotické bakterie nalezené u mšic jsou známé také svou schopností zasahovat do reprodukce svých hostitelů z řad členovců. *Rickettsia*, *Spiroplasma* a *Wolbachia* u nich mohou indukovat smrt samečků, feminizaci anebo partenogenezi (Engelstadter & Hurst, 2009). U *Acyrtosiphon pisum* byla prokázána schopnost bakterie *Spiroplasma* indukovat smrt samečků, avšak jinak sekundární endosymbionti na reprodukci mšic vliv nemají (Simon *et al.*, 2011). Symbiotické vztahy u *A. pisum* jsou poměrně hojně zkoumány, a tak právě u tohoto druhu bylo objeveno, že endosymbiont *Rickettsiella* mění barvu svého hostitele z červené na zelenou (Tsuchida *et al.*, 2010). To sice může být výhodné, protože to snižuje nebezpečí, že tato mšice bude sežrána sluníčkem, avšak zvyšuje to nebezpečí napadení parazitickou vosičkou. Bakterie *Regiella insecticola* u mšice ovlivňuje výběr hostitelské rostliny (Ferrari *et al.*, 2007), *Hamiltonella insecticola* poskytuje odolnost k parazitoidům (Oliver *et al.*, 2006) a *Serratia symbiotica* svého hostitele chrání, pokud je vystaven vyšším teplotám (Burke *et al.*, 2009)

1.4. 16S rDNA (malá ribosomální podjednotka u prokaryot)

První návrh využití sekvence genu pro zjištění fylogenetických vztahů mezi organizmy se objevil již v 60. letech (Zuckerlandl & Pauling, 1965). Woese a Fox (1977; Woese, 1987) poté k tomuto účelu začali využívat sekvence genů kódujících rRNA. Na základě 16S rRNA se jim podařilo rozdělit živé organizmy na 3 hlavní skupiny – archebakterie, eubakterie a eukaryota.

Důvodů, proč jsou ribosomální geny široce využívány ke studiu fylogenetických a evolučních vztahů, je hned několik. Ribosomální RNA je nezbytná pro syntézu proteinů a jako taková se nejen nachází ve všech organizmech, ale její struktura a funkce jsou konzervované. Obsahuje však i variabilní úseky, a to jak v primární, tak v sekundární struktuře. V neposlední řadě u ní dochází ke změnám v sekvenci velmi pomalu a nevykazuje horizontální přenos genů, který u některých jiných prokaryotických genů není výjimkou. (Olsen *et al.*, 1986)

Sekvence genu pro 16S rRNA je dlouhá přibližně 1550 bp a přítomnost úseků velmi konzervovaných ale i variabilních umožňuje její využití k různým studiím (Clarridge, 2004). Vysoce konzervované fragmenty mohou být použity při analýzách sekvencí genů (Edwards *et al.*, 1989) či k identifikaci neznámých bakterií na rodové úrovni (Fukushima *et al.*, 2002). Variabilní místa pak slouží k rozlišení organismů na nižších taxonomických úrovních (Klijn *et al.*, 1991; Kullen *et al.*, 2000). 16S rRNA se stala hojně využívaným nástrojem nejen při fylogenezi (Weisberg *et al.*, 1991), ale také v oblasti mikrobiální ekologie (Olsen *et al.*, 1986; Amann *et al.*, 1995; Case *et al.*, 2007) a své uplatnění nachází i v klinické mikrobiologii (Kullen *et al.*, 2000)

1.5. Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

Gelová elektroforéza s denaturačním gradientem je metoda široce používaná v mikrobiální ekologii, kde napomáhá při určování struktury a dynamiky populací (von Wintzingerode, 1997; Green *et al.*, 2009). Své využití našla i na poli medicíny (Costabile *et al.*, 2006), kde je využívána její schopnost odhalit i jednobodové mutace (Muyzer & Smalla, 1998). Protože umožňuje detekovat mikrobiální složení, je využívána i ke zjišťování přítomnosti mikrobiálních endosymbiontů u různých skupin hmyzu. Příkladem jsou vosy (Reeson *et al.*, 2003), klíšťata (Moreno *et al.*, 2006), mravenci (Stoll *et al.*, 2007), molice (Gottlieb *et al.*, 2006), ale i mšice (Haynes *et al.*, 2003; Swanevelter *et al.*, 2010).

DGGE je elektroforetická metoda, která separuje stejně dlouhé sekvence dsDNA na základě rozdílů v pořadí nukleotidů (Myers *et al.*, 1985; Green *et al.*, 2009). Využívá při tom odlišné stability GC a AT párů. Polyakrylamidový gel, na který jsou vzorky po PCR amplifikaci nanášeny, obsahuje vzrůstající gradient DNA denaturantů (formamid a močovina). Ten je vytvářen při nalévání gelu postupným smícháním roztoků s nižším a vyšším zastoupením těchto denaturačních látek. Denaturace dsDNA značně snižuje její mobilitu gelem (Muyzer *et al.*, 1993), takže sekvence mající vyšší obsah GC bazí a tím pádem setrvávající delší dobu ve formě dvouřetězce, putují dále. K zastavení dochází až při dosažení vyšších koncentrací denaturantů, kdy dojde k úplné disociaci. Protože by však jednořetězcové fragmenty mohly snadno vycestovat z gelu ven, používá se při PCR amplifikaci tzv. GC-svorka (Myers *et al.*, 1985; Sheffield *et al.*, 1989). Jedná se o sekvenci přibližně 40 G a C bazí, která se připojuje na 5' konec forwardového primeru a při PCR amplifikaci se stává součástí naamplifikovaného DNA fragmentu. Výsledkem je, že každý

amplikon obsahuje tuto sekvenci, což mj. zlepšuje kvalitu bandů, protože přítomnost jednořetězců způsobuje jejich neostrost.

K vizualizaci proužků může být použito několik metod. Mezi nejčastější patří ethidium bromid nebo SYBR Green I. Výhodou SYBR Green je to, že neobarvuje pozadí gelu, což umožňuje pozorování i fragmentů, které jsou přítomny v nižších koncentracích (Muyzer & Smalla, 1998). Ještě citlivější je metoda obarvení stříbrem (Felske *et al.*, 1996).

Mezi určité nevýhody této elektroforetické metody patří maximální velikost fragmentů, které mohou být používány. Ta se pohybuje kolem 500 bp (Myers *et al.*, 1985). Získaná sekvence tak nemusí poskytnout dostatek informací pro následné fylogenetické analýzy. Jako další záludnost uvádí Muyzer *et al.* (1993) skutečnost, že pouze ty bakteriální populace, které představují více než 1 % z celého společenství, mohou být pomocí DGGE detekovány.

1.6. Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

Restrikční enzymy byly izolovány z bakterií, kde slouží jako obrana proti cizorodé DNA (nejčastěji virové), a samotná bakteriální DNA je proti jejich působení chráněna metylací (Botstein *et al.*, 1980).

Metoda RFLP využívá schopnosti restrikčních endonukleáz rozeznat krátké palindromické sekvence dsDNA a v tomto místě rozštěpit fosfodiesterovou vazbu na každé straně dvouřetězce (Botstein *et al.*, 1980). Rozeznávané úseky jsou dlouhé nejčastěji 4 – 6 bazí. DNA fragmenty mohou být poté analyzovány pomocí elektroforézy, při které dojde k rozdělení úseků podle jejich velikosti. Výsledky mohou být použity pro nejrůznější molekulární aplikace. Své uplatnění najdou například jako genetické markery (Potter *et al.*, 1975; Dookun *et al.*, 2001), při diagnostice dědičných chorob (Saiki *et al.*, 1985; Valaei *et al.*, 2009) nebo při genetické daktyloskopii v kriminalistice (Gill & Werrett, 1987; Decorte, 2010).

2. CÍLE

- Porovnat vhodnost diagnostického PCR, RFLP a DGGE pro detekci bakteriálních endosymbiontů u *D. noxia* a čeledi Adelgidae se zaměřením na sekundární endosymbionty.
- Analyzovat druhové spektrum detekovaných endosymbiontů ve vztahu k rozšíření na hostitelské rostlině (*D. noxia*), případně otestovat možné koevoluční vazby (Adelgidae).

3. METODIKA

3.1. Materiál

Zkoumaný materiál (Příloha 1 a 2) sesbírali, determinovali a následně poskytli Ing. Jan Havelka, Ph.D. a RNDr. Petr Starý, DrSc. (oba ENTÚ, Biologické centrum AV ČR). Vzorky byly uchovávány buď v 98% etanolu, nebo byly ihned po sběru a identifikaci zamraženy a při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ uskladněny v mrazáku až do dalšího zpracování. Nasbírány byly v letech 2008 až 2011. Část mnou užitých vzorků byla použita také v publikaci od Žurovcová *et al.* (2010).

Pro optimalizaci metod detekce bylo získáno 5 vzorků *Acyrtosiphon pisum*, ze kterých 4 byly uměle infikované každý jinou sekundární bakterií (*Serratia symbiotica*, *Rickettsia sp.*, *Hamiltonella defensa* a *Regiella insecticola*) a jeden sloužil jako negativní kontrola. Tyto referenční vzorky poskytl Dr. Jean-Christophe Simon z francouzského Národního institutu pro výzkum v zemědělství (INRA, Rennes, Francie).

3.2. Extrakce DNA

Pokud se pro izolaci DNA používaly lihové vzorky, byli jedinci před extrakcí ponecháni pár minut na kousku buničité vaty za účelem odpaření přebytečného etanolu. Ten by mohl inhibovat izolaci.

K izolaci bylo použito 2 až 5 klonálních jedinců na jeden vzorek a extrakce proběhla pomocí jedné z následujících metod.

3.2.1. Izolace pomocí DNeasy Tissue Kit (QIAGEN)

Postup proběhl dle návodu výrobce. Pro zvýšení výtěžnosti byla však závěrečná eluce rozdělena do dvou frakcí (objem 100 a 75 μl). Z první frakce bylo odpipetováno 50 μl a s tímto vzorkem bylo dále pracováno. Uchováván byl při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zbytek první frakce a celá druhá frakce byly zamraženy při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pro pozdější použití.

3.2.2. Izolace prostřednictvím „Squishing buffer“ (SB) (Gloor et al., 1993)

Pipetou bylo nabráno 50 μl SB (10 mM TRIS-Cl, pH 8,2, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl a 200 $\mu\text{g/ml}$ proteinázy K) a pomocí špičky s tímto roztokem byl vzorek

v mikrozkuhavce (0,5 ml) homogenizován. Po dokončení byl zbylý SB ze špičky vytlačen ke vzorku.

Vzorek byl inkubován při 37 °C 20 až 30 min a poté byla teplota navýšena na 95 °C. Při působení této teploty po dobu 2 minut došlo k inaktivaci proteinázy K. Izolovaná DNA byla buď rovnou použita do PCR reakce, nebo byla zamražena pro pozdější použití.

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

3.2.3. Izolace pomocí Invisorb Spin Tissue Mini Kit (Invitex)

Bylo postupováno podle návodu výrobce a závěrečná eluce proběhla stejně jako u izolace pomocí DNeasy Tissue Kit.

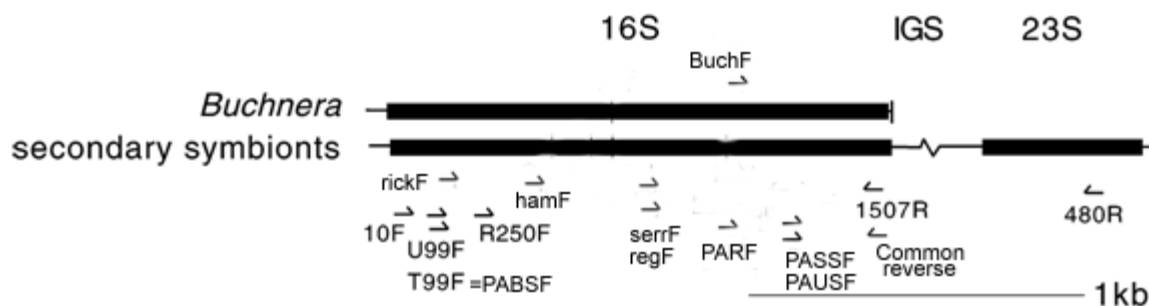
3.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

3.3.1. Použité primery

V následující tabulce (Tab. 1) je přehled primerů, které byly použity při jednotlivých metodách detekce. Ve všech případech šlo o amplifikaci úseku DNA pro 16S rRNA. Při použití reversního primeru 480R byl součástí ampikonu i mezigenový mezerník (IGS, intergenic spacer) a část genu pro 23S rRNA (Obr. 1). Primery užití při metodě DGGE a RFLP spolu s primery Common reverse a 480R se nacházejí v konzervované oblasti použitého ribosomálního genu, respektive genu pro 23S rRNA u 480R. Zbylé primery nasedají v druhově specifických částech genu. Konkrétně primery PABSF a T99F cílí na bakterii *Hamiltonella defensa*, PARF na druh *Rickettsia* sp., PAUSF a U99F na endosymbionta *Regiella insecticola* a PASSF a R250F jsou specifické pro druh *Serratia symbiotica*.

Pro techniku DGGE byly vyzkoušeny dvě dvojice primerů. U páru pA8f/PRUN518r byla očekávaná délka fragmentu cca 560 bp (Fjellbirkeland *et al.*, 2001), u druhé dvojice (341F/907R) cca 550 bp (Gottlieb *et al.*, 2006).

Primery serrF, hamF, regF a rickF byly navrženy na základě sekvencí získaných z referenčních vzorků z Francie.



Obr. 1 Pozice nasedání primerů dle Sandström *et al.* (2001) – upraveno

Tab. 1 Přehled použitých primerů

metoda	primer	sekvence primeru 5' → 3'	autor
DGGE	pA8f*	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	Edwards <i>et al.</i> (1989)
	PRUN518r	ATT ACC GCG GCT GCT GG	Muyzer <i>et al.</i> (1993)
	341F**	CCT ACG GGA GGC AGC AG	Muyzer <i>et al.</i> (1993)
	907R	CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT	Muyzer <i>et al.</i> (1993)
Diagnostické PCR	BuchF	CTG TTG CCA GCC AGC GGT TCG GC	Leonardo & Muiru (2003)
	PABSF	AGT GAG CGC AGT TTA CTG AG	Leonardo & Muiru (2003)
	PARF	CCA ACC CTT GAC ATG GTG GT	Leonardo & Muiru (2003)
	PAUSF	CGG CGA GCG TGC GAA CGT AAG CGA	Leonardo & Muiru (2003)
	PASSF	TAT ACA AAG AGA AGC GAC CTC G	Leonardo & Muiru (2003)
	Common reverse	CCC CTA CGG TAA CCT TGT TAC GAC	Leonardo & Muiru (2003)
	R250F	GGT AGG TGG GGT AAC GGC TC	Sandström <i>et al.</i> (2001)
	U99F	ATC GGG GAG TAG CTT GCT AC	Sandström <i>et al.</i> (2001)
	T99F	AGT GAG CGC AGT TTA CTG AG	Sandström <i>et al.</i> (2001)
	480R	CAC GGT ACT GGT TCA CTA TCG GTC	Sandström <i>et al.</i> (2001)
	serrF	CTT GAG GGG TGG CTT CCG TAG	Jarošová
	hamF	GGA AGC GAT AAA TGC GAA TTAC	Jarošová
	regF	GTG GCC TAG TGT TAT GGC GTC	Jarošová
rickF	CTG CGG AGG AAA GAT TTA TCG	Jarošová	
RFLP	10F	AGT TTG ATC ATG GCT CAG ATT G	Sandström <i>et al.</i> (2001)
	1507R	TAC CTT GTT ACG ACT TCA CCC CAG	Sandström <i>et al.</i> (2001)

*GC-svorka, 5'-CGCCCGCCGCGCGCGGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG-3'

** GC-svorka, 5'-CGCCCGCCGCGCCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCCG-3'

3.3.2. Reakční směs

Standardně byl Master mix míchán do 12,55 μl (Tab. 2). Pro metodu DGGE byla pak reakční směs připravována ve dvojnásobném objemu, při RFLP ve čtyřnásobném objemu.

Tab. 2 Složení reakční směsi

ddH ₂ O	7,2 μl
BSA	0,5 μl
10 x ExTaq pufr	1,25 μl
dNTPs (2,5 mM)	1 μl
Primer forward (5 μM)	0,75 μl
Primer revers (5 μM)	0,75 μl
UNIS Taq polymeráza (5U/ μl)	0,1 μl
DNA	1 μl

3.3.3. PCR profil

PCR reakce probíhaly na termocyklerech Mastercycler ep gradientS (Eppendorf) a TC-XP Cyclor (Bioer) podle následujících programů (Tab. 3).

U elektroforetické analýzy DGGE byly nejprve vyzkoušeny profily uváděné v původních publikacích. Pro primery pA8f/PRUN518r (Fjellbirkeland *et al.*, 2001) bylo navrhováno: úvodní denaturace při 92 °C po dobu 5 min, následovalo 30 cyklů denaturace (30 s při 92 °C), annealingu (30 s při 55 °C) a elongace (30 s při 72 °C) a pak ještě postelongace 4 min při 72 °C. U primerů 341F/907R (Gottlieb *et al.*, 2006) byl doporučován profil: denaturace po dobu 2 min při 95 °C, poté 30 cyklů 30 s při 92 °C, 30 s při 58 °C a 30 s při 72 °C a konečná extenze při 72 °C po dobu 5 min. Následně byl pro obě dvojice primerů používán jednotný profil uvedený v Tab. 3.

Základní profil Endos1 byl použit u kombinace forwardových primerů BuchF, PASSF či PARF s reversním primerem Common reverse k detekci endosymbionta *Buchnera aphidicola*, respektive *Serratia symbiotica*, respektive *Rickettsia* sp. Při detekci druhu *Hamiltonella defensa* byly použity primery PABSF/Common reverse a oproti předchozímu programu byla teplota annealingu navýšena na 68 °C a počet cyklů vzrostl na 33. Dvojice primerů PAUSF/Common reverse cílila na endosymbionta *Regiella insecticola* a u základního profilu došlo ke snížení doby annealingu na 30 s a byl přidán samostatný elongační krok (45 s při 72 °C). (Leonardo & Muir, 2003)

Amplifikace pomocí specifických primerů R250F, U99F, T99F a universálního primeru 480R probíhala při profilu Endos_new (Sandström *et al.*, 2001).

Primery serrF, regF, hamF a rickF byly kombinovány s Common reverse primerem, přičemž pro první dva specifické primery byl používán program Endosi_new3 a zbylé dva byly použity na profil Endosi_new4.

K získání PCR produktů pro restriční štěpení byly použity primery 10F a 1507R a amplifikace probíhala při programu RFLP.

Tab. 3 PCR profily

	Endos1		Endosi_new4		Endosi_new3	
	teplota (°C)	doba (s)	teplota (°C)	doba (s)	teplota (°C)	doba (s)
1. predenaturace	94	420	94	120	94	120
2. denaturace	94	30	94	30	94	30
3. annealing	62	60	60	35	64	35
4. elongace	-	-	72	45	72	30
5. postelongace	72	420	72	120	72	120
6. uchovávání	4	∞	4	∞	4	∞
opakování kroků 2-4	30x		32x		32x	

	RFLP		DGGE		Endos_new	
	teplota (°C)	doba (s)	teplota (°C)	doba (s)	teplota (°C)	doba (s)
1. predenaturace	94	60	94	120	94	120
2. denaturace	94	60	94	30	94	60
3. annealing	55	60	58	30	54	60
4. elongace	72	120	72	30	72	90
5. postelongace	72	180	72	120	72	120
6. uchovávání	4	∞	4	∞	4	∞
opakování kroků 2-4	33x		35x		30x	

3.4. Standardní agarózová elektroforéza

Elektroforéza byla použita k ověření úspěšnosti amplifikace při PCR reakci a ke kontrole velikosti získaného fragmentu DNA.

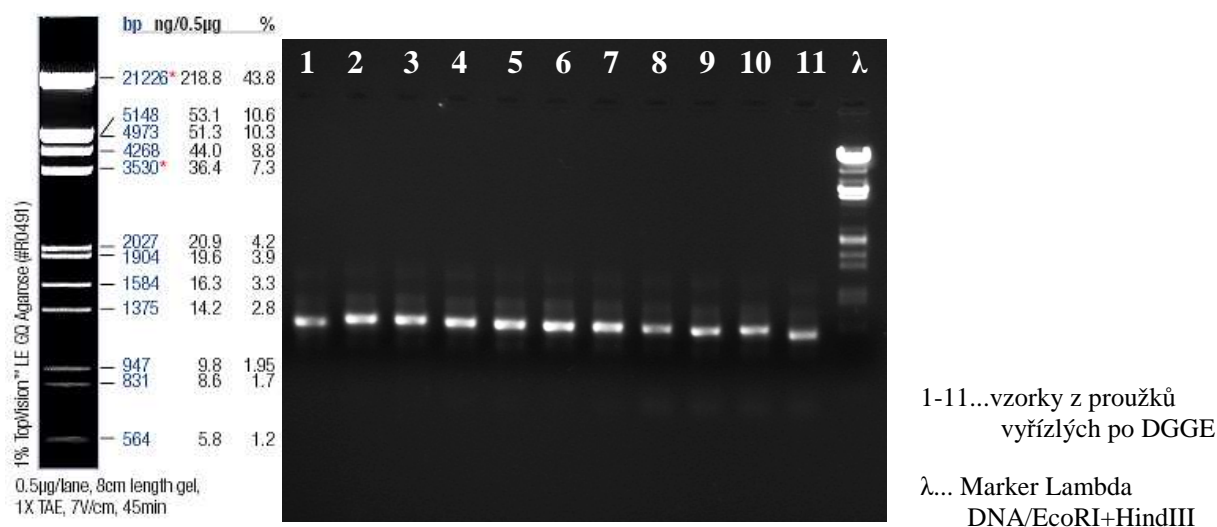
Byl použit 1,5% gel (1,5 g agarózy (SeaKem LE Agarose, Cambrex) bylo rozpuštěno v 98,5 ml 1x TAE pufru (50x TAE pufr: 242 g TRIS, 57,1 ml kys. octové, 100 ml 0,5 M EDTA, 1000 ml H₂O, pH = 8,0)). Směs byla rozvařena v mikrovlnné troubě, a poté ochlazena na cca 50 až 60 °C. Pak bylo přidáno 10 µl/100 ml ethidium bromidu (koncentrace 5 µg/ml), gel byl nalit do formy a byly do něj vloženy hřebínky pro tvorbu

jamek. Tuhnutí trvalo při pokojové teplotě 30 až 40 min. Hotový gel byl použit rovnou při elektroforéze nebo uchováván v 1x TAE pufru při 4 °C v chladničce.

Na gel byl nanesen 1 µl vzorku smíchaného se 3 µl nanášecího roztoku („loading dye“: 700 µl ddH₂O, 300 µl 100% glycerolu, 0,5 mg bromfenolové modři) a elektroforéza běžela při 120 V přibližně 40 min dle délky očekávaného fragmentu.

DNA byla zviditelněna na UV transiluminátoru (UVP Transilluminator) spojeném s digitální kamerou, kterou byly pořízeny fotografie výsledného gelu (Obr. 2).

K odhadu velikosti fragmentu naamplifikované DNA byl použit velikostní marker Lambda DNA/EcoRI+HindIII (Fermentas).



Obr. 2 Ověření úspěšnosti reamplifikaci po DGGE

3.5. Purifikace PCR

3.5.1. Čištění pomocí směsi ExoSAP

Při čištění pomocí směsi ExoSAP-IT[®] (USB) byl použit protokol od výrobce, avšak množství Exosapu bylo sníženo a doba inkubace prodloužena. K PCR produktu (10 až 11 µl) bylo na ledu přidáno 1,5 µl ExoSAPu (0,5µl Exo I a 1 µl SAP), výsledná směs byla promíchána pomocí vortexu a následně inkubována v termocykleru při 37 °C 30 min a při 80 °C 15 min. Ve druhém kroku došlo k inaktivaci obou enzymů. Produkt byl poté ihned použit nebo byl zamražen pro další použití.

3.6. Restrikční analýza RFLP (polymorfismus délky restrikčních fragmentů)

Pro tuto metodu byl využit PCR produkt získaný prostřednictvím primerů 10F a 1507R (Tab. 1), které naamplifikují většinu délky genu pro 16S RNA a jsou universální pro všechny eubakterie (Sandström *et al.*, 2001). PCR reakce probíhala za podmínek uvedených v Tab. 3. Pro následné štěpení byly použity restrikční endonukleázy ClaI, SacI, Sall a XbaI. Sandström *et al.* (2001) sice ve své práci používá enzym SstI, ten byl však v mé práci nahrazen enzymem SacI. Tato endonukleáza sdílí s prvně jmenovanou jak rozeznávané místo, tak i způsob štípání.

Rozeznávaná sekvence a způsob štěpení použitých enzymů je znázorněn v Tab. 4.

Tab. 4 Charakteristika použitých restrikčních endonukleáz dle databáze REBASE

(<http://rebase.neb.com>)

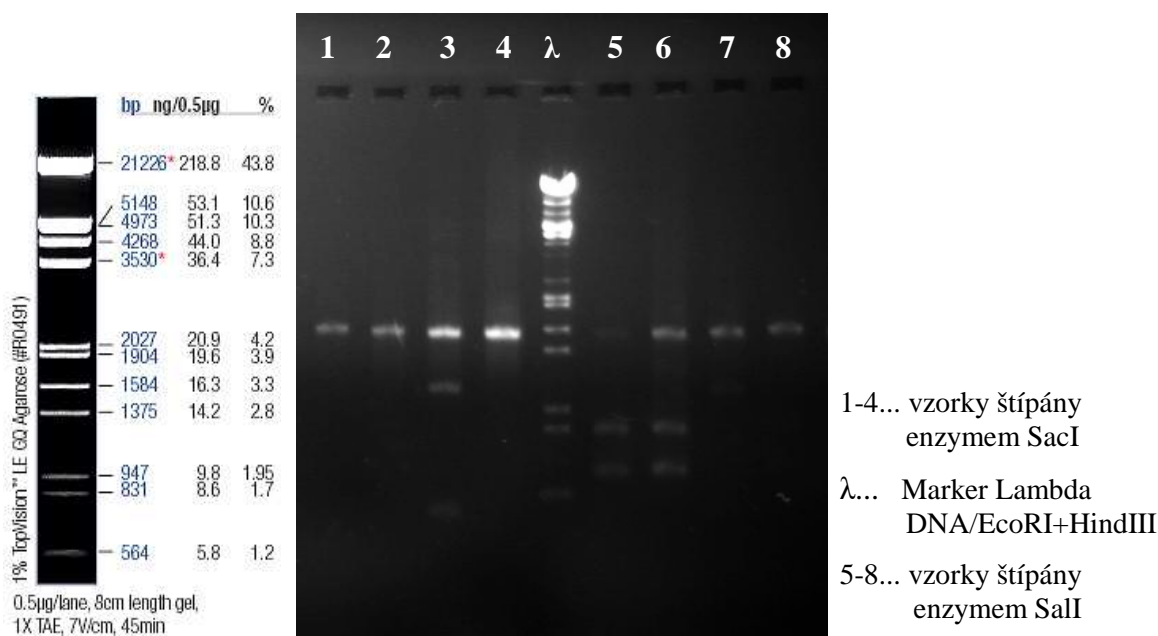
enzymy	Rozeznávaná sekvence	Způsob stříhu
ClaI	5' ATCGAT 3' 3' TAGCTA 5'	5' ---AT CGAT--- 3' 3' ---TAGC TA--- 5'
SacI	5' GAGCTC 3' 3' CTCGAG 5'	5' ---GAGCT C--- 3' 3' ---C TCGAG--- 5'
Sall	5' GTCGAC 3' 3' CAGCTG 5'	5' ---G TCGAC--- 3' 3' ---CAGCT G--- 5'
XbaI	5' TCTAGA 3' 3' AGATCT 5'	5' ---T CTAGA--- 3' 3' ---AGATC T--- 5'

Vzorky po amplifikaci byly přečištěny pomocí kitu „DNA clean-up“ firmy QIAGEN. Byl dodržen postup dle výrobce a eluce byla provedena do 40 µl ddH₂O. Každý PCR produkt byl použit při 6 štěpeních – každý enzym zvlášť, všechny enzymy dohromady a k poslední kontrolní sadě nebyl přidán žádný enzym. Očekávané velikosti fragmentů jsou vypsány v Tab. 5.

Tab. 5 Očekávané délky fragmentů dle Sandström *et al.* (2001) (bp)

enzymy	<i>Buchnera</i>	R-type	T-type	U-type
ClaI	-	-	-	468+1032
SacI	-	471+1029	-	-
Sall	53+635+819	-	-	-
XbaI	-	-	663+846	-

Směs pro každé štěpení obsahovala 5 µl přečištěného PCR produktu, 0,5 µl enzymu (dle předchozího popisu) a pufr Tango 10x tak, aby výsledný objem činil 10 µl. Vzorky byly vloženy do vodní lázně, kde byly inkubovány při 37 °C po dobu zhruba 4 hodin. Poté byly 3 µl vzorku smíchány se 3 µl loadind dye, nanесeny na 2% agarózový gel a elektroforéza běžela při 120 V asi 40 minut. Výsledek štěpení byl zviditelněn na UV transiluminátoru (UVP Transilluminator) spojeném s digitální kamerou, kterou byly pořízeny fotografie výsledného gelu (Obr. 3).



Obr. 3 Fotka gelu po RFLP

3.7. Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

Pro DGGE byla použita elektroforéza TV400-DGGE od firmy SCIE-PLAS. Rozměry skel byly 20,5 x 20 x 0,4 cm a výsledný gel měl tloušťku 0,1 cm. Kazeta mohla být použita oboustranně, tzn. pro dva gely, nebo mohl být nalit pouze jeden gel a druhá strana nahrazena dodanou slepou deskou.

3.7.1. Příprava gelu

Prvně byly připraveny 2 zásobní roztoky o výsledné koncentraci denaturujících látek 0 a 80 % (Tab. 6). Roztoky byly uchovávány při 4 °C po dobu až několika týdnů bez zjevných známek zhoršení výsledných gelů. Z těchto roztoků pak byly připravovány roztoky v kombinacích 10 a 40 % denaturantů nebo 20 a 60 % denaturantů (Tab. 7).

Tab. 6 Složení zásobních roztoků pro polyakrylamidový gel

	0% denaturant	80% denaturant
močovina	0 g	16,8 g
formamid	0 ml	16 ml
50x TAE pufr	1 ml	1 ml
40% akrylamid	7,5 ml	7,5 ml
ddH ₂ O	41,5 ml	do 50 ml
celkem	50 ml	50 ml

Tab. 7 Složení roztoků o požadovaných koncentracích denaturantů

	0% denaturant	80% denaturant
10%	15,3 ml	2,2 ml
40%	8,75 ml	8,75 ml
20%	13,1 ml	4,4 ml
60%	4,4 ml	13,1 ml

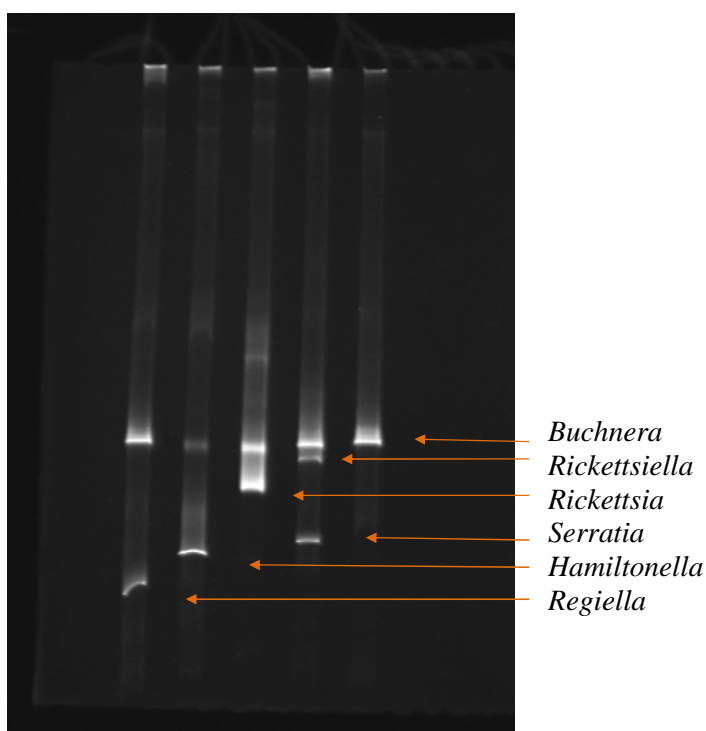
Aparatura pro DGGE byla sestavena dle návodu výrobce a před naléváním gelu bylo zapnuto zahřívání 1x TAE pufru v elektroforetické vaně na 50 °C.

Zařízení pro tvorbu gradientu bylo postaveno na magnetickou míchačku a k němu byla připojena gumová hadička. Ta končila nanášecí špičkou zasunutou mezi skleněné desky. Upevněna k nim byla lepicí páskou. Do obou komor tvořiče gradientu bylo vloženo magnetické míchadlo a výpustný i směšovací kohout byly uzavřeny. Do komory vzdálenější od výpustného kohoutu byl nalit roztok o nižší koncentraci denaturantů, do druhé komory byl nalit roztok o vyšší koncentraci. K oběma roztokům bylo přidáno 45 µl 20% APS (persulfát amonný, uchováván při -20 °C) a 15 µl TEMEDu (N,N,N',N'-tetramethylethylendiamin) a byla zapnuta míchačka. Zhruba po 20 až 30 sekundách byl pootevřen výpustný kohout, a když roztok dorazil ke spodnímu okraji aparatury, byl pootevřen i směšovací kohout. Nalévání gelu trvalo 10 až 12 minut. Po dokončení byl mezi skla zasunut hřebínek a gel se nechal 1 hodinu tuhnout. Stejný postup následoval i v případě nalévání druhého gelu. Předtím však musel být propláchnut tvořič gradientu i gumová hadička a byla použita nová nanášecí špička.

3.7.2. Elektroforéza

Po ztuhnutí gelu byla kazeta s gelem vložena do elektroforetické vany a teplota byla zvýšena na 60 °C. Poté byl vyndán hřebínek a vytvořené jamky byly propláchnuty TAE pufrem pro odstranění nezpolymerovaného zbytku roztoku a močoviny. Po smíchání 20 µl PCR produktu se 4 µl nanášecího roztoku byly vzorky naneseny na gel. Napětí bylo nastaveno na 230 V a separace probíhala 4,5 hodiny. Byla vyzkoušena i kombinace nižšího napětí působícího po delší dobu (100 V/17 hodin), ale v tomto případě nebyla separace úspěšná.

Po skončení elektroforézy byl gel vyjmut, přendán do vaničky s TAE pufrem obsahujícím ethidium bromid a za mírného třepání se barvil 15 minut. Vizualizace proběhla na UV transiluminátoru spojeném s digitální kamerou, kterou byly pořízeny fotografie výsledného gelu (Obr. 4).



Obr. 4 DGGE gel s referenčními vzorky

3.7.3. Izolace DNA z gelu a sekvenace

Po fotografické dokumentaci gelu byly vybrané použky vyříznuty (při UV transiluminaci) a umístěny odděleně do jednotlivých mikrokumavek. Do každé

mikrozkumavky pak bylo přidáno 100 μ l ddH₂O, vzorky byly promíchány vortexem a ponechány přes noc při 4 °C.

Poté následovala reamplifikace vzorků. Jako DNA templát byly do reakční směsi pro PCR přidány 2 μ l vody ze zkumavky s vyříznutým vzorkem. Po proběhnutí PCR reakce byly vzorky nanесeny na agarózový gel s ethidium bromidem a po skončení elektroforézy byly vizualizovány na UV transiluminátoru.

Následovalo přečištění pomocí ExoSAPu a příprava na sekvenaci. Na základě výsledku elektroforézy a jejího porovnání s velikostním markerem, bylo do mikrozkumavky přidáno mezi 8 až 10 ng DNA. K té bylo přidáno ještě 0,5 μ l primeru avoda v takovém množství, aby výsledný objem ve zkumavce činil 7,5 μ l. Vzorky byly poté odneseny do Laboratoře genomiky na ÚMBR AV, kde byly dále zpracovány přístrojem ABI PRISM 3130xl.

3.8. Vyhodnocení a zpracování sekvencí

Získané sekvence byly identifikovány v databázi NCBI – nástroj BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) a RDP (Ribosomal Database Projekt, <http://rdp.cme.msu.edu/>).

Následně byly zpracovávány v programu MEGA verze 4 (Tamura *et al.*, 2007). Zde byly v případě potřeby opraveny a pomocí metody ClustalW z nich byl vytvořen alignment. Na jeho základě byla provedena shlukovací (klastrovací) analýza metodou Neighbour-Joining (NJ). Dendrogramy byly vytvořeny pomocí modelu Kimura 2-Parametr, přičemž mezery byly zohledňovány a započítávány jako další znak použitím volby „Pairwise deletion“. Statistická podpora získaného stromu byla testována metodou bootstrap (1000 opakování).

Pro tvorbu kofylogenetického znázornění vztahu hostitele a bakterie byl použit program CoRe-PA (Merkle *et al.*, 2010). Nejdříve byly vytvořeny dendrogramy jak pro hostitele, tak pro bakterie v programu MEGA verze 4 (viz výše) a ve formě zobrazující pouze topologii byly uloženy. Následně byly pomocí programu FigTree v1.3.1 konvertovány do formátu nexus. Poté byly oba stromy vloženy do společného textového dokumentu a bylo zde dopsáno, který druh bakterie byl detekován u kterého druhu mšice. Celý soubor byl po uložení otevřen v programu CoRe-PA, který vytvořil hypotetické znázornění symbiotického vztahu.

Použité histogramy byly vytvořeny v programu Microsoft Excel.

4. VÝSLEDKY

4.1. Diagnostické PCR

4.1.1. *Diuraphis noxia*

Přítomnost endosymbiontů u *D. noxia* byla testována pomocí specifických primerů u 45 vzorků. PCR reakce proběhla při použití primerů BuchF/Common reverse, PASSF/Common reverse, PABSF/Common reverse a hamF/Common reverse. V prvním případě byla amplifikace úspěšná u všech 45 testovaných vzorků, v druhém případě u 15 vzorků, u 1 vzorku při třetí kombinaci primerů a 18 vzorků bylo naamplifikováno pomocí poslední dvojice primerů (Tab. 8). Amplikony byly následně osekvenovány a na základě získané sekvence identifikovány (databáze NCBI - nástroj BLAST). Prostřednictvím primerů BuchF a PABSF byly detekovány odpovídající druhy *Buchnera aphidicola* a *Hamiltonella defensa*. U produktů získaných pomocí primeru PASSF se ukázalo, že došlo k amplifikaci bakterie *Pantoea* sp. namísto očekávaného druhu *Serratia symbiotica*. A u posledního páru primerů se ani z jednoho PCR produktu nepodařilo sekvence získat.

Tab. 8 Seznam úspěšně amplifikovaných vzorků při použití specifických primerů (*D. noxia*)

Primery	Číslo vzorku
BuchF/ ComRev	1, 2, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49
PASSF/ ComRev	1, 12, 13, 14, 17, 20, 21, 25, 26, 38, 41, 42, 46, 47, 49
PABSF/ ComRev	44
hamF/ ComRev	9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 36, 39, 40, 46

4.1.2. Adelgidae

U zástupců čeledi Adelgidae byly specifické primery testovány na 21 vzorcích, přičemž PCR reakce proběhla u 4 vzorků při použití primerů R250F/480R a u 13 při užití primerů serrF/Common reverse (Tab. 9). Následovala sekvenace a porovnání získaných sekvencí s databází NCBI. Vzorky č. 10841, 10842 a 12011 byly identifikovány jako *Streptococcus* sp., vzorky č. 3062, 3076, 3497, 3576, 10536, 10541, 10582 a 10655 jako *Escherichia coli*, čísla 3098 a 10688 jako *Providencia* sp., číslo 3231 se přiřadilo k druhu *Pantoea* sp. a vzorek číslo 11619 vykazoval shodnost se druhy *Rahnella* sp. a *Hafnia alvei*.

Tab. 9 Seznam úspěšně amplifikovaných vzorků při použití specifických primerů (Adelgidae)

Primery	Číslo vzorku
R250F/ 480R	10841, 10842, 10960, 12011
serrF/ ComRev	3062, 3076, 3098, 3231, 3497, 3576, 10576, 10541, 10582, 10655, 10688, 10960, 11619

4.2. RFLP

Restrikční analýza byla provedena u 32 vzorků z čeledi Adelgidae. Z toho u 6 nenalezla ani jedna použitá endonukleáza svoji rozeznávací sekvenci a PCR produkt nebyl rozštěpen. U zbylých vzorků proběhlo štěpení jedním nebo dvěma enzymy, v případě vzorku 3572 se uplatnily dokonce tři endonukleázy. U většiny případů byly detekované fragmenty výsledkem štěpení restriktázy Sall. Enzym XbaI naopak nebyl aktivní ani u jednoho vzorku. Po získání dat z DGGE metody byly vyhledány restriční místa použitých enzymů u detekovaných bakterií a výsledek je rozepsán v Tab. 10.

Tab. 10 Schopnosti použitých enzymů štípat detekované bakterie

	ClaI	SacI	Sall	XbaI
<i>Hafnia alvei</i>	neštípá	neštípá	~ 800, ~ 850	neštípá
<i>Burkholderia</i> sp.	neštípá	neštípá	neštípá	neštípá
<i>Sodalis</i> like	~ 450	~ 1015	neštípá	neštípá
<i>Providencia</i> sp.	neštípá	neštípá	neštípá	neštípá
<i>Altererythrobacter</i> sp.	neštípá	neštípá	neštípá	neštípá
<i>Ecksteinia adelgidicola</i>	neštípá	neštípá	neštípá	neštípá
<i>Steffania adelgidicola</i>	neštípá	neštípá	neštípá	neštípá
<i>Bacillus</i> sp.	neštípá	neštípá	neštípá	neštípá
<i>Gluconobacter</i> sp./ <i>Ameyamaea</i> sp.	~ 225	neštípá	neštípá	~ 1070
<i>Pseudomonas</i> sp.	neštípá	~ 815	neštípá	neštípá

4.3. DGGE

4.3.1. *Diuraphis noxia*

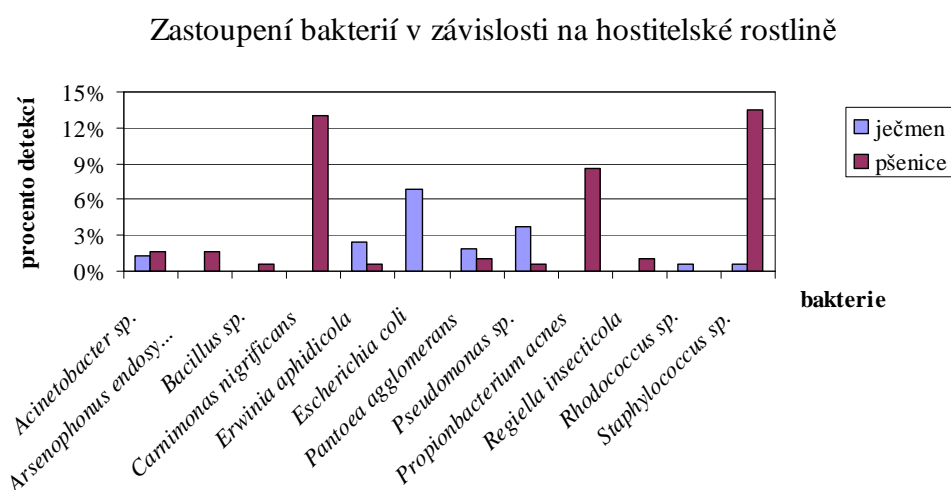
Ze 347 vzorků druhu *Diuraphis noxia* se u 15 nepodařilo získat PCR produkt. Jednalo se o vzorky číslo 1 (Francie), 8 (Egypt), 11-8 (Írán), 23 (Alžírsko), 23-3, 23-4, 23-5, 23-6, 23-7, 23-8, 23-9 (všechny vzorky s číslem 23 - Alžírsko), 24-5 (Alžírsko), 31-8 (USA), 45-6 (Španělsko) a 63-4 (Moldavsko).

U všech ostatních zástupců tohoto druhu, kde se amplifikace podařila, byl detekován primární endosymbiont *Buchnera aphidicola*. Jeho přítomnost byla potvrzena 23 sekvencemi získanými z náhodně vyříznutých proužků, u kterých byl na základě lokalizace na gelu předpoklad na přítomnost tohoto endosymbionta. Dále byla u 56 vzorků detekována ještě jedna až čtyři další bakterie (Tab. 11). Jejich identifikace proběhla v databázi NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) prostřednictvím nástroje BLAST a shoda hledané a nalezené sekvence se pohybovala mezi 98 až 100 %.

Tab. 11 Přehled detekovaných bakterií u *D. noxia*

Další bakterie	Procentuální identita	Vzorky
<i>Acinetobacter</i> sp.	99 %	41-5, 41-6, 42-3, 61-5, 61-6
<i>Arsenophonus endosymbiont</i>	99 %	14-3, 18-7, 27-9
<i>Bacillus</i> sp.	99 %	33-8
<i>Carnimonas nigrificans</i>	98 %	18-3, 20-3 až 22-9
<i>Erwinia aphidicola</i>	99 %	20-4, 48-9, 56-1, 63-1, 63-6
<i>Escherichia coli</i>	99 %	52-2, 52-3, 54-1 až 54-3, 61-1 až 61-6
<i>Pantoea agglomerans</i>	99 %	21-5, 22-8, 25-6, 61-2, 63-3
<i>Pseudomonas</i> sp.	100 %	46-4, 46-6, 50-8, 56-1, 63-1, 63-5, 63-7
<i>Propionibacterium acnes</i>	100 %	20-3 až 21-5, 21-8, 22, 22-3, 22-4, 22-9
<i>Regiella insecticola</i>	99 %	26-8, 30-5
<i>Rhodococcus</i> sp.	98 %	65-3
<i>Staphylococcus</i> sp.	99 %	6, 20-3 až 22-9, 42, 42-3

Dále byla hodnocena závislost výskytu bakterie s ohledem na hostitelskou rostlinu, kde se ukázalo, že druhově bohatší byla pšenice (Obr. 5). U té byla i oproti ječmeni vyšší procentuální zastoupení dosahující u dvou bakterií 13 %. Z grafu je také patrné, že druhy *Carnimonas nigrificans*, *Propionibacterium acnes*, *Regiella insecticola* *Arsenophonus* endosymbiont a *Bacillus* sp. se objevily pouze na pšenici a naopak bakterie *Escherichia coli* a *Rhodococcus* sp. se vyskytovaly jen na ječmeni.



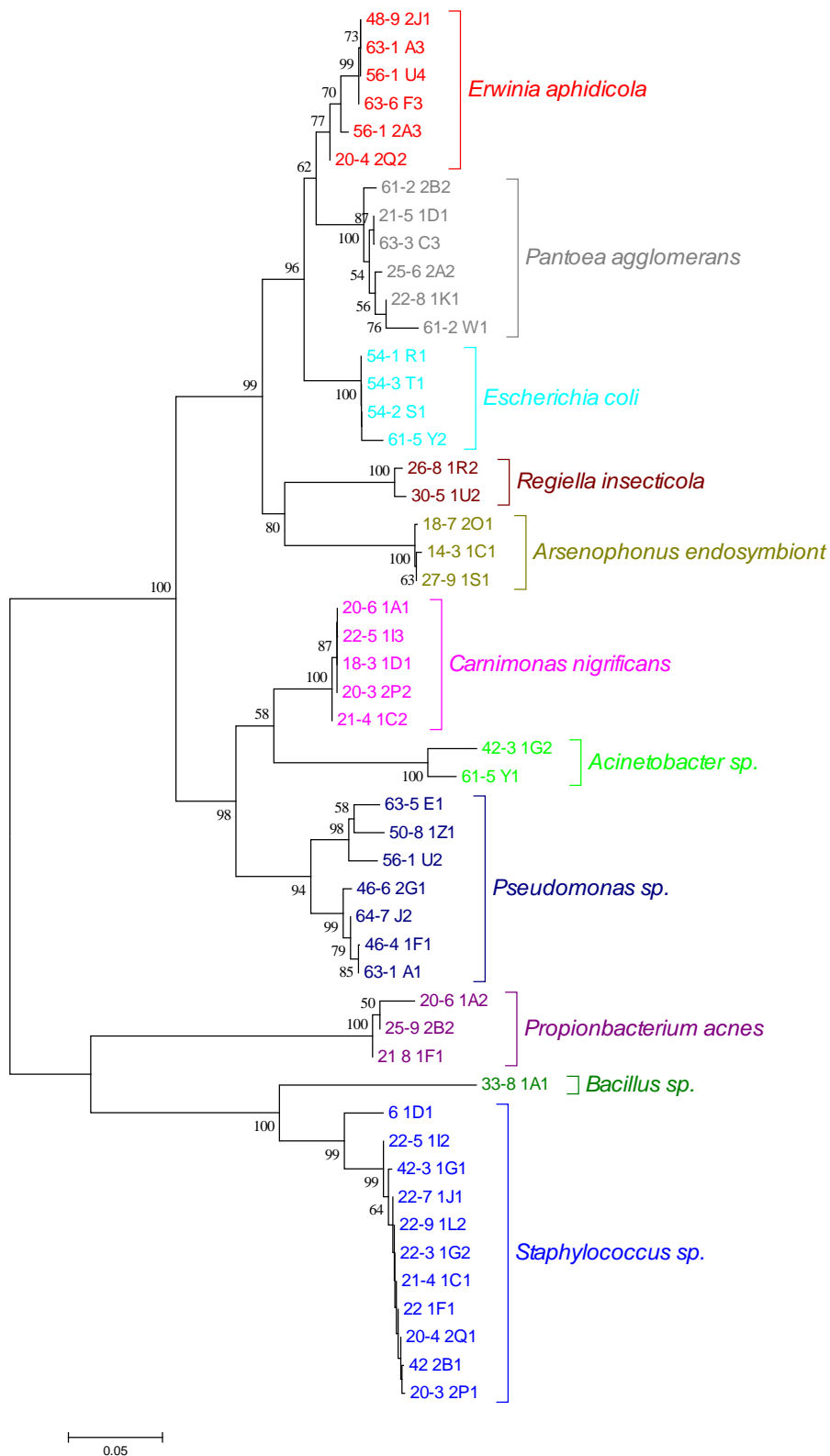
Obr. 5 Procentuální vyjádření zastoupení bakterií v závislosti na hostitelské rostlině

Výskyt jednotlivých druhů bakterií v rámci zemí původu vzorků je vyobrazen v Tab... Z té vyplývá, že nejvyšší druhové zastoupení bylo u Moldavska a Turecka a naopak u vzorků z Francie, Íránu ani Tuniska nebyly u *Diuraphis noxia* nalezeny žádné bakterie. Zajímavé také je, že druh *Carnimonas nigrificans* byl detekován jen u *D. noxia* pocházejících z Turecka.

Tab. 12 Detekce bakterií vzhledem k zemi původu vzorku *D.noxia*

	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Arsenophonus</i> endosymbiont	<i>Bacillus</i> sp.	<i>Carnimonas nigrificans</i>	<i>Erwinia aphidicola</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>Regiella insecticola</i>	<i>Rhodococcus</i> sp.	<i>Staphylococcus</i> sp.
Francie												
Írán												
Tunisko												
Egypt												1
Chile	2											
USA			1									
Maďarsko	1											2
Španělsko					1			2				
Alžírsko		1					1			2		
ČR					1	5		1				
Moldavsko	2				2	6	2	4			1	
Turecko		2		24	1		2		16			22

Fylogenetické vztahy bakterií u *Diuraphis noxia* jsou zobrazeny na Obr. 6. Jak je z dendrogramu patrné, většina bakterií náleží do stejné skupiny, konkrétně třídy γ -proteobacteria.



Obr. 6 Dendrogram detekovaných bakterií u *D. noxia* (Neighbour-Joining, Kimura 2-Parametr, Paiwise deletion, Bootstrap 1000)

4.3.2. Adelgidae

Z 84 zástupců čeledi Adelgidae nebyla PCR amplifikace úspěšná u 11 vzorků. Konkrétně šlo o vzorky číslo 10575 (*Pineus orientalis*), 10652 (*Pineus orientalis*), 10678 (*Adelges tardus*), 10736 (*Dreyfusia prelli*), 10841 (*Dreyfusia prelli*), 10843 (*Dreyfusia prelli*), 11002 (*Dreyfusia nordmannianae*), 11458 (*Adelges tardus*), 12009 (*Dreyfusia nordmannianae*), 12010 (*Dreyfusia nordmannianae*) a 12011 (*Dreyfusia nordmannianae*). U zbytku byla detekována přítomnost bakterií, které byly dle databáze NCBI označeny jako následující druhy (údaje v závorce odkazují na procentuální shodu mých sekvencí s danými druhy): *Burkholderia* sp. (93 – 94 %), *Hafnia alvei* (95 %), *Providencia* sp. (96 – 97 %), *Gluconobacter* sp./ *Ameyamaea* sp. (98 %), *Altererythrobacter* sp. (98 %), *Pseudomonas* sp. (100 %), *Bacillus* sp. (98 %), primary endosymbiont of *Sitophilus*/secondary endosymbiont of *Curculio/Sodalis glossinidius* (souhrně označeny jako *Sodalis* like (95 – 97 %)). Jejich výskyt u jednotlivých vzorků je rozepsán v Tab. 13.

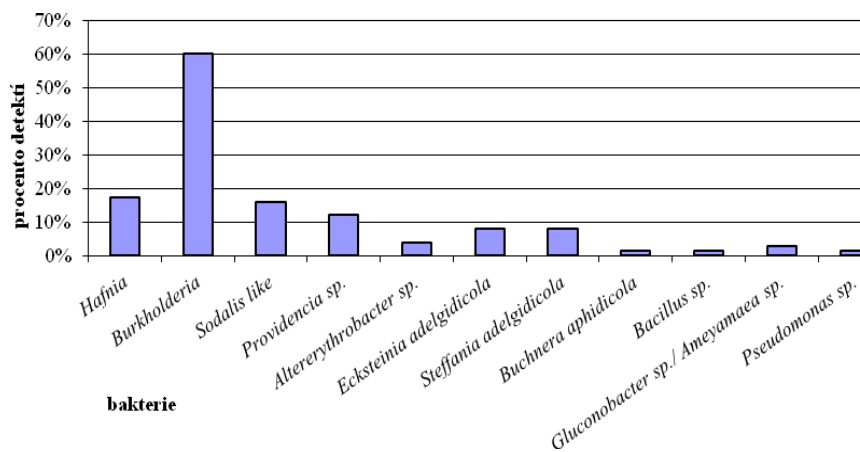
Tab. 13 Výskyt bakterií u Adelgidae

Druh	Číslo	<i>Hafnia alvei</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	Další bakterie	
<i>Eopineus strobi</i>	3059			<i>Sodalis</i> like - 2x	
<i>Pineus pini</i>	3062			<i>Providencia</i> sp.	
<i>Pineus cembrae</i>	3071			<i>Sodalis</i> like - 3x	
<i>Pineus cembrae</i>	3072			<i>Sodalis</i> like	
<i>Gilletteela coweni</i>	3076		+		
<i>Eopineus strobi</i>	3098			<i>Providencia</i> sp.	<i>Gluconobacter</i> sp./ <i>Ameyamaea</i> sp.
<i>Gilletteela cooleyi</i>	3228		+		
<i>Gilletteella cooleyi</i>	3229		+		
<i>Pineus pini</i>	3230			<i>Pseudomonas</i> sp.	
<i>Pineus pini</i>	3231			<i>Gluconobacter</i> sp./ <i>Ameyamaea</i> sp.	
<i>Cholodkovskia viridana</i>	3326		+		
<i>Cholodkovskia viridana</i>	3327		+		
<i>Cholodkovskia viridana</i>	3328		+		
<i>Aphrastasia pectinatae</i>	3345			<i>Sodalis</i> like - 2x	
<i>Eopineus pineoides</i>	3487			<i>Sodalis</i> like - 3x	
<i>Pineus cembrae</i>	3497			<i>Sodalis</i> like - 3x	

<i>Dreyfusia piceae</i>	3498			<i>Ecksteinia adelgidicola</i>	<i>Steffania adelgidicola</i>
<i>Dreyfusia piceae</i>	3499			<i>Ecksteinia adelgidicola</i>	<i>Steffania adelgidicola</i>
<i>Eopineus strobi</i>	3572		+	<i>Sodalis</i> like	<i>Providencia</i> sp.
<i>Pineus pini</i>	3576		+	<i>Providencia</i> sp.	
<i>Gilletteella coweni</i>	3579		+		
<i>Gilletteella coweni</i>	3582		+		
<i>Pineus cembrae</i>	3583			<i>Sodalis</i> like	
<i>Dreyfusia piceae</i>	3622			<i>Ecksteinia adelgidicola</i>	<i>Steffania adelgidicola</i>
<i>Pineus cembrae</i>	10536			<i>Sodalis</i> like	
<i>Dreyfusia nordmanninanae</i>	10539			<i>Ecksteinia adelgidicola</i>	<i>Steffania adelgidicola</i>
<i>Dreyfusia nordmanninanae</i>	10540			<i>Ecksteinia adelgidicola</i>	<i>Steffania adelgidicola</i>
<i>Dreyfusia nordmanninanae</i>	10541			<i>Ecksteinia adelgidicola</i>	<i>Steffania adelgidicola</i>
<i>Adelges laricis</i>	10555		+		
<i>Adelges laricis</i>	10567		+		
<i>Pineus orientalis</i>	10580			<i>Providencia</i> sp.	
<i>Pineus orientalis</i>	10581			<i>Providencia</i> sp.	
<i>Pineus orientalis</i>	10582			<i>Providencia</i> sp.	
<i>Adelges laricis</i>	10636		+		
<i>Pineus orientalis</i>	10655			<i>Providencia</i> sp.	<i>Altererythrobacter</i> sp.
<i>Pineus orientalis</i>	10656			<i>Sodalis</i> like	
<i>Pineus orientalis</i>	10657			<i>Providencia</i> sp.	
<i>Adelges tardus</i>	10679		+		
<i>Adelges laricis</i>	10688		+		
<i>Adelges laricis</i>	10689		+		
<i>Adelges laricis</i>	10720		+		
<i>Dreyfusia prelli</i>	10736		+		
<i>Adelges laricis</i>	10829		+	<i>Buchnera aphidicola</i>	
<i>Adelges laricis</i>	10839		+		
<i>Dreyfusia prelli</i>	10842		+		
<i>Gilletteella cooleyi</i>	10890		+		
<i>Adelges laricis</i>	10960		+	<i>Altererythrobacter</i> sp.	
<i>Gilletteella cooleyi</i>	11009		+	<i>Sodalis</i> like	
<i>Gilletteella cooleyi</i>	11011		+		
<i>Gilletteella cooleyi</i>	11026		+		
<i>Gilletteella cooleyi</i>	11027		+	<i>Sodalis</i> like	
<i>Gilletteella cooleyi</i>	11028		+	<i>Bacillus</i> sp.	

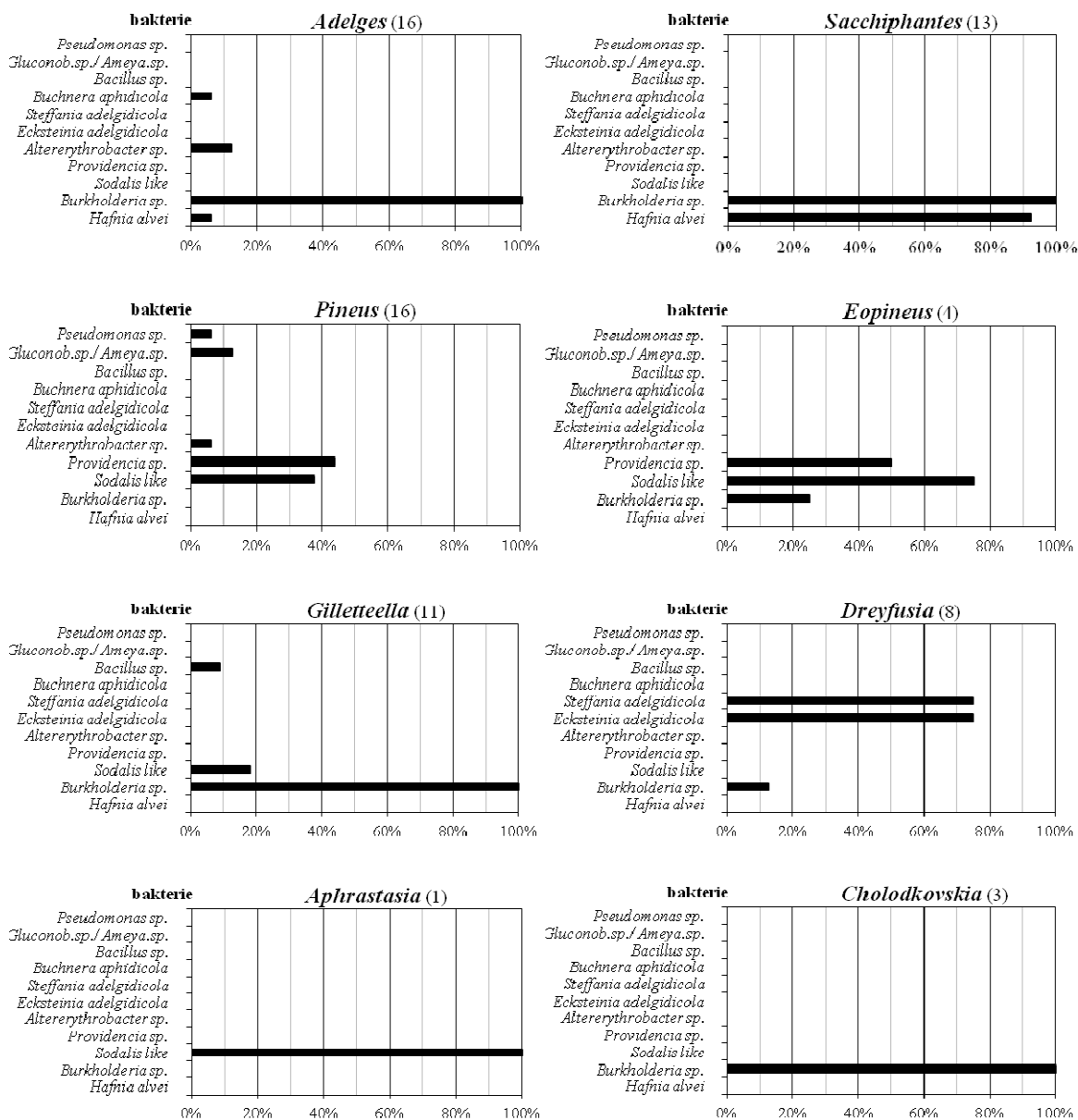
<i>Adelges laricis</i>	11031		+		
<i>Adelges tardus</i>	11196		+		
<i>Adelges tardus</i>	11206		+		
<i>Adelges tardus</i>	11340		+	<i>Altererythrobacter</i> sp.	
<i>Sacchiphantes abietis</i>	11350		+		
<i>Sacchiphantes viridis</i>	11362	+	+		
<i>Sacchiphantes viridis</i>	11380	+	+		
<i>Sacchiphantes viridis</i>	11413	+	+		
<i>Sacchiphantes viridis</i>	11426	+	+		
<i>Adelges laricis</i>	11500		+		
<i>Sacchiphantes viridis</i>	11550	+	+		
<i>Sacchiphantes viridis</i>	11552	+	+		
<i>Sacchiphantes viridis</i>	11573	+	+		
<i>Sacchiphantes viridis</i>	11614	+	+		
<i>Sacchiphantes viridis</i>	11619	+	+		
<i>Sacchiphantes abietis</i>	11624	+	+		
<i>Sacchiphantes abietis</i>	11625	+	+		
<i>Adelges tardus</i>	11661	+	+		
<i>Sacchiphantes abietis</i>	11697	+	+		

Procentuální výskyt bakterií detekovaných u druhů čeledi Adelgidae je znázorněn na následujícím grafu (Obr. 7). Z něho vyplývá, že nejvíce byla zastoupena *Burkholderia* sp., jejíž přítomnost byla detekována u celých 60 % vzorků. Následována byla bakteriemi *Hafnia alvei*, *Sodalis like* a *Providencia* sp. Jejich výskyt se pohyboval mezi 12 a 17 %.



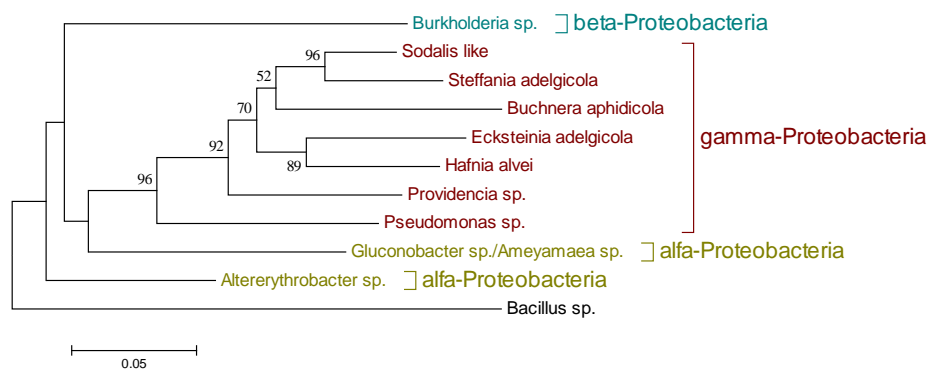
Obr. 7 Procentuální vyjádření zastoupení bakterií u Adelgidae

Zastoupení jednotlivých bakterií u zkoumaných rodů je naznačeno na histogramech (Obr. 8). Z těch je patrné, že *Burkholderia* sp. byla detekována ve více jak 90 % případů u většiny rodů. Výjimku tvoří rody *Eopineus* a *Dreyfusia*, u kterých byl výskyt pod 13 % a u rodu *Pineus* tato bakterie nalezena nebyla. Bakterie *Ecksteinia adelgadicola* a *Steffania adelgadicola* byly zjištěny pouze u rodu *Dreyfusia*, a to v 75 % případů. Zajímavý je i fakt, že oba druhy byly detekovány vždy společně. Z grafů také vyplývá, že u rodu *Cholodkovskia* a *Aphrastasia* byla přítomna pouze jedna bakterie, kdežto u ostatních se vyskytovaly současně minimálně dva druhy.



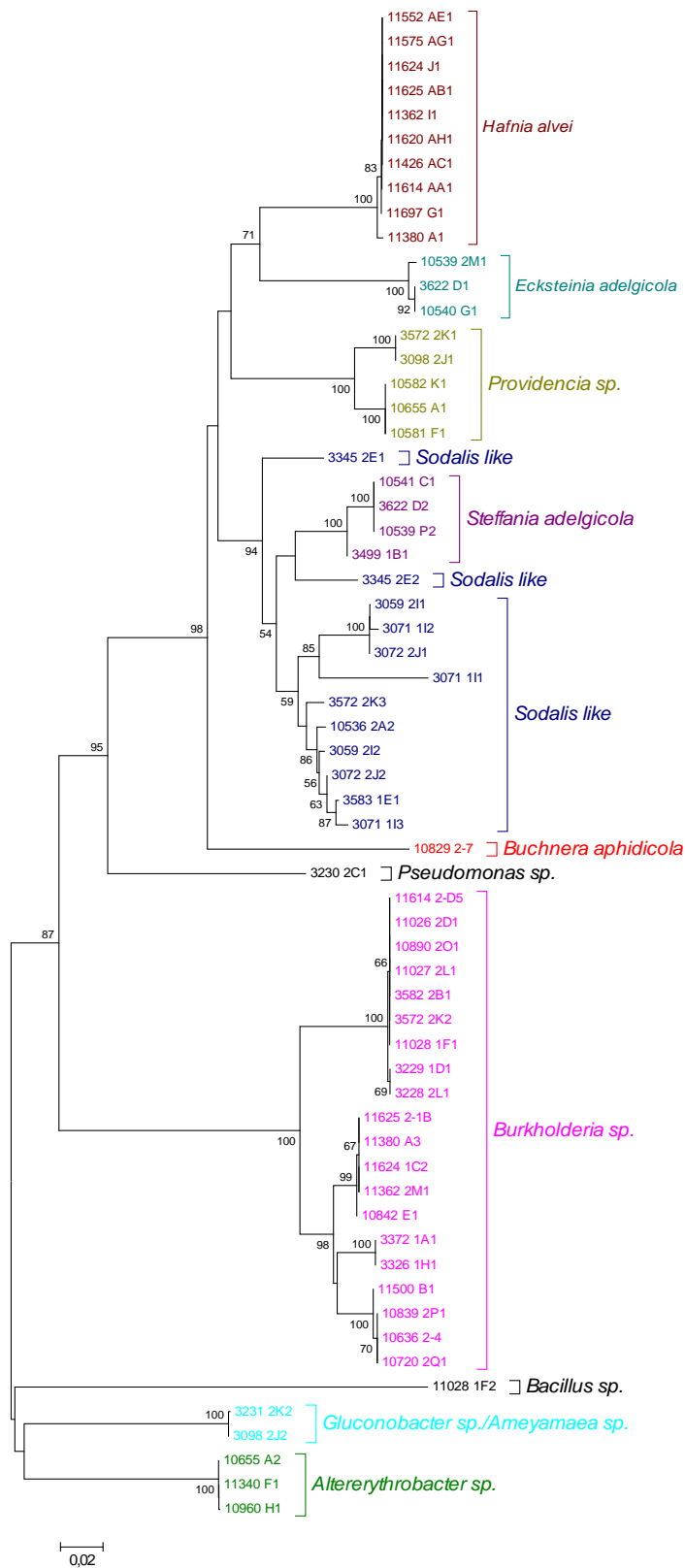
Obr. 8 Zastoupení bakterií u jednotlivých rodů (Adelgidae); čísla v závorkách udávají počet vzorků daného rodu

Příslušnost bakteriálních druhů k třídám α , β či γ -proteobacteria je vyobrazena na Obr. 9. Pro vytvoření bylo použito vždy po jedné sekvenci od každého detekovaného druhu. Všechny bakterie patřící ke třídě γ se shlukly do jedné skupiny, ale druhy z α -proteobacteria byly rozděleny. Toto rozdělení však není věrohodné, protože bylo podepřeno nízkou bootstrapovou hodnotou.



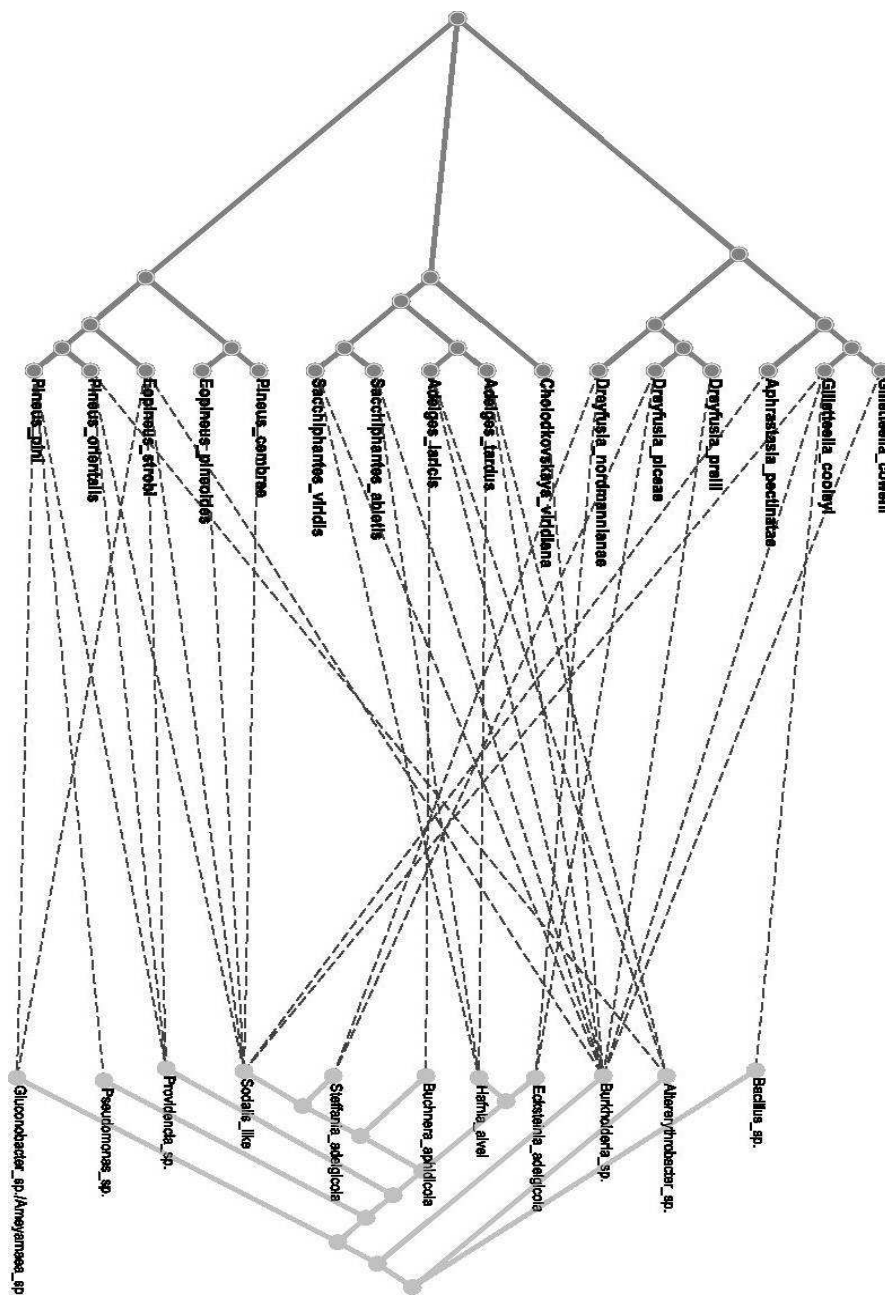
Obr. 9 Dendrogram bakterií detekovaných u Adelgidae (Neighbour-Joining, Kimura 2-Parametr, Paiwise deletion, Bootstrap 1000)

Na dendrogramu (Obr. 10), který byl vytvořen ze všech sekvencí získaných u vzorků z čeledi Adelgidae, také došlo ke shluknutí bakterií náležících do třídy γ -proteobacteria jako na předchozím obrázku, a současně byla vytvořena i skupinka druhů patřících do třídy alfa-proteobacteria.



Obr. 10 Dendrogram detekovaných bakterií u Adelgidae (Neighbour-Joining, Kimura 2-Parametr, Pairwise deletion, Bootstrap 1000)

Vzájemné vztahy bakterií a jejich hostitelů jsou vyobrazeny na Obr. 11. Vzhledem k tomu, že se jedná o symbionty sekundární, je patrné, že vazby jednotlivých bakteriálních druhů nejsou specializované jen na jednoho hostitele, ale řada z nich se objevuje u dvou i více hostitelů. Vazby přitom zjevně nekorelují ani v rámci rodů. Endosymbiontem s největším hostitelským spektrem je *Burkholderia* sp., kterou jsem detekovala u 9 hostitelů z různých rodů. Z toho lze usuzovat, že zde pravděpodobně nepůjde o silnou koevoluci, ale spíše o náhodné získávání sekundárních endosymbiontů v závislosti na daném prostředí.



Obr. 11 Zobrazení hypotetické kofylogeneze bakterií a jejich hostitelů (program CoRePo); vlevo je fylogram hostitelských druhů, v pravé části detekovaných bakterií; přerušované čáry naznačují symbiotický vztah

5. DISKUZE

5.1. Extrakce DNA

Při izolaci DNA byly vyzkoušeny tři metody. Extrakce pomocí komerčních sad DNeasy Blood & Tissue Kit a Invisorb Spin Tissue Mini Kit byla stoprocentně úspěšná a i při použití Squishing bufferu bylo dosaženo izolace u většiny vzorků. Vzhledem k menší finanční náročnosti kitu Invisorb se tento jeví jako nejvýhodnější.

5.2. Diagnostické PCR

První metodou pro detekci endosymbiotických bakterií bylo použití specifických primerů při diagnostickém PCR. Na základě literatury bylo vybráno 8 druhově specifických forwardových primerů a 2 reversní primery univerzální pro eubakterie. Jejich kombinací bylo vytvořeno 8 párů, z nichž 1 cílil na primárního endosymbionta u mšic (*Buchnera aphidicola*) a zbylé dvojice primerů měly za cíl detekovat 4 nejčastěji nalézané sekundární endosymbionty u mšic (Chen & Purcell, 1997; Sanström *et al.*, 2001).

Primární endosymbiont *Buchnera aphidicola* byl nalezen u všech použitých vzorků *Diuraphis noxia*. To koreluje s jeho obligátní přítomností u mšic, která byla sledována v díle autorů Sanström *et al.* (2001), kteří tuto bakterii detekovali u všech 17 druhů, které do jejich studie byly zahrnuty. V témže díle autoři také uvádějí, že u *D. noxia* nebyl nalezen ani jeden ze čtyř testovaných fakultativních endosymbiontů (*Hamiltonella defensa*, *Serratia symbiotica*, *Regiella insecticola* a *Rickettsia* sp.). Naproti tomu v mé práci byla u jednoho vzorku detekována bakterie *Hamiltonella defensa*. Důvodem je možná fakt, že v jejich práci byl použit pouze 1 vzorek této mšice, kdežto zde bylo testováno přes 300 vzorků. Avšak předpoklad, že tato mšice fakultativní symbionty nemá, je obecně uznávaný a v několika dalších dílech prezentovaný (Russell *et al.*, 2003; Swanevelter *et al.*, 2010).

U vzorků z čeledi Adelgidae nebyla nalezena žádná z testovaných bakterií. Přestože amplifikace s dvěma páry primerů byla úspěšná, po osekvenování se ukázalo, že získané amplikony patřily jiným bakteriálním druhům (*Streptococcus* sp., *Escherichia coli*, *Providencia* sp., *Pantoea* sp. a *Hafnia alvei*). Mohlo to být způsobeno tím, že primery nebyly dostatečně specifické a místo nasedání primerů se nacházelo i u těchto bakterií.

5.3. DGGE

5.3.1. Gel a elektroforéza

Při vytváření denaturačního gradientu bylo vyzkoušeno několik rozmezí, ale jako nejspolehlivější se ukázalo rozpětí 10 až 40 % a 20 až 60 % obsahu denaturačních látek.

Green *et al.* (2009) doporučuje jako optimální dobu tuhnutí gelu 1,5 až 2 hodiny. Při mé práci bylo vyzpozorováno, že 1 hodina je postačující. Dále autor uvádí, že lepších výsledků bylo při jejich práci dosahováno, pokud běžela elektroforéza při 100 V přes noc (17 hodin). Já jsem tuto kombinaci napětí a doby také zkoušela, ale oproti nim jsem lepší výsledky získala, pokud bylo napětí 230 V a elektroforéza probíhala pouze 4,5 hodiny.

5.3.2. *Diuraphis noxia*

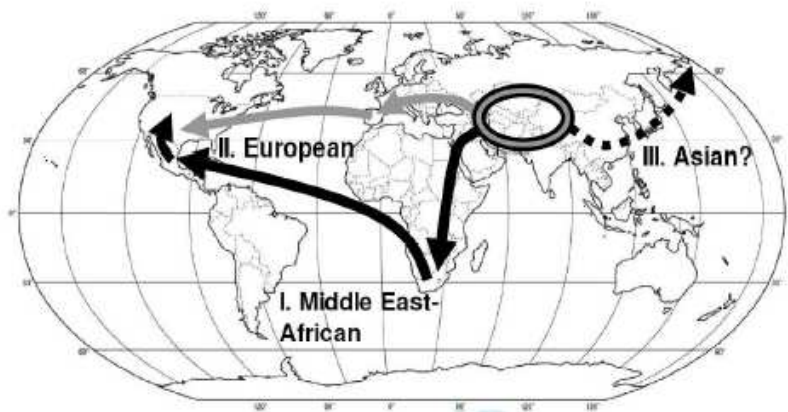
Při přípravě na DGGE se nepodařilo získat PCR produkt u 15 vzorků *D. noxia* ze 347 testovaných. Příčinou mohl být polymorfismus v místě nasedání primerů.

Primární endosymbiont *Buchnera aphidicola* byl opět detekován u všech použitých vzorků, což potvrzuje výsledek diagnostického PCR a předpoklad jeho obligátního výskytu u *D. noxia*.

U téměř 17 % byla detekována ještě další jedna až čtyři bakterie, což je opět v rozporu s prací Russell *et al.* (2003). Z celkového počtu patřilo 8 nalezených bakteriálních druhů mezi γ -proteobacteria, 2 mezi Bacilli a 1 je ze skupiny Actinobacteria.

Při pohledu na země původu mšic, u kterých byly tyto bakterie objeveny, jsou patrné rozdíly v četnosti výskytu (Tab. 12). U Francie nebyly detekovány žádné druhy, což bylo pravděpodobně způsobeno tím, že z této země byl pouze 1 vzorek. S ohledem na předpokládaný způsob migrace (Obr. 12), kdy mezi země původního výskytu je řazen i Írán, je absence bakterií u vzorků z této země pochopitelná, vezmeme-li v potaz, že u fakultativních endosymbiontů se předpokládá jejich přínos pro hostitele při adaptaci na nové podmínky prostředí (Montllor *et al.*, 2002; Tsuchida *et al.*, 2004). To však odporuje tomu, že u vzorků z Tuniska nebyly zjištěny žádné bakterie. Nejspíš za to může opět malý počet testovaných vzorků (2).

Například bakterie *Arsenophonus*, jež byla zjištěna u 3 vzorků, byla nalezena u různých druhů členovců, přičemž Duron *et al.* (2008) odhaduje její rozšíření u 5 % druhů.



Obr. 12 Migrace a oblasti výskytu *D. noxia* podle analýzi AFLP (Liu *et al.*, 2010)

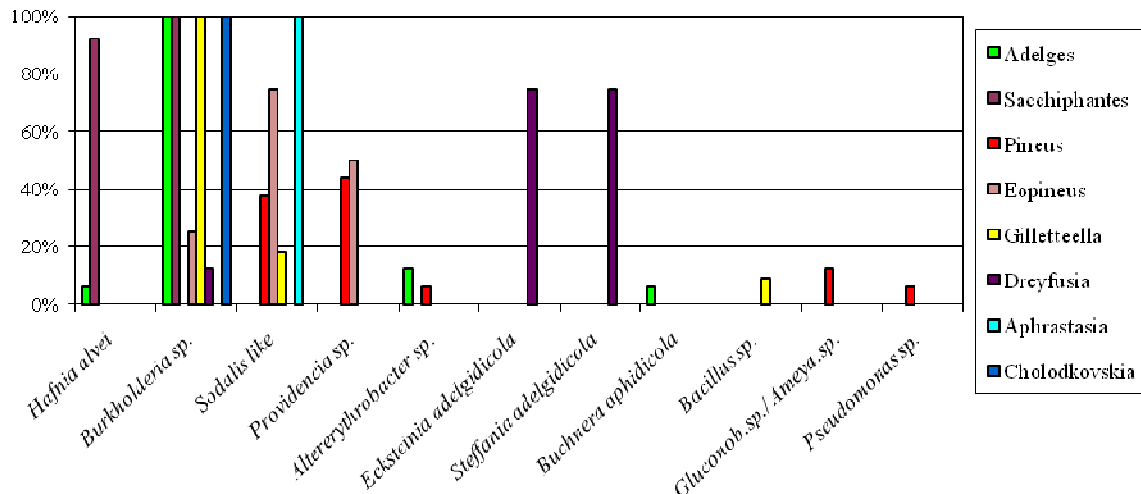
5.3.3. Adelgidae

U 11 vzorků se nepodařila amplifikace úseku použitého při DGGE, což mohlo být způsobeno degradací DNA během uchovávání. U 5 z těchto 11 vzorků se však jednalo o čerstvě extrahovanou DNA, takže zde mohl být na vině spíše polymorfismus v místě nasedání primerů nebo zde nebyly přítomny žádné bakterie, jejichž DNA by mohla být amplifikována.

Při DGGE bylo detekováno poměrně široké spektrum bakterií, z nichž 7 druhů patří do třídy γ -proteobacteria, 2 do α -proteobacteria, 1 do β -proteobacteria a 1 se řadí do třídy Bacilli. Detekce bakterií u jednotlivých rodů je znázorněna na Obr. 13.

U rodu *Dreyfusia* se kromě bakterie *Burkholderia* sp. vyskytly v 75 % případů druhy *Ecksteinia adelgidicola* a *Steffania adelgidicola*, které byly nedávno publikovány v práci Toenshoff *et al.* (2011) jako noví zástupci třídy γ -proteobacteria, kteří se vyskytují u *Dreyfusia nordmanninanae* a *Dreyfusia piceae*. V díle této autorky byly tyto bakterie detekovány u všech zkoumaných vzorků těchto druhů a taktéž i v mé práci. To naznačuje možný obligátní symbiotický vztah mezi uvedenými hostiteli a bakteriemi.

Ve své nejnovější práci (2012) pak tato autorka zkoumá endosymbiotické bakterie u druhových komplexů *Adelges laricis/tardus*, *Sacchiphantes abietis/Sacchiphantes viridis* a *Gilletteella cooleyi/coweni*. U všech našla dvojici bakterií náležících do γ -, respektive β -proteobacteria, které se nejvíce podobaly druhům *Hafnia alvei* a *Burkholderia* sp. Opět tyto bakterie detekovala u všech studovaných vzorků. V mé práci byla *Burkholderia* sp. nalezena kromě těchto druhů i u *Cholodkovskia viridana*, *Eopineus strobi* a *Dreyfusia prelli*. Bakterie *Hafnia alvei* se však oproti výsledku studie Toenshoff *et al.* (2012) vyskytla sice u všech vzorků rodu *Sacchiphantes*, ale jen u části mšic rodu *Adelges*.



Obr. 13 Zastoupení detekovaných bakterií u studovaných rodů

U jednoho vzorku druhu *Adelges laricis* se mi podařilo objevit bakterii *Buchnera aphidicola*, což je v rozporu s dosud publikovanými daty (např. Toenshoff *et al.*, 2012), podle kterých se tento primární endosymbiont mšic u čeledi Adelgidae nevyskytuje.

5.4. RFLP

Metoda restričního štěpení byla vyzkoušena u 32 vzorků čeledi Adelgidae, avšak získaná data nebyla nekorespondovala s očekávanými délkami fragmentů. Po provedení metody DGGE byla získaná data porovnána (Příloha 3), ale nebyla zjištěna významnější souvislost mezi bakterií detekovanou pomocí metody DGGE a způsobem štěpení při metodě RFLP. Rozdíly v úspěšnosti detekce pomocí různých metod mohou být způsobeny pravděpodobně různou specificitou použitých primerů, případně variabilitou ve vazebných místech s templátem. Navíc je zřejmé, že standardní PCR má vůči množství bakterií v hmyzím těle malou citlivost, a proto nedetekuje bakterie zastoupené jen v minimálním množství.

6. ZÁVĚR

V mé práci byly vyzkoušeny 3 metody pro detekci hmyzích endosymbiontů u zástupců mšic, které ještě nebyly takto systematicky prozkoumány. Jako nejúčinnější metoda se jeví DGGE, neboť dokázala detekovat i mikroorganismy jinou metodou nezjištěné.

U *D. noxia* byly v rozporu s údaji v literatuře, kde se uvádí, že tato mšice žádné sekundární endosymbionty nemá, nalezeno 12 bakteriálních druhů. Z nich například *Hamiltonella defensa* je jedním z častých endosymbiontů, kteří jsou nalézáni u různých druhů mšic. Nejvíce bakteriálních druhů bylo metodou DGGE detekováno na pšenici, avšak nebylo zde nalezeno výraznější geografické uspořádání.

Čeleď Adelgidae až donedávna nebyla v literatuře výrazněji spojována s přítomností symbiotických bakterií. V mé práci se však podařilo detekovat 11 bakteriálních druhů a byly tak potvrzeny nedávno zveřejněné výsledky v díle autorů Toenshoff *et al.* (2011, 2012), kteří u druhových komplexů *Dreyfusia nordmanninanae/piceae*, *Adelges laricis/tardus*, *Sacchiphantes abietis/Sacchiphantes viridis* a *Gilletteella cooleyi/coweni* také detekovali sekundární endosymbiotické bakterie.

7. LITERATURA

- AMANN, R. I., LUDWIG W., SCHLEIFER K. H. *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation*. Microbiol. Rev, 1995, Vol. 59, s. 143-169.
- BAUMANN, P., et al. *Buchnera aphidicola: the endosymbiont of aphids*. ASM News, 1998, Vol. 64, s. 203-209.
- BAUMANN, P., MORAN, N., BAUMANN, L. *Bacteriocyte-associated endosymbionts of insects*. In: Martin Dworkin, Stanley Falkow, Eugene Rosenberg, Karl-Heinz Schleifer & Erko Stackebrandt. The Prokaryotes, Springer, 2006, Vol. 1, s. 403-438.
- BLACKMAN, R. L., EASTOP, V. F. *Aphids on the World's Crops: An Identification and Information Guide*. Second Edition. John Wiley & Sons, England, 2000, 466 s.
- BOTSTEIN, D., et al. *Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms*. Am J Hum Genet, 1980, Vol. 32, s. 314-331.
- BUCHNER, P. *Endosymbiosis of animal with plant microorganisms*. New York: John Wiley, 1965, 909 s.
- BURKE, G., FIEHN, O., MORAN, N. *Effects of facultative symbionts and heat stress on the metabolome of pea aphids*. The ISME Journal, 2009, Vol. 4, No. 2, s. 242-252.
- CASE, R. J. *Use of 16S rRNA and rpoB Genes as Molecular Markers for Microbial Ecology Studies*. Appl. Environ. Microbiol., January 2007, Vol. 73, No. 1, s. 278-288.
- CLARRIDGE III, J. E. *Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Clin. Microbiol. Rev. October 2004, Vol. 17, No. 4, s. 840-862.
- COSTABILE, M., QUACH, A., FERRANTE, A. *Molecular Approaches in the Diagnosis of Primary Immunodeficiency Diseases*. HUMAN MUTATION, 2006, Vol. 27, No. 12, s. 1163- 1173.
- DASCH, G. A., WEISS, E., CHANG, K. -P. *Endosymbionts of insects*. In N. R. Krieg and J. G. Holt (ed.), Bergey's manual of systematic bacteriology, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1984, vol. 1, s. 811-833.

- DADD, R. H., MITTLER, T. E. *Studies on the artificial feeding of the aphid Myzus persicae (Sulzer) – III. Some major nutritional requirements.* Journal of Insect Physiology, 1965, Vol. 11, No. 6, s. 717-74.
- DECORTE, R. Genetic identification in the 21st century-Current status and future developments. Forensic Sci Int, 2010, Vol. 201, No. 1-3, s. 160.
- DIXON, A. F. G. *Aphid Ecology: An Optimization Approach.* London: Chapman & Hall. 1998.
- DOOKUN, A., SAUMTALLY, S., SEAL, S. *Genetic Diversity in Ralstonia solanacearum Strains from Mauritius using Restriction Fragment Length Polymorphisms.* Journal of Phytopathology, 2001, Vol.149, No. 1, s. 51–55.
- DOUGLAS, A. E. *Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria Buchnera.* Annu. Rev. Entomol., 1998, Vol. 43, s. 17-37.
- DOUGLAS, A. E. *Buchnera Bacteria and Other Symbionts of Aphids.* Chapter 2 in Insect Symbiosis, eds K. Bourtzis and T. Miller, CRC Press, Florida, USA, 2003, 347 s.
- DURON, O. *The diversity of reproductive parasites among arthropods: Wolbachia do not walk alone.* BMC Biol., 2008, Vol. 6, No. 27.
- GLOOR, G. B. et al. *Type I Repressors of P Element Mobility.* Genetics, September 1993, Vol. 135. No. 1, s. 81-95.
- EASTOP, V. F. *Deductions from the present day host plants of aphids and related insects.* In: van Emden HF, ed. Insect/Plant Relationships. Symposia of the Royal Entomological Society of London, 1973, s.157–177.
- EDWARDS, U., et al. *Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal DNA.* Nucleic Acids Research, 1989, Vol. 17, s. 3247-3255.
- ENGELSTADTER, J., HURST, G. D. D. *The ecology and evolution of microbes that manipulate host reproduction.* Annual Review of Ecology, Evolution & Systematics, 2009, Vol. 40, s. 127-149.
- FELSKE, A., et al. *Direct ribosomal isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis.* Appl. Environ. Microbiol., 1996, Vol. 62, s. 4162-4167.

- FERRARI, J., SCARBOROUGH, C. L., GODFRAY, H. C. *GENETIC VARIATION IN THE EFFECT OF A FACULTATIVE SYMBIONT ON HOST-PLANT USE BY PEA APHIDS*. OECOLOGIA., 2007, Vol. 153, No. 2, s. 323-9.
- FJELLBIRKELAND, A., TORSVIK, V., ØVEAS, L. *Methanotrophic diversity in an agricultural soil as evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis profiles of pmoA, mxaF and 16S rDNA sequences*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2001, Vol. 79, s. 209-217.
- FOOTTIT, R. G., et al. *Species identification of aphids (Insecta: Hemiptera:Aphididae) through DNA barcodes*. *Molecular Ecology Resources*, 2008, Vol. 8, s. 1189-1201.
- FUKUSHIMA, M., KAKINUMA, K., KAWAGUCHI, R. *Phylogenetic Analysis of Salmonella, Shigella, and Escherichia coli Strains on the Basis of the gyrB Gene Sequence*. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 2002, Vol. 40, No. 8, s. 2779-2785.
- GILL, P., WERRETT, D. J. *EXCLUSION OF A MAN CHARGED WITH MURDER BY DNA FINGERPRINTING*. *FORENSIC SCI INT*, 1987, Vol. 35, No.2-3, s. 145-8.
- GOTTLIEB, Y., et al. *Identification and Localization of a Rickettsia sp. in Bemisia tabaci (Homoptera: Aleyrodidae)*. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*, May 2006, Vol. 72, s. 3646-3652.
- GREEN, S. J., LEIGH, M. B., NEUFELD, J. D. *Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis*. In: Timmis K. N. (ed.), *Microbiology of Hydrocarbons, Oils, Lipids, and Derived Compounds*., Springer, Heidelberg. 2009, s. 4137-4158.
- HAVILL, N. P., FOOTTIT, R. G. *Biology and Evolution of Adelgidae*. *Annual Review of Entomology*, 2007, Vol. 52, s. 325-349.
- HAYNES, S., et al. *Diversity of bacteria associated with natural aphid populations*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, Vol. 69, s. 7216-7223.
- HEDGES, L. M., et al. *Wolbachia and virusprotection in insects*. *Science*, 2008, Vol. 322, s. 702-702
- HEIE, O. E. *Morphological structures and adaptations*. In: Minks AK, Harrewijn P, eds. *Aphids. Their Biology, Natural Enemies and Control*. Amsterdam: Elsevier, 1987, s. 393-400.

- CHAN, C. K., FORBES, A. R., RAWORTH, D. A. *Aphid-transmitted viruses and their vectors of the world*. Agriculture Canada Technical Bulletin, 1991, s. 1-216.
- CHEN, D. Q., PURCELL, A. H. *Occurrence and transmission of facultative endosymbionts in aphids*. Current Microbiology, 1997, Vol. 34, s. 220-225.
- ISHIKAWA, H. *Insect Symbiosis: An Introduction*. Chapter 1 in *Insect Symbiosis*, eds K. Bourtzis and T. Miller, CRC Press, Florida, USA, 2003, 347 s.
- JEANIKE, J., et al. *Adaptation via symbiosis: recent spread of a Drosophila defensive symbiont*. Science, 2010, Vol. 329, s. 212-215.
- KLIJN, N., WEERKAMP, A., de VOS, W. *Identification of mesophilic lactic acid bacteria by using polymerase chain reaction amplified variable regions of 16s rRNA and specific DNA probes*. Appl Environ Microbiol, 1991, Vol. 57, s. 3390-3393.
- KOGA, R., TSUCHIDA, T., FUKATSU, T. *Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont Buchnera in an aphid*. Proc. R. Soc. Lond., 2003, Vol. 270, s. 2543-2550.
- KULLEN, M. J., et al. *Use of the DNA sequence of variable regions of the 16S rRNA gene for rapid and accurate identification of bacteria in the Lactobacillus acidophilus complex*. Journal of Applied Microbiology, 2000, Vol. 89, s. 511-516.
- LEONARDO, T. E., MUIRU, G. T. *Facultative symbionts are associated with hostplant specialization in pea aphid populations*. Proceedings of the Royal Society of London Series B, 2003, Vol. 270, s. 209-212.
- LIU, X. *Global Phylogenetics of Diuraphis noxia (Hemiptera: Aphididae), an Invasive Aphid Species: Evidence for Multiple Invasions Into North America*. J. Econ. Entomol., 2010, Vol. 103, No. 3, s. 958-965.
- MESSING, R. H., et al. *Invasive aphids attack native Hawaiian plants*. Biological Invasions, 2007, Vol. 9, s. 601-607.
- MERKLE, D., MIDDENDORF, M., WIESEKE, N. *A Parameter-Adaptive Dynamic Programming Approach for Inferring Cophylogenies*. BMC Bioinformatics, 2010, Vol. 11, 60 s.

- MONTLLOR, C. B., MAXMEN, A., PURCELL, A. H. *FACULTATIVE BACTERIAL ENDOSYMBIONTS BENEFIT PEA APHIDS ACYRTHOSIPHON PISUM UNDER HEAT STRESS*. ECOLOGICAL ENTOMOLOGY, 2002, Vol. 27, No. 2, s. 189-195.
- MORAN, N. A. *The Coevolution of Bacterial Endosymbionts and Phloem-Feeding Insects*. Annals of the Missouri Botanical Garden, 2001, Vol. 88, No. 1, s. 35-44.
- MORENO, C. X., et al. *Molecular analysis of microbial communities identified in different developmental stages of Ixodes scapularis ticks from Westchester and Dutchess counties*, New York. Environ. Microbiol, 2006, Vol. 8, s. 761-772.
- MUNSON, M. A., BAUMANN, P., KINSEY, M. G. *Buchnera gen. nov. and Buchnera aphidicola sp. nov., a Taxon Consisting of the Mycetocyte-Associated, Primary Endosymbionts of Aphids*. INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, 1991, Vol. 41, No. 4, s. 566-568.
- MUYZER, G., SMALLA, K. *Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology*. Antonie Leeuwenhoek., 1998, Vol. 73, s. 127-141.
- MUYZER, G., DE WAAL, E. C., UITTERLINDEN, A. D. *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA*. Appl. Environ. Microbiol., 1993, Vol. 59, s. 695-700.
- MYERS, R., et al. *Nearly all single base substitutions in DNA fragments joined to a GC-clamp can be detected by denaturing gradient gel electrophoresis*. Nucleic Acids Res., 1985, Vol. 13, s. 3131-3145.
- OLIVER, K. M., MORAN, N. A., HUNTER, M. S. *Costs and benefits of a superinfection of facultative symbionts in aphids*. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2006, Vol. 273, s. 1273-1280.
- OLIVER, K. M., et al. *Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps*. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, Vol. 100, s.1803-1807.
- OLSEN, G. J., et al. *Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach*. Ann. Rev. Microbiol, 1986, Vol. 40, s. 337-365.
- POTTER, S, et al. *Specific cleavage analysis of mammalian mitochondrial DNA*. Proc Natl Acad Sci USA, 1975, Vol. 72, s. 4496-4500,

- REESON, A. F., et al. *Application of 16S rDNA-DGGE to examine the microbial ecology associated with a social wasp *Vespula germanica**. *Insect Mol. Biol.*, 2003, Vol. 12, s. 85-91.
- RUSSELL, J. A., ET AL. *SIDE-STEPPING SECONDARY SYMBIONTS: WIDESPREAD HORIZONTAL TRANSFER ACROSS AND BEYOND THE APHIDOIDEA*. *MOL ECOL.* 2003, VOL. 12, NO. 4, s. 1061-75.
- SAIKI, R. K., et al. *Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. *Science*, 1985, Vol. 230, s. 1350-1354.
- SANDSTRÖM, J. P., ET AL. *INDEPENDENT ORIGINS AND HORIZONTAL TRANSFER OF BACTERIAL SYMBIONTS OF APHIDS*. *MOL ECOL.*, 2001, VOL. 10, NO. 1, s. 217-28.
- SCARBOROUGH, C. L., FERRARI, J., GODFRAY, H. C. J. *Aphid protected from pathogen by endosymbiont*. *Science*, 2005, Vol. 310, s.1781-1781.
- SHEFFIELD, V.C., et al. *Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1989, Vol. 86, s. 232-236.
- SHIGENOBU, S., ET AL. *GENOME SEQUENCE OF THE ENDOCELLULAR BACTERIAL SYMBIONT OF APHIDS BUCHNERA SP.* *APS. NATURE*, 2000, VOL. 407, s. 81-6.
- SIMON, J-C., et al. *Facultative Symbiont Infections Affect Aphid Reproduction*. *PLoS ONE*, 2011, Vol. 6, No. 7.
- STARY, P. *Parasitoids and biocontrol of Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Kurdj.) expanding in central Europe*. *Journal of applied entomology = Zeitschrift für angewandte Entomologie. J. appl. entomol.*, 1999, Vol. 123, No. 5, s. 273-279.
- STOLL, S., et al. *Bacterial microbiota associated with ants of the genus *Tetraponera**. *Biol. J. Linn. Soc.*, 2007, Vol. 90, s. 399-412.
- SWANEVELDER, Z. H., et al. *Limited Endosymbiont Variation in *Diuraphis noxia* (Hemiptera:Aphididae) Biotypes from the United States and South Africa*. Source: *Journal of Economic Entomology*, 2010, Vol. 103, No. 3, s. 887-897.

- TAMURA, K. et al. *MEGA 4: Molecular evolutionary genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, Vol. 24, No. 8, s. 1596-1599.
- TOENSHOFF, E. R., et al. *Bacteriocyte-associated gammaproteobacterial symbionts of the Adelges nordmanniana/piceae complex (Hemiptera: Adelgidae)*. *ISME J*, 2011, Vol. 6, s. 384-396.
- TOENSHOFF, E. R., GRUBER, D., HORN, M. *Co-evolution and symbiont replacement shaped the symbiosis between adelgids (Hemiptera: Adelgidae) and their bacterial symbionts*. *Environmental Microbiology*, 2012, Vol. 14, No. 5, s. 1284-1295.
- TSUCHIDA, T., et al. *Symbiotic Bacterium Modifies Aphid Body Color*. *Science*, 2010, Vol. 330, No. 6007, s. 1102-1104.
- TSUCHIDA, T., KOGA, R., FUKATSU, T. *Host plant specialization governed by facultative symbiont*. *Science*, 2004, Vol. 303.
- UNTERMAN, B. M., BAUMANN, P., MCLEAN, D. L. *Pea Aphid Symbiont Relationships Established by Analysis of 16S rRNAs*. *Journal of Bacteriology*, 1989, Vol. 171, s. 2970-2974.
- VALAEI, A., *A novel polymorphism causes a different restriction pattern by RsaI in the beta-globin gene cluster: application in prenatal diagnosis*. *Hemoglobin*, 2009, Vol. 33, No. 6, s. 417-21.
- VON DOHLEN, C. D., MORAN, N. A. *Molecular data support a rapid radiation of aphids in the Cretaceous and multiple origins of host alternation*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2000, Vol. 71, s. 689-717.
- VON WINTZINGERODE, F., GOBEL, U. B., STACKEBRANDT, E. *Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis*. *FEMS Microbiol Rev.*, 1997, Vol. 21, No. 3, s. 213-29.
- VORBURGER, C., GEHRER, L., RODRIGUEZ, P. *A strain of the bacterial symbiont Regiella insecticola protects aphids against parasitoids*. *Biol Lett*, 2010, Vol. 6, s. 109-111.
- WEISBERG, W. G., et al. *16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study*. *J. Bacteriol.*, 1991, Vol. 173 No. 2, s. 697-703.

- WHITEHEAD, L. F., DOUGLAS, A. E. *A metabolic study of Buchnera, the intracellular bacterial symbionts of the pea aphid Acyrthosiphon pisum*. Journal of General Microbiology, 1993, Vol. 139, No. 4, s. 821-826.
- WOESE, C. R. *Bacterial evolution*. Microbiol. Rev., 1987, Vol. 51, s. 221-271.
- WOESE, C. R., Fox, G. E. *Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, Vol. 74, s. 5088-5090.
- ZUCKERKANDL, E., PAULING, L. *Molecules as documents of evolutionary history*. J. Theor. Biol., 1965, Vol. 8, s. 357-366.
- ŽUROVCOVÁ, M., et al. *"DNA barcoding" is of limited value for identifying adelgids (Hemiptera: Adelgidae) but supports traditional morphological taxonomy*. European Journal of Entomology, 2010, Vol. 107, s. 147-156.

8. PŘÍLOHY

Příloha 1 Seznam vzorků *D. noxia*

Číslo vzorku	Stát, lokalita	Datum sběru	Hostitelská rostlina	Způsob uchování
1	Francie, Montpellier	12. 02. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
2	Tunisko, Enfida	22. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
5	Tunisko, Hergla	21. 04. 2008	<i>Lolium perenne</i>	etanol
6	Egypt, El-Sheikh Zuwayid	19. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
6-4	Egypt, El-Sheikh Zuwayid	19. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
6-5	Egypt, El-Sheikh Zuwayid	19. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
7	Egypt, El-Sheikh Zuwayid	05. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
7-3	Egypt, El-Sheikh Zuwayid	05. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
7-4	Egypt, El-Sheikh Zuwayid	05. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
7-5	Egypt, El-Sheikh Zuwayid	05. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
8	Egypt, Rafah	20. 03. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
9	Írán, Kerman, Kerman Province	20. 04. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
9-3	Írán, Kerman, Kerman Province	20. 04. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
9-4	Írán, Kerman, Kerman Province	20. 04. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
9-5	Írán, Kerman, Kerman Province	20. 04. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
9-6	Írán, Kerman, Kerman Province	20. 04. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
9-7	Írán, Kerman, Kerman Province	20. 04. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
9-8	Írán, Kerman, Kerman Province	20. 04. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
9-9	Írán, Kerman, Kerman Province	20. 04. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
10	Írán, Birjand, South Khorashad Province	20. 05. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
10-3	Írán, Birjand, South Khorashad Province	20. 05. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
10-4	Írán, Birjand, South Khorashad Province	20. 05. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
10-5	Írán, Birjand, South Khorashad Province	20. 05. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
10-6	Írán, Birjand, South Khorashad Province	20. 05. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
10-7	Írán, Birjand, South Khorashad Province	20. 05. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
10-8	Írán, Birjand, South Khorashad Province	20. 05. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
11	Írán, Birjand, Bojdi Plain, South Khorasan	21. 05. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
11-3	Írán, Birjand, Bojdi Plain, South Khorasan	21. 05. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
11-4	Írán, Birjand, Bojdi Plain, South Khorasan	21. 05. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
11-5	Írán, Birjand, Bojdi Plain, South Khorasan	21. 05. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
11-6	Írán, Birjand, Bojdi Plain, South Khorasan	21. 05. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
11-7	Írán, Birjand, Bojdi Plain, South Khorasan	21. 05. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
11-8	Írán, Birjand, Bojdi Plain, South Khorasan	21. 05. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
11-9	Írán, Birjand, Bojdi Plain, South Khorasan	21. 05. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
12	Turecko, Sarayköy-Konya	26. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
12-3	Turecko, Sarayköy-Konya	26. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
12-4	Turecko, Sarayköy-Konya	26. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
12-5	Turecko, Sarayköy-Konya	26. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
12-6	Turecko, Sarayköy-Konya	26. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
12-7	Turecko, Sarayköy-Konya	26. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
12-8	Turecko, Sarayköy-Konya	26. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
12-9	Turecko, Sarayköy-Konya	26. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
13	Turecko, Campus-Konya, Selçuklu	26. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
13-3	Turecko, Campus-Konya, Selçuklu	26. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
13-4	Turecko, Campus-Konya, Selçuklu	26. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
13-5	Turecko, Campus-Konya, Selçuklu	26. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol

20-3	Turecko, Meram-Konya	10. 07. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
20-4	Turecko, Meram-Konya	10. 07. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
20-5	Turecko, Meram-Konya	10. 07. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
20-6	Turecko, Meram-Konya	10. 07. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
20-7	Turecko, Meram-Konya	10. 07. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
20-8	Turecko, Meram-Konya	10. 07. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
20-9	Turecko, Meram-Konya	10. 07. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
21	Turecko, Beysehir1 - Konya	12. 07. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
21-3	Turecko, Beysehir1 - Konya	12. 07. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
21-4	Turecko, Beysehir1 - Konya	12. 07. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
21-5	Turecko, Beysehir1 - Konya	12. 07. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
21-6	Turecko, Beysehir1 - Konya	12. 07. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
21-7	Turecko, Beysehir1 - Konya	12. 07. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
21-8	Turecko, Beysehir1 - Konya	12. 07. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
21-9	Turecko, Beysehir1 - Konya	12. 07. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
22	Turecko, Beysehir2 - Konya	12. 07. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
22-3	Turecko, Beysehir2 - Konya	12. 07. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
22-4	Turecko, Beysehir2 - Konya	12. 07. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
22-5	Turecko, Beysehir2 - Konya	12. 07. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
22-6	Turecko, Beysehir2 - Konya	12. 07. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
22-7	Turecko, Beysehir2 - Konya	12. 07. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
22-8	Turecko, Beysehir2 - Konya	12. 07. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
22-9	Turecko, Beysehir2 - Konya	12. 07. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
23	Alžírsko, Ain Kercha (Oum El Bouaghi Dept.)	17. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
23-3	Alžírsko, Ain Kercha (Oum El Bouaghi Dept.)	17. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
23-4	Alžírsko, Ain Kercha (Oum El Bouaghi Dept.)	17. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
23-5	Alžírsko, Ain Kercha (Oum El Bouaghi Dept.)	17. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
23-6	Alžírsko, Ain Kercha (Oum El Bouaghi Dept.)	17. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
23-7	Alžírsko, Ain Kercha (Oum El Bouaghi Dept.)	17. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
23-8	Alžírsko, Ain Kercha (Oum El Bouaghi Dept.)	17. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
23-9	Alžírsko, Ain Kercha (Oum El Bouaghi Dept.)	17. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
24	Alžírsko, Ain Djasser (Batna Dept.)	21. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
24-3	Alžírsko, Ain Djasser (Batna Dept.)	21. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
24-4	Alžírsko, Ain Djasser (Batna Dept.)	21. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
24-5	Alžírsko, Ain Djasser (Batna Dept.)	21. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
24-6	Alžírsko, Ain Djasser (Batna Dept.)	21. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
24-7	Alžírsko, Ain Djasser (Batna Dept.)	21. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
24-8	Alžírsko, Ain Djasser (Batna Dept.)	21. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
24-9	Alžírsko, Ain Djasser (Batna Dept.)	21. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
25	Alžírsko, Kais (Khenchela Dept.)	09. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
25-3	Alžírsko, Kais (Khenchela Dept.)	09. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
25-4	Alžírsko, Kais (Khenchela Dept.)	09. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
25-5	Alžírsko, Kais (Khenchela Dept.)	09. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
25-6	Alžírsko, Kais (Khenchela Dept.)	09. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
25-7	Alžírsko, Kais (Khenchela Dept.)	09. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
25-8	Alžírsko, Kais (Khenchela Dept.)	09. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
25-9	Alžírsko, Kais (Khenchela Dept.)	09. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
26	Alžírsko, El Khroub (Constantine Dept.)	12. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
26-3	Alžírsko, El Khroub (Constantine Dept.)	12. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
26-4	Alžírsko, El Khroub (Constantine Dept.)	12. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
26-5	Alžírsko, El Khroub (Constantine Dept.)	12. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
26-6	Alžírsko, El Khroub (Constantine Dept.)	12. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol

26-7	Alžírsko, El Khroub (Constantine Dept.)	12. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
26-8	Alžírsko, El Khroub (Constantine Dept.)	12. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
26-9	Alžírsko, El Khroub (Constantine Dept.)	12. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
27	Alžírsko, Hamla (Batna Dept.)	14. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
27-3	Alžírsko, Hamla (Batna Dept.)	14. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
27-4	Alžírsko, Hamla (Batna Dept.)	14. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
27-5	Alžírsko, Hamla (Batna Dept.)	14. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
27-6	Alžírsko, Hamla (Batna Dept.)	14. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
27-7	Alžírsko, Hamla (Batna Dept.)	14. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
27-8	Alžírsko, Hamla (Batna Dept.)	14. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
27-9	Alžírsko, Hamla (Batna Dept.)	14. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
28	Alžírsko, Ain Djasser (Batna Dept.)	15. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
28-3	Alžírsko, Ain Djasser (Batna Dept.)	15. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
28-4	Alžírsko, Ain Djasser (Batna Dept.)	15. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
28-5	Alžírsko, Ain Djasser (Batna Dept.)	15. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
28-6	Alžírsko, Ain Djasser (Batna Dept.)	15. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
28-7	Alžírsko, Ain Djasser (Batna Dept.)	15. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
28-8	Alžírsko, Ain Djasser (Batna Dept.)	15. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
28-9	Alžírsko, Ain Djasser (Batna Dept.)	15. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
29	Alžírsko, Tazoult-Lambese(Batna Dept.)	23. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
29-3	Alžírsko, Tazoult-Lambese(Batna Dept.)	23. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
29-4	Alžírsko, Tazoult-Lambese(Batna Dept.)	23. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
29-5	Alžírsko, Tazoult-Lambese(Batna Dept.)	23. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
29-6	Alžírsko, Tazoult-Lambese(Batna Dept.)	23. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
29-7	Alžírsko, Tazoult-Lambese(Batna Dept.)	23. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
29-8	Alžírsko, Tazoult-Lambese(Batna Dept.)	23. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
30	Alžírsko, Bouzina(Batna Dept.)	23. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
30-3	Alžírsko, Bouzina(Batna Dept.)	23. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
30-4	Alžírsko, Bouzina(Batna Dept.)	23. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
30-5	Alžírsko, Bouzina(Batna Dept.)	23. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
30-6	Alžírsko, Bouzina(Batna Dept.)	23. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
30-7	Alžírsko, Bouzina(Batna Dept.)	23. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
30-8	Alžírsko, Bouzina(Batna Dept.)	23. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
30-9	Alžírsko, Bouzina(Batna Dept.)	23. 05. 2008	<i>Triticum durum</i>	etanol
31	USA, Couny line - Juniper Canyon, Blicketon	24. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
31-3	USA, Couny line - Juniper Canyon, Blicketon	24. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
31-4	USA, Couny line - Juniper Canyon, Blicketon	24. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
31-5	USA, Couny line - Juniper Canyon, Blicketon	24. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
31-6	USA, Couny line - Juniper Canyon, Blicketon	24. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
31-7	USA, Couny line - Juniper Canyon, Blicketon	24. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
31-8	USA, Couny line - Juniper Canyon, Blicketon	24. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
31-9	USA, Couny line - Juniper Canyon, Blicketon	24. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
32	USA, Turpint Ridge Rd., Blicketon WA Benton	24. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
32-3	USA, Turpint Ridge Rd., Blicketon WA Benton	24. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
32-4	USA, Turpint Ridge Rd., Blicketon WA Benton	24. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
32-5	USA, Turpint Ridge Rd., Blicketon WA Benton	24. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
32-6	USA, Turpint Ridge Rd., Blicketon WA Benton	24. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
32-7	USA, Turpint Ridge Rd., Blicketon WA Benton	24. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
32-8	USA, Turpint Ridge Rd., Blicketon WA Benton	24. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
32-9	USA, Turpint Ridge Rd., Blicketon WA Benton	24. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
33	USA, Pear Ac. IAREC, Prosser, WA, Benton Co.	24. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol

33-3	USA, Pear Ac. IAREC, Prosser, WA, Benton Co.	24. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
33-4	USA, Pear Ac. IAREC, Prosser, WA, Benton Co.	24. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
33-5	USA, Pear Ac. IAREC, Prosser, WA, Benton Co.	24. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
33-6	USA, Pear Ac. IAREC, Prosser, WA, Benton Co.	24. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
33-7	USA, Pear Ac. IAREC, Prosser, WA, Benton Co.	24. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
33-8	USA, Pear Ac. IAREC, Prosser, WA, Benton Co.	24. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
33-9	USA, Pear Ac. IAREC, Prosser, WA, Benton Co.	24. 06. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
34	USA, Headquarter Unit IAREC Field H-21, Prosser,	24. 06. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
34-3	USA, Headquarter Unit IAREC Field H-21, Prosser,	24. 06. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
34-4	USA, Headquarter Unit IAREC Field H-21, Prosser,	24. 06. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
34-5	USA, Headquarter Unit IAREC Field H-21, Prosser,	24. 06. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
34-6	USA, Headquarter Unit IAREC Field H-21, Prosser,	24. 06. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
34-7	USA, Headquarter Unit IAREC Field H-21, Prosser,	24. 06. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
34-8	USA, Headquarter Unit IAREC Field H-21, Prosser,	24. 06. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
34-9	USA, Headquarter Unit IAREC Field H-21, Prosser,	24. 06. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
36	Česká republika, Hodonice	01. 07. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
38	Česká republika, Litobratřice	01. 07. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
39	Česká republika, Bystřice p. Hostýnem	16. 07. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
40	Česká republika, Třebíč	16. 07. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
41	Chile, Chillian	xx. 02. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
42	Maďarsko, Budapest	xx. 02. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
42-3	Maďarsko, Budapest	xx. 02. 2008	<i>Triticum aestivum</i>	etanol
43	Španělsko, Alguaire, Lleida Distr.	30. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
43-3	Španělsko, Alguaire, Lleida Distr.	30. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
43-4	Španělsko, Alguaire, Lleida Distr.	30. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
43-5	Španělsko, Alguaire, Lleida Distr.	30. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
43-6	Španělsko, Alguaire, Lleida Distr.	30. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
43-7	Španělsko, Alguaire, Lleida Distr.	30. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
43-8	Španělsko, Alguaire, Lleida Distr.	30. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
43-9	Španělsko, Alguaire, Lleida Distr.	30. 04. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
44	Španělsko, Salt, Girona	07. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
45	Španělsko, Vencillón	06. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
45-3	Španělsko, Vencillón	06. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
45-4	Španělsko, Vencillón	06. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
45-5	Španělsko, Vencillón	06. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
45-6	Španělsko, Vencillón	06. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
45-7	Španělsko, Vencillón	06. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
45-8	Španělsko, Vencillón	06. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol

45-9	Španělsko, Vencillón	06. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
46	Španělsko, Santa Maria del Camí (Barcelona)	14. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
46-3	Španělsko, Santa Maria del Camí (Barcelona)	14. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
46-4	Španělsko, Santa Maria del Camí (Barcelona)	14. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
46-5	Španělsko, Santa Maria del Camí (Barcelona)	14. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
46-6	Španělsko, Santa Maria del Camí (Barcelona)	14. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
46-7	Španělsko, Santa Maria del Camí (Barcelona)	14. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
46-8	Španělsko, Santa Maria del Camí (Barcelona)	14. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
46-9	Španělsko, Santa Maria del Camí (Barcelona)	14. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
47	Španělsko, La Pobla de Cérvoles (Lleida Distr.)	16. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
47-3	Španělsko, La Pobla de Cérvoles (Lleida Distr.)	16. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
47-4	Španělsko, La Pobla de Cérvoles (Lleida Distr.)	16. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
47-5	Španělsko, La Pobla de Cérvoles (Lleida Distr.)	16. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
47-6	Španělsko, La Pobla de Cérvoles (Lleida Distr.)	16. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
47-7	Španělsko, La Pobla de Cérvoles (Lleida Distr.)	16. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
47-8	Španělsko, La Pobla de Cérvoles (Lleida Distr.)	16. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
47-9	Španělsko, La Pobla de Cérvoles (Lleida Distr.)	16. 05. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
48	Španělsko, Cubells (Lleida Distr.)	04. 06. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
48-3	Španělsko, Cubells (Lleida Distr.)	04. 06. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
48-4	Španělsko, Cubells (Lleida Distr.)	04. 06. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
48-5	Španělsko, Cubells (Lleida Distr.)	04. 06. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
48-6	Španělsko, Cubells (Lleida Distr.)	04. 06. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
48-7	Španělsko, Cubells (Lleida Distr.)	04. 06. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
48-8	Španělsko, Cubells (Lleida Distr.)	04. 06. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
48-9	Španělsko, Cubells (Lleida Distr.)	04. 06. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
49	Španělsko, Calaf (Barcelona Distr.)	04. 06. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
49-3	Španělsko, Calaf (Barcelona Distr.)	04. 06. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
49-4	Španělsko, Calaf (Barcelona Distr.)	04. 06. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
49-5	Španělsko, Calaf (Barcelona Distr.)	04. 06. 2008	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
50	Moldavsko, Bádzajii Vechi, Edinets zaion	11. 07. 2 009	<i>Triticum vulgare</i>	etanol
50-3	Moldavsko, Bádzajii Vechi, Edinets zaion	11. 07. 2 009	<i>Triticum vulgare</i>	etanol
50-4	Moldavsko, Bádzajii Vechi, Edinets zaion	11. 07. 2 009	<i>Triticum vulgare</i>	etanol
50-5	Moldavsko, Bádzajii Vechi, Edinets zaion	11. 07. 2 009	<i>Triticum vulgare</i>	etanol
50-6	Moldavsko, Bádzajii Vechi, Edinets zaion	11. 07. 2 009	<i>Triticum vulgare</i>	etanol
50-7	Moldavsko, Bádzajii Vechi, Edinets zaion	11. 07. 2 009	<i>Triticum vulgare</i>	etanol
50-8	Moldavsko, Bádzajii Vechi, Edinets zaion	11. 07. 2 009	<i>Triticum vulgare</i>	etanol
50-9	Moldavsko, Bádzajii Vechi, Edinets zaion	11. 07. 2 009	<i>Triticum vulgare</i>	etanol
51	Česká republika, Hevlín	15. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
51-3	Česká republika, Hevlín	15. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
51-4	Česká republika, Hevlín	15. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
51-5	Česká republika, Hevlín	15. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
51-6	Česká republika, Hevlín	15. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
51-7	Česká republika, Hevlín	15. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
51-8	Česká republika, Hevlín	15. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
52-1	Česká republika, Hrádek	15. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
52-2	Česká republika, Hrádek	15. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
52-3	Česká republika, Hrádek	15. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
52-4	Česká republika, Hrádek	15. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
52-5	Česká republika, Hrádek	15. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
52-6	Česká republika, Hrádek	15. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
52-7	Česká republika, Hrádek	15. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
52-8	Česká republika, Hrádek	15. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol

53-1	Česká republika, Slavkov u Brna	18. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
53-2	Česká republika, Slavkov u Brna	18. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
53-3	Česká republika, Slavkov u Brna	18. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
53-4	Česká republika, Slavkov u Brna	18. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
53-5	Česká republika, Slavkov u Brna	18. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
53-6	Česká republika, Slavkov u Brna	18. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
54-1	Česká republika, Znojmo	06. 07. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
54-2	Česká republika, Znojmo	06. 07. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
54-3	Česká republika, Znojmo	06. 07. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
56-1	Česká republika, Valtice	06. 07. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
61-1	Moldavsko, Edinet Brinzeni (road to Boedroi)	15. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
61-2	Moldavsko, Edinet Brinzeni (road to Boedroi)	15. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
61-3	Moldavsko, Edinet Brinzeni (road to Boedroi)	15. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
61-4	Moldavsko, Edinet Brinzeni (road to Boedroi)	15. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
61-5	Moldavsko, Edinet Brinzeni (road to Boedroi)	15. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
61-6	Moldavsko, Edinet Brinzeni (road to Boedroi)	15. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
63-1	Moldavsko, Edinet Brinzeni (road toHancautsy)	17. 06. 2010	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
63-2	Moldavsko, Edinet Brinzeni (road toHancautsy)	17. 06. 2010	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
63-3	Moldavsko, Edinet Brinzeni (road toHancautsy)	17. 06. 2010	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
63-4	Moldavsko, Edinet Brinzeni (road toHancautsy)	17. 06. 2010	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
63-5	Moldavsko, Edinet Brinzeni (road toHancautsy)	17. 06. 2010	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
63-6	Moldavsko, Edinet Brinzeni (road toHancautsy)	17. 06. 2010	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
63-7	Moldavsko, Edinet Brinzeni (road toHancautsy)	17. 06. 2010	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
64-1	Moldavsko, Edinet Brinzeni (road toBunesti)	14. 06. 2010	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
64-2	Moldavsko, Edinet Brinzeni (road toBunesti)	14. 06. 2010	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
64-3	Moldavsko, Edinet Brinzeni (road toBunesti)	14. 06. 2010	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
64-4	Moldavsko, Edinet Brinzeni (road toBunesti)	14. 06. 2010	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
64-5	Moldavsko, Edinet Brinzeni (road toBunesti)	14. 06. 2010	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
64-6	Moldavsko, Edinet Brinzeni (road toBunesti)	14. 06. 2010	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
64-7	Moldavsko, Edinet Brinzeni (road toBunesti)	14. 06. 2010	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
65-1	Moldavsko, Edinet Zabriceni	18. 06. 2010	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
65-2	Moldavsko, Edinet Zabriceni	18. 06. 2010	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
65-3	Moldavsko, Edinet Zabriceni	18. 06. 2010	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
71-1	Česká republika, Hrádek	10. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
71-2	Česká republika, Hrádek	10. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
71-3	Česká republika, Hrádek	10. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
71-4	Česká republika, Hrádek	10. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
71-5	Česká republika, Hrádek	10. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
71-6	Česká republika, Hrádek	10. 06. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
72-1	Česká republika, Odry	15. 07. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
73-1	Česká republika, Chropyně	07. 07. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
73-2	Česká republika, Chropyně	07. 07. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
73-3	Česká republika, Chropyně	07. 07. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
74-1	Česká republika, Hrobčice	07. 07. 2009	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
75-1	Česká republika, Hrabětice	15. 08. 2011	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
75-2	Česká republika, Hrabětice	15. 08. 2011	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
75-3	Česká republika, Hrabětice	15. 08. 2011	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol
75-4	Česká republika, Hrabětice	15. 08. 2011	<i>Hordeum vulgare</i>	etanol

Příloha 2 Seznam vzorků čeledi Adelgidae

Číslo vzorku	Druh	Lokalita	Hostitelská rostlina	Způsob uchovávání
3059	<i>Eopineus strobi</i>	Lednice	<i>Pin. strobus</i>	-80 °C
3062	<i>Pineus pini</i>	Chvalčov	<i>Pin. sylvestris</i>	-80 °C
3071-2	<i>Pineus cembrae</i>	Těchobuz u Pacova	<i>Pin. cembra</i>	-80 °C
3076	<i>Gilletteela cooleyi</i>	Bystřice pod Hostýnem	<i>Ps. menziesii</i>	-80 °C
3098	<i>Eopineus strobi</i>	Nový Dvůr	<i>Pin. strobus</i>	-80 °C
3228-9	<i>Gilletteela coweni</i>	Praha, Břevnov	<i>Ps. menziesii</i>	etanol
3230-1	<i>Pineus pini</i>	Praha, Břevnov	<i>Pin. sylvestris</i>	-80 °C
3326-8	<i>Cholodkovskia viridana</i>	Nový Dvůr	<i>L. kaempferi</i>	-80 °C
3345	<i>Aphrastasia pectinatae</i>	Vilnius	<i>A. concolor</i>	etanol
3487	<i>Eopineus pineoides</i>	Šumava Mts., Jenišov	<i>P. abies</i>	etanol
3497	<i>Pineus cembrae</i>	Těchobuz u Pacova	<i>Pin. cembra</i>	-80 °C
3498-9	<i>Dreyfusia piceae</i>	Bystřice pod Hostýnem	<i>A. alba</i>	etanol
3572	<i>Eoineus strobi</i>	Č. Budějovice	<i>Pin. strobus</i>	-80 °C
3576	<i>Pineus pini</i>	Č. Budějovice	<i>Pin. sylvestris</i>	-80 °C
3579	<i>Gilletteella coweni</i>	Stráž nad Nežárkou	<i>Ps. menziesii</i>	-80 °C
3582	<i>Gilletteella coweni</i>	Stráž nad Nežárkou	<i>Ps. menziesii</i>	-80 °C
3583	<i>Pineus cembrae</i>	Buchlovice	<i>Pin. cembra</i>	-80 °C
3622	<i>Dreyfusia piceae</i>	Č. B., Branišov	<i>A. alba</i>	-80 °C
10536	<i>Pineus cembrae</i>	Těchobuz u Pacova	<i>Pin. cembra</i>	etanol
10539-41	<i>Dreyfusia nordmanninanae</i>	Libín	<i>A. alba</i>	-80 °C
10555	<i>Adelges laricis</i>	Buchlovice	<i>P. abies</i>	-80 °C
10567	<i>Adelges laricis</i>	Buchlovice	<i>P. abies</i>	-80 °C
10575	<i>Pineus orientalis</i>	Lednice	<i>P. orientalis</i>	-80 °C
10580-2	<i>Pineus orientalis</i>	Lednice	<i>P. orientalis</i>	-80 °C
10636	<i>Adelges laricis</i>	Buchlovice	<i>P. abies</i>	-80 °C
10652	<i>Pineus orientalis</i>	Buchlovice	<i>P. orientalis</i>	-80 °C
10655-7	<i>Pineus orientalis</i>	Buchlovice	<i>P. orientalis</i>	-80 °C
10678	<i>Pineus orientalis</i>	Buchlovice	<i>P. orientalis</i>	-80 °C
10679	<i>Adelges tardus</i>	Tesák	<i>P. abies</i>	-80 °C
10688-9	<i>Adelges laricis</i>	Nový Dvůr	<i>P. abies</i>	-80 °C
10720	<i>Adelges laricis</i>	Těchobuz, zámek	<i>P. abies</i>	-80 °C
10736	<i>Dreyfusia prelli</i>	Buchlovice	<i>P. orientalis</i>	-80 °C
10829	<i>Adelges laricis</i>	Fulnek	<i>P. abies</i>	-80 °C
10839	<i>Adelges laricis</i>	Zdiměřice	<i>P. abies</i>	-80 °C
10890	<i>Gilletteella cooleyi</i>	Praha	<i>P. pungens</i>	-80 °C
10841-3	<i>Dreyfusia prelli</i>	Buchlovice	<i>P. orientalis</i>	-80 °C
10960	<i>Adelges laricis</i>	Nový Dvůr	<i>P. abies</i>	-80 °C

11002	<i>Dreyfusia nordmanniana</i>	Buchlovice	<i>P. orientalis</i>	-80 °C
11009	<i>Gilletteella cooleyi</i>	Č. Budějovice	<i>P. pungens</i>	-80 °C
11011	<i>Gilletteella cooleyi</i>	Č. Budějovice	<i>P. pungens</i>	-80 °C
11026-8	<i>Gilletteella cooleyi</i>	Praha	<i>P. pungens</i>	-80 °C
11031	<i>Adelges laricis</i>	Nový Dvůr	<i>P. abies</i>	-80 °C
11196	<i>Adelges tardus</i>	Č. B., Stromovka	<i>P. abies</i>	-80 °C
11206	<i>Adelges tardus</i>	Č. B., Stromovka	<i>P. abies</i>	-80 °C
11340	<i>Adelges tardus</i>	Praha, Břevnov	<i>P. abies</i>	-80 °C
11350	<i>Sacchiphantes abietis</i>	Srbsko, Kapaonik Natl.Park	<i>P. abies</i>	-80 °C
11362	<i>Sacchiphantes viridis</i>	Lednice	<i>P. abies</i>	-80 °C
11380	<i>Sacchiphantes viridis</i>	Č. B., Haklovy Dvory	<i>P. abies</i>	-80 °C
11413	<i>Sacchiphantes viridis</i>	Lednice	<i>P. abies</i>	-80 °C
11426	<i>Sacchiphantes viridis</i>	C. Budějovice	<i>P. abies</i>	-80 °C
11458	<i>Adelges tardus</i>	Č. B., Stromovka	<i>P. abies</i>	-80 °C
11500	<i>Adelges laricis</i>	Č. B., Borek	<i>P. abies</i>	-80 °C
11550	<i>Sacchiphantes viridis</i>	Strmilov	<i>P. abies</i>	-80 °C
11552	<i>Sacchiphantes viridis</i>	Strmilov	<i>P. abies</i>	-80 °C
11573	<i>Sacchiphantes viridis</i>	Želetava	<i>P. abies</i>	-80 °C
11575	<i>Sacchiphantes viridis</i>	Želetava	<i>P. abies</i>	-80 °C
11614	<i>Sacchiphantes viridis</i>	Lednice	<i>Pin. glauca</i>	-80 °C
11619-20	<i>Sacchiphantes viridis</i>	Fulnek	<i>P. abies</i>	-80 °C
11624-5	<i>Sacchiphantes abietis</i>	Šumava Mts., Jenišov	<i>P. abies</i>	-80 °C
11661	<i>Adelges tardus</i>	Šumava Mts., Jenišov	<i>P. abies</i>	-80 °C
11697	<i>Sacchiphantes abietis</i>	Šumava Mts., Vítkův Kámen	<i>P. abies</i>	-80 °C
12009-11	<i>Dreyfusia nordmanniana</i>	Buchlovice	<i>P. orientalis</i>	-80 °C

Vysvětlivky:

A. concolor... *Abies concolor* *P. abies*... *Picea abies* *Pin. glauca*... *Pinus glauca*
A. alba... *Abies alba* *P. orientalis*... *Picea orientalis* *Pin. sylvestris*... *Pinus sylvestris*
L. kaempferi... *Larix kaempferi* *P. pungens*... *Picea pungens* *Ps. menziesii*... *Pseudotsuga menziesii*

Příloha 3 Syntéza výsledků u vzorků testovaných metodou DGGE i RFLP
(pořadí bakterií nesouvisí s pořadím enzymů)

Číslo vzorku	Druh	DGGE	RFLP (fragmenty v bp)
3059	<i>Pineus strobi</i>	<i>Sodalis</i> like	bez našťipání
3072	<i>Pineus cembrae</i>	<i>Sodalis</i> like	bez našťipání

3098	<i>Pineus strobi</i>	<i>Providencia</i> sp. <i>Gluconob. sp./ Ameya. sp.</i>	ClaI (450, 1100) SalI (650, 700, 1100)
3228	<i>Gilletteela coweni</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	bez naštípání
3231	<i>Pineus pini</i>	<i>Gluconob. sp./ Ameya. sp.</i>	SalI (650, 700, 850)
3328	<i>Cholodkovskia viridana</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	bez naštípání
3572	<i>Pineus strobi</i>	<i>Burkholderia</i> sp. <i>Sodalis</i> like <i>Providencia</i> sp.	ClaI (450, 1100) SalI (650, 700, 1100) SacI (470, 1050)
10539	<i>Dreyfusia nordmanninanae</i>	<i>Ecksteinia adelgidicol</i> , <i>Steffania adelgidicola</i>	bez naštípání
10555	<i>Adelges laricis</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	SacI (470, 1050) SalI (650, 720, 850)
10582	<i>Pineus orientalis</i>	<i>Providencia</i> sp.	SalI (650, 700, 1100)
10656	<i>Pineus orientalis</i>	<i>Sodalis</i> like	SalI (650, 700, 1100)
10678	<i>Pineus orientalis</i>	-	SalI (650, 700, 1100)
10688	<i>Adelges laricis</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	SacI (470, 1050) SalI (650, 700, 850)
10843	<i>Dreyfusia prelli</i>	bez PCR produktu	SalI (650, 700, 850)
10960	<i>Adelges laricis</i>	<i>Burkholderia</i> sp. <i>Altererythrobacter</i> sp.	SalI (650, 720, 850) SacI (470, 1050)
11009	<i>Gilletteella cooleyi</i>	<i>Burkholderia</i> sp. <i>Sodalis</i> like	SacI (500, 1050)
11027	<i>Gilletteella cooleyi</i>	<i>Burkholderia</i> sp. <i>Sodalis</i> like	SacI (470, 1050)
11031	<i>Adelges laricis</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	SacI (470, 1050) SalI (650, 700, 850)
11196	<i>Adelges tardus</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	SacI (470, 1050) SalI (650, 700, 850)
11340	<i>Adelges tardus</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	SacI (470, 1050) SalI (650, 700, 850)
11350	<i>Sacchiphantes abietis</i>	<i>Burkholderia</i> sp. <i>Altererythrobacter</i> sp.	SalI (650, 700, 850)
11362	<i>Sacchiphantes viridis</i>	<i>Hafnia alvei</i> <i>Burkholderia</i> sp.	SalI (650, 700, 850)
11380	<i>Sacchiphantes viridis</i>	<i>Hafnia alvei</i> <i>Burkholderia</i> sp.	SalI (650, 700, 850)
11458	<i>Adelges tardus</i>	-	SacI (470, 1050) SalI (650, 700, 850)
11500	<i>Adelges laricis</i>	<i>Burkholderia</i> sp.	SalI (650, 700, 850)
11550	<i>Sacchiphantes viridis</i>	<i>Hafnia alvei</i> <i>Burkholderia</i> sp.	SalI (650, 700, 850)
11573	<i>Sacchiphantes viridis</i>	<i>Hafnia alvei</i> <i>Burkholderia</i> sp.	SalI (650, 700, 850)
11619	<i>Sacchiphantes viridis</i>	<i>Hafnia alvei</i> <i>Burkholderia</i> sp.	SalI (650, 700, 850)
11624	<i>Sacchiphantes abietis</i>	<i>Hafnia alvei</i> <i>Burkholderia</i> sp.	SalI (650, 700, 850)
11661	<i>Adelges tardus</i>	<i>Hafnia alvei</i> <i>Burkholderia</i> sp.	SacI (470, 1050) SalI (650, 700, 850)
11697	<i>Sacchiphantes abietis</i>	<i>Hafnia alvei</i> <i>Burkholderia</i> sp.	SalI (650, 700, 850)
12009	<i>Dreyfusia nordmanninanae</i>	bez PCR produktu	bez naštípání