

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Diplomová práce

**Molekulární analýza mitochondriálního genomu
Diuraphis noxia (Aphididae)**

Bc. Daniela Chundelová

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

České Budějovice
2012

Diplomová práce

Chundelová, D., 2012 : Molekulární analýza mitochondriálního genomu *Diuraphis noxia* (Aphididae) [Molecular analysis of the mitochondrial genom of *Diuraphis noxia* (Aphididae). Mgr.Thesis, in Czech] – 84p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Annotation

The complete sequence of mitochondrial DNA from *Diuraphis noxia* was obtained and characterized. The mitogenome contains a standard set of 13 protein-coding genes, 19 tRNA genes, 2 ribosomal RNA genes. A+T-rich and “repeats” regions in the same order as those of the other analyzed aphids. Comparison to mtDNAs from other Sternorrhyncha species obtained from GenBank revealed possible markers for studies on population differentiation. Phylogenetic analysis using parsimony and maximum likelihood confirmed the classification of *Diuraphis noxia* into the Aphididae.

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 jejich 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

Mé díky patří především školitelce Martině Žurovcové za odborné vedení a poskytnutí cenných rad a literatury, Janu Havelkovi za poskytnutí veškerého analyzovaného materiálu. V neposlední řadě také Aničce Sattranové a Andree Jarošové za vytvoření příjemné a motivující pracovní atmosféry v laboratoři a za všechny jejich rady a připomínky.

Zvláštní poděkování patří i mé rodině a přátelům za jejich podporu po celou dobu studia.

Obsah

| | |
|---|----|
| 1. Úvod..... | 1 |
| 1.1. Charakteristika mšice <i>Diuraphis noxia</i> (Kurdjumov)..... | 1 |
| 1.2. Geografické rozšíření a biologicko-hospodářský význam <i>Diuraphis noxia</i> ... | 2 |
| 1.3. Populačně-genetické studie <i>Diuraphis noxia</i> | 3 |
| 1.4. Mitochondriální DNA a její výhody jako molekulárního markeru..... | 5 |
| 1.4.1. Evoluce a funkce mitochondrií..... | 5 |
| 1.4.2. Mitochondrie živočichů..... | 6 |
| 1.4.3. Využití mitochondriální DNA jako genetického markeru..... | 7 |
| 1.4.4. Metody sekvenování mitochondriálních genomů..... | 9 |
| 2. Cíle práce..... | 11 |
| 3. Materiál a metody..... | 12 |
| 3.1. Materiál..... | 12 |
| 3.2. Izolace DNA..... | 13 |
| 3.2.1. Izolace pomocí kitu DNeasy blood and tissue | 13 |
| 3.2.2. Izolace pomocí kitu Invisorb Spin Tissue mini..... | 13 |
| 3.2.3. Izolace pomocí kitu ZR Genomic DNA II..... | 13 |
| 3.2.4. Izolace čisté mitochondriální DNA..... | 14 |
| 3.3. Primery..... | 16 |
| 3.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR)..... | 18 |
| 3.4.1. Reakční směs..... | 18 |
| 3.5.2. PCR profil pro amplifikaci jedntolivých fragmentů..... | 19 |
| 3.5. Gelová elektroforéza..... | 19 |
| 3.6. Přečišťování PCR produktu..... | 20 |
| 3.6.1. Přečišťování pomocí směsi ExoSap-IT..... | 20 |
| 3.7. Sekvenační reakce..... | 21 |
| 3.8. Vyhodnocení a zpracování sekvencí..... | 21 |
| 4. Výsledky..... | 24 |
| 4.1. Mitochondriální genom <i>Diuraphis noxia</i> | 24 |
| 4.1.1. Charakteristika mitochondriálního genomu <i>Diuraphis noxia</i> | 27 |
| 4.1.2. Geny kódující protein (PCG)..... | 28 |
| 4.1.3. tRNA..... | 29 |
| 4.1.4. rRNA a nekódující oblasti (AT-control region, Repeats region)..... | 32 |
| 4.2. Mezidruhové srovnání mitochondriálních genomů vybraných zástupců..... | 33 |
| podřádu Sternorrhyncha..... | 33 |
| 4.2.1. Srovnání velikosti mitogenomů a jejich nukleotidového složení..... | 34 |
| 4.2.2. Srovnání na základě změněného pořadí genů..... | 36 |
| 4.2.3. Analýza nukleotidové variability pro výběr možného..... | 39 |
| populačně-genetického markeru..... | 39 |
| 4.2.4. Fylogenetická rekonstrukce..... | 41 |
| 5. Diskuze..... | 44 |
| 5.1. Izolace DNA | 44 |
| 5.2. Optimalizace PCR reakční směsi a PCR profilu..... | 45 |
| 5.3 Charakteristika mitochondriálního genomu <i>Diuraphis noxia</i> | 46 |

| | |
|---|----|
| 5.4. Protein kódující geny..... | 47 |
| 5.5. tRNA..... | 48 |
| 5.6. rRNA a nekódující oblasti..... | 48 |
| 5.7. Analýza nukleotidové variability a fylogenetická rekonstrukce..... | 49 |
| 6. Závěr..... | 51 |
| 7. Literatura..... | 52 |
| 8. Přílohy..... | 69 |

1. Úvod

Čeď mšicovití (Aphididae) tvoří monofyletickou skupinu v řádu polokřídlí (Hemiptera), podřádu mšicosaví (Sternorrhyncha) a je příbuzná čeledi korovnicovitých (Adelgidae) a čeledi Phylloxeridae (bez českého názvu). Celkový počet druhů čeledi mšicovitých se odhaduje na 4000 a její zástupci jsou celosvětově rozšířenými škůdci rostlin, z hmyzu jsou považováni za největší agronomické škůdce vůbec (Dixon, 1985; Franzen et al., 2008). Společný předek těchto skupin existoval přibližně před 250 miliony let, nadčeď mšice (Aphidoidea) se pravděpodobně začala oddělovat před 150 miliony let, v období jury (Heie, 1987).

Mšice mají bodavě sací ústní ústrojí a poškozují rostlinu sáním z rostlinných pletiv. Při přijímání potravy vylučují sliny obsahující enzymy, které poškozují rostlinu. Může také docházet k přenosu virových onemocnění rostlin (Kiplagat 2005).

Mšice vykazují mutualistický vztah s endosymbiotickou bakterií *Buchnera aphidicola* (Enterobacteriaceae; Proteobakterie). Tato bakterie se v těle hostitele vyskytuje ve specializovaných buňkách označovaných bakteriocyty, které uvnitř těla vytvářejí volně organizovanou strukturu, bakteriom. Do dalších generací je předávána matkou přes vajíčka (Buchner, 1965; Baumann et al., 2000; Wernegreen 2002). Pro hostitele syntetizuje esenciální aminokyseliny a vitamíny. Bakterie naopak ztrácí geny pro transkripci, translaci či reparaci (Lai et al., 1994; Douglas, 1998; Baumann et al., 2000).

1.1. Charakteristika mšice *Diuraphis noxia* (Kurdjumov)

Mšice zhoubná (*Diuraphis noxia*, Kurdjumov), v literatuře nejčastěji označována RWA, tedy zkratkou svého anglického názvu Russian Wheat Aphid, který dostala podle místa prvotního známého výskytu, je významným škůdcem ječmene (*Hordeum vulgare* L.) a pšenice seté (*Triticum aestivum* L.) (Ennahli et al., 2009). Výskyt na planě rostoucích rostlinách ji poskytuje genetickou či biotypovou diverzitu (Butts et al., 1984; Kriel et al., 1984; Kindler et al., 1986; Weiland et al., 2008).

Diuraphis noxia dosahuje velikosti 1,5-2,5 mm, má světlezelené až žlutozelené tělo vřetenovitého tvaru, končetiny i tykadla má kratší než ostatní druhy mšic (Payton, 2004; Michaud et al., 2005).

Pro celou čeleď Aphidoidea včetně *Diuraphis noxia* je typický složitý životní cyklus ovlivněný klimatickými podmínkami, kde může docházet ke střídání hostitelů a také ke střídání pohlavního a nepohlavního rozmnožování (Hales et al., 1997; Llewellyn et al., 2004).

1.2. Geografické rozšíření a biologicko-hospodářský význam *Diuraphis noxia*

Původní oblastí výskytu mšice zhoubné je oblast střední Asie (Durr, 1983). Dále můžeme její stopy vysledovat do Afghánistánu, Iránu, zemí okolo Středozemního moře a jižního Ruska, odkud pocházejí první záznamy o *Diuraphis noxia*, tyto se datují do počátku 20. století (Grossheim, 1914; van Emden et al., 2007). Na konci 70. a začátku 80. let 20. století se začala rozšiřovat celosvětově. V jižní Africe se poprvé objevila během roku 1978 (Walters et al., 1980; Pakendorf, 1984), v roce 1980 byla objevena v Mexiku kam byla patrně zavlečena právě z Afriky (Gilchrist et al., 1984; Shufran et al., 2007). Na konci 80. let (1986) se z Mexika dostala do USA. Dále se pak šířila po celých Spojených státech (Stoetzel, 1987; van Emden et al., 2007; Weiland et al., 2008) až do Kanady, kde je od roku 1988 (Kindler et al., 1989; Peairs et al., 1989; Halbert et al., 1998). Ve stejném roce byla zaznamenána v Chile a o 4 roky později v Argentině (Ortego et al., 1994). V Maďarsku se objevila v roce 1989, patrně se sem rozšířila od Středozemního moře (Basky et al., 1991). V České republice se mšice zhoubná objevila v roce 1995 na Moravě, hostitelskou rostlinou byl ječmen a jedinci byli geneticky příbuzní se zástupci z Maďarska (Starý 1996; Starý et al., 2003).

V současné době je *Diuraphis noxia* velmi závažným a ekonomicky významným škůdcem pšenice a ječmene v oblastech zaměřených na jejich pěstování jako např.: Blízký východ, střední Asie, Čína, jižní Afrika, USA, Jižní a střední Amerika, Rusko, Francie, Německo, Rakousko (Du Toit et al., 1984; Stoetzel, 1987; Zhang, 1991; Black et al., 1992; Poprawski et al., 1992; Brooks et al., 1994; Halbert et al., 1998). V Iránu je také významným škůdcem, neboť se adaptovala na suché klima a

výkyvy teplot (Hughes et al., 1990; Moin et al., 1994; Butts et al., 1997). Je tedy patrné, že se vyskytuje ve všech hlavních oblastech, kde jsou pěstovány obilniny, kromě Austrálie (Quisenberry et al., 1998; Burd et al., 2006).

Rostlinu napadenou mšicí *Diuraphis noxia* poznáme podle bílých, žlutých či fialových podélných pruhů na listech. Tyto pruhy jsou způsobeny redukcí karotenoidů a chlorofylu a, b v pletivech poškozených enzymy ze slin mšice (Burd et al., 1996; Heng-Moss et al., 2003). Zároveň dochází k podélnému svinování listů. Listy svinuté do ruliček poskytují mšicím úkryt, vhodné místo k rozmnožování, ochranu před insekticidy i před přirozenými predátory (Webster et al., 1987; Robinson 1993; Burd et al., 1998; Payton, 2004). Kombinací výskytu těchto podélných pruhů a svinutých listů je pak výrazný pokles fotosyntézy, který celkově vede k oslabení rostliny a nižší produkci zrn (Fouché et al., 1984; Smith et al., 1991; Franzen et al., 2008). Při sání rostlinných šťáv může docházet k přenosu virových chorob. Mšice zhoubná funguje jako vektor pro virus žluté zakrslosti ječmene (Kiplagat 2005).

Jednou z možností ochrany úrody bylo vyšetí nových odrůd nesoucích geny pro rezistenci k této mšici (Liu et al., 2002; Gutschke et al., 2009). Objevily se však nové virulentní biotypy schopné napadnout i tyto rezistentní rostliny (Basky 2003; Haley et al., 2004; Dolatti et al., 2005; Ennahli et al., 2009).

1.3. Populačně - genetické studie *Diuraphis noxia*

Již od začátku svého šíření je mšice zhoubná podrobována mnoha genetickým studiím. Jejich cílem je především vyjasnit přesné migrační trasy mezi jednotlivými kontinenty či hledání variability mezi jednotlivými populacemi cílem odhadnout další směry šíření či identifikace agresivnějších biotopů.

V dosavadních studiích se nejčastěji požívali markery pro cytochrom oxidázu podjednotku I z mitochondriální DNA ovšem ani studie Shufrana (2007) zabývající se populacemi z jižní Afriky, Mexika, USA, Kanady, Francie a Turecka ani jeho pozdější studie (Shufran et al., 2009) studující populace z jižní Afriky, Sýrie, Etiopie, Turecka, České republiky a USA neprokázaly podstatnou variabilitu mezi zkoumanými populacemi. V rámci předběžného testování dalších možných markerů v naší laboratoři na obdobném souboru (lokality z Francie, Turecka, Iránu, Egypta,

České republiky, USA, Španělska, Maďarska, Francie a Alžírsku) jsme došli ke stejným výsledkům. Kromě COI byly skrínovány ještě fragmenty obsahující část mitochondriálního úseku s ATP6 a ATP8 a oblasti AT a „repeats“, kde ovšem docházelo k technickým problémům v sekvenaci (Chundelová, Sattranová, unpublished). Podobných výsledků, tedy vykazujících žádnou nebo velmi nízkou genetickou variabilitu populací, bylo dosaženo i ve studii Lapitan (2007).

Mezi další markery pro studium patří metoda AFLP (amplified fragment length polymorphism), Liu et al. (2010) na základě analýzy AFLP-PCR podporují teorii 2 invazí *D. noxia* do USA. Jedné z Evropy, patrně ze Španělska a druhé z jižní Afriky přes Mexiko.

K podobným výsledkům, 2 invazím do USA, dospěl ve své studii i Puterka et al. (1993), použili metodu RAPD-PCR (Random amplification polymorphic DNA), objevili však pouze nízkou genetickou variabilitu uvnitř populací. Ačkoliv metoda RAPD-PCR vykazuje v porovnání s ostatními markery vyšší variabilitu, výsledky se obtížně interpretují, neboť jde o markery dominantní (není proto viditelný rozdíl mezi homozygotem a heterozygotem) (Munthali et al., 1992; Lowe et al., 1996), Navíc je tato metoda velmi citlivá na podmínky reakce a výsledky jsou téměř nereprodukovatelné.

Analýza mikrosatelitů byla použita v práci Dolatti et al. (2005), kdy byly zkoumány přírodní populace *D. noxia* v Iránu z různých geografických oblastí i hostitelských rostlin. Při použití 10 markerů pro mikrosatelity objevili 50 genotypů, některé z nich vzácné. Výsledky také poukazyvaly na korelaci mezi genetickou a geografickou vzdáleností a existenci jak holocyklického tak anholocyklického životního cyklu. Stejná sada mikrosatelitů byla použita i v práci Shuffran et al. (2009) zabývající se studiem *D. noxia* na území USA, ovšem zde bylo objeveno pouze malé množství polymorfních lokusů.

V neposlední řadě se ke studiu používají i alozymy případně sekvence z primárního endosymbionta *Buchnera aphidicola*. Ani zde se však neprokázala výrazná variabilita mezi populacemi (Puterka et al., 1993; Belay et al., 2003).

Otázka přesných migračních tras či teorie mnohanásobné introdukce v jednotlivých zemích je tedy stále nejasná.

1.4. Mitochondriální DNA a její výhody jako molekulárního markeru

1.4.1. Evoluce a funkce mitochondrií

Mitochondrie je energií produkující vnitrobuněčná organela. V každé buňce je několik mitochondrií a v každé mitochondrii je mnoho kopií mtDNA (Birky, 1978). Nejpravděpodobněji je jejím předkem α - proteobakterie a fylogenetické analýzy založené na sekvencích proteinů z mitochondriálního genomu dokazují, že mitochondrie se z α - proteobakterií během evoluce vyvinula pouze jednou. V současné době jsou nejbližším volně žijícím příbuzným bakterie rodu *Rickettsia* (Lang et al., 2004).

Velikost genomu proteobakterií je zhruba 4000-6000kb a současná eukaryotická mitochondrie je velká pouze 15-40 kb. Je tedy patrné, že v průběhu evoluce došlo k redukci velikosti mitochondriálního genomu (mitogenomu). Avšak vzhledem k tomu, že mitochondrie těží z buněčného prostředí bohatého na živiny, mohla se tato redukce velké části jejích genů uskutečnit. Ztráta biosyntetických a metabolických genů spolu s extrémně odlišným selektivním tlakem uvnitř hostitelské buňky jsou pravděpodobně zodpovědné za zrychlenou evoluci sekvencí a změny v nukleotidovém složení (pokles obsahu nukleotidů G a C) (Lang et al., 2004). Další redukce patrně proběhla postupným přesunem mitochondriálních genů do genomu nukleárního (Thorsness et al., 1996; Timmis et al., 2004). Mitochondrie si do dnešní doby zachovala vlastní systémy pro transkripci a translaci (Boore et al., 2005).

Kopie mitochondriální DNA v nukleárním genomu byly poprvé popsány u myši domácí (*Mus musculus*), ale vyskytují se u mnoha eukaryot. Označují se jako NUMTs (nuclear mitochondrial sequences) (duBuy et al., 1967; Bensasson et al., 2001; Richly et al., 2004). V nukleárním genomu se včleňují do mezigenových oblastí nebo do intronů kódujících genů (Blanchard et al., 1996). Migrace genů z mitochondrie do jádra byla stěžejním krokem v přeměně proto-mitochondrie v integrovanou subcelulární organelu. Migrace z genů do jádra je stále probíhající proces (Lang et al., 2004).

Všechny polypeptidy, které mitochondrie kóduje, úzce spolupracují s nukleárně kódovanými a ve 4 proteinových komplexech ovlivňují oxidativní fosforylaci (Boore, 1999; Nieminen, 2003), tedy stadium buněčného dýchání, kdy je vytvořena většina ATP. Nesprávné fungování tohoto systému je ve většině případů

letální (Gerber et al., 2001; Bazin et al., 2006). Dále se mitochondrie podílejí na vývoji (Krakauer et al., 1999; Yost et al., 1995) a stárnutí (Nagley et al., 1998).

Prvním osekvenovaným mitogenomem byl mitochondriální genom člověka. Šlo vlastně o mozaiku poskládanou z mtDNA placenty, ale vyskytovaly se i sekvence mtDNA z HeLa buněk (buňky z první lidské nádorové linie) (Droujin, 1980; Anderson et al., 1981).

Vzhledem ke své malé velikosti je osekvenování celého mitochondriálního genomu vybraného organismu relativně rychlé, takže v poslední době počet uveřejněných sekvencí v databázi GenBank značně narůstá. Jenom v rámci Hexapoda je v současnosti k dispozici 198 mitogenomů. Je však zřejmé, že se pozornost soustřeďuje na hospodářsky nebo ekologicky významné skupiny, takže taxonomické zastoupení je velmi nevyrovnané. Např. zatímco v řádu Lepidoptera najdeme 22 mitogenomů a 25 u řádu Coleoptera, Hemiptera mají dokonce 41 úplných sekvencí. Jen 9 z nich ale reprezentuje Sternorrhyncha a mšice pouze 2 mitogenomy.

1.4.2. Mitochondrie živočichů

U živočichů je mitochondriální genom (mitogenom) téměř vždy cirkulární (Boore et al., 2005). Výjimku tvoří 3 skupiny žahavců (Cnidaria): Cubozoa, Scyphozoa, Hydrozoa a korýši (Crustacea), jejichž mitogenom je lineární (Bridge et al., 1992; Raimond et al., 1999). Mitogenom tvoří dvouvláknová molekula s velikostí zhruba 14-42kb (Wilson et al., 1985; Wolstenholme, 1992). Dědí se v materiální linii a má hemizygotní konstituci. Živočišný mitochondriální genom je velmi kompaktní a bez intronů (Lang et al., 2004; Behura et al., 2011). Obsahuje celkem 37 genů (z toho 13 kódujících proteiny, 22 pro tRNA a 2 pro rRNA), které jsou naskládány na obou řetězcích (detailní přehled viz. tabulka 1). Pořadí genů je v rámci kmenu konzervované, ale může být rozdílné mezi kmeny (Wolstenholme, 1992; Saccone et al., 1999; Lang et al., 1999; Adams et al., 2003; Nosek et al., 2003). Mitochondriální geny se vyvíjejí rychleji než geny nukleární (Gissi et al., 2000), přičemž geny pro tRNA jsou vystaveny více změnám v jejich pozicích než geny pro proteiny a rRNA. Obvykle je v mitochondriálním genomu i jedna nebo výjimečně více nekódujících oblastí. První se nejčastěji vyskytuje za 12S rRNA, ale její přesná poloha závisí na přeskupení tRNA

během evoluce. Tato oblast má snížený obsah nukleotidů G a C naopak se v ní mohou vyskytovat repetice, obrácené repetice či řetězce nukleotidů T či A či AT. Obsah těchto nukleotidů je od 85 do 96% u již osekvenovaných zástupců hmyzu (Zhang et al., 1997) a bývá často označována jako domnělý začátek DNA replikace a oblast odkud začíná transkripce, proto byla pojmenována „control region“ (Clayton, 1982, 1991; Shadel et al., 1997). Variabilita ve velikosti mitochondriálního genomu blízce příbuzných taxonů je obvykle důsledkem variability v délce repetic v nekódující oblasti nikoliv v počtu genů. (Wolstenholme, 1992; Zhang et al., 1997; Boore, 1999). Druhá nekódující oblast se pak vyskytuje za genem ND3 a má také nižší obsah nukleotidů G a C (Thao et al., 2004). V porovnání s mt genomem obratlovců je však v mitogenu hmyzu větší obsah nukleotidů A a T i mimo nekódující oblasti (Zhang et al., 1997).

Tab. 1: Detailní přehled genů kódovaných v mitochondriální DNA

| | |
|---|---|
| 3 podjednotky cytochrom oxidázy | COI, COII, COIII |
| 2 podjednotky ATP syntázy | ATP 6, ATP8 |
| 7 podj. NADH dehydrogenázy | ND1,ND2,ND3,ND4,ND4L,ND5,ND6 |
| cytochrom b | cytB |
| 2 geny kódující velkou a malou podj. rRNA | 16S (rrnS), 12S (rrnL) |
| 22 genů kódujících tRNA | 2 pro leucin, 2 pro serin, ostatní AK 1krát |

1.4.3. Využití mitochondriální DNA jako genetického markeru

Molekulární markery jsou v současné době velmi významným pomocníkem při řešení fylogenetických, ekologických či evolučních problémů obzvláště u rychle se vyvíjejících skupin organismů. Díky nim je také možné studium genetické struktury živých populací. Můžeme je použít u všech skupin organismů a na všechna vývojová stadia a nejsme limitováni ani množstvím studovaného materiálu.

Molekulární markery lze rozdělit na dvě skupiny, první jsou proteinové markery (alozymy) a druhou DNA markery. Ty dále rozdělujeme na jaderné a mitochondriální, v obou případech pak markerem může být kódující i nekódující oblast (Loxdale et al., 1998; Nordborg et al., 2002; Footit et al., 2008). Mitochondriální DNA je vzhledem ke

svým četnějším kopiím v buňce následně lépe detekovatelná i ze starších vzorků (Loxdale et al., 1998; Caterino et al., 2000), a hemizygotní stav usnadňuje identifikaci haplotypů.

Vzhledem ke svým vlastnostem jako je jednoduchá a uniformní organizace genetické struktury, absence genetické rekombinace mezi molekulami, materiální dědičnost, replikace nezávisleána nukleárním genomu a relativně vysoká evoluční rychlost, jsou různé lokusy z mitochondriální DNA velmi oblíbeným markerem pro studie fylogenetických vztahů na různých taxonomických úrovních, fylogeografie a populační struktury v rámci druhu (Wilson et al., 1985; Arctander, 1995; Moore, 1995; Boore et al., 1995, 1998; Zhang et al., 1997; Boore 1999; Curole et al., 1999; Frohlich et al., 1999; Avise, 2000; Downie, 2002; Nyakaana et al., 2002). Dle práce Caterino et al. (2000) je nejpoužívanějším markerem pro evoluční studie hmyzu část genu pro cytochrom oxidázu podjednotku I, která je také markerem vybraným pro molekulární identifikaci druhů – „DNA Barcoding“ (Hebert et al., 2003a).

Pro fylogenetické rekonstrukce je výhodnější používat porovnávání celých mitogenomů genomů popřípadě proteiny kódujících genů (Ingman et al., 2001; Nardi et al., 2003; Boore et al., 2004; Macey et al., 2004). Genové uspořádání celého mitochondriálního genomu (přeskupování genů, editace tRNA, sekundární struktury tRNA, způsoby replikace a transkripce, fyzikální struktura mt DNA, uspořádání genů indikující společného předka) může poskytnout informaci o hlubokých fylogenetických vztazích a sloužit také k samotnému studování evoluce genomů (Bridge et al., 1992; Clayton, 1992; Macey et al., 1997c; Nikaido et al., 1999; Boore, 2000; Lavrov et al., 2000; Macey et al., 2000b; Schmitz et al., 2001; Boore et al., 2005). Studium mitochondriálních genomů může dále přispět k porozumění evoluce genetického kódu, využívání synonymních kodonů či transkripci a maturaci tRNA (Caterino et al., 2000).

Studie mitochondriálního genomu hmyzu dokumentují konzervované pořadí genů mezi mnoha odlišnými organismy, které naznačují společné ancestrální pořadí genů v této skupině (Shao et al., 2003). Za představitele tohoto konzervativního

uspořádání byla označena *Drosophila yakuba* (NC_001322.1) Dále dokazují, že existence druhé nekódující oblasti, vyskytující se nejčastěji mezi geny ND3 a ND5 je charakteristickým znakem mšic (Zhang et al., 1997).

Zatím nejkompexnější prací zabývající se studiem mitochondriálního genomu zástupců podřádu Sternorrhyncha, kam náleží mšice a tedy i *D. noxia*, je práce Thao et al. (2004). V ní bylo osekvenováno 8 kompletních mitochondriálních genomů, z toho 6 molic (*Aleurochiton aceris*, *Aleurodicus dugessi*, *Bemisia tabaci*, *Neomaskellia andropogonis*, *Trialeurodes vaporariorum*, *Tetraleurodes acaciae*), 1 mera (*Pachypsylla venusta*) a 1 mšice (*Schizaphis graminum*). Zjistili, že mera a mšice a 2 zástupci molic mají uspořádání genomu velmi podobné uspořádání genomu ancestrálního předka. U mšic je tRNA C (cystein) následována tRNA Y (tyrosin), což koresponduje s pořadím genů v ancestrálním genomu. Ostatní molice mají pořadí genů více variabilní, obzvlášť oblast mezi genem pro cytochrom oxidázu podjednotku III až po tRNA asparagin se může vyskytovat dokonce na 4 různých místech mitogenomu.

1.4.4 Metody sekvenování mitochondriálních genomů

Tak jako technický rozvoj molekulárních technik zasáhl všechny oblasti molekulárně-genetického výzkumu, postihl i metody sekvenování mitogenomů.

V zásadě existují 3 možné způsoby:

1. *Sekvenování celých genomů* (shotgun sekvenování) je metoda, která se používá již od konce 80. let. Její podstatou je náhodné naklonování a sekvenování neznámých genomových fragmentů v neznámém pořadí. Následně „sestavování“ genomu je závislé na tom, že tyto osekvenované úseky se náhodně překrývají. Při tomto sestavování je možno složit veškeré osekvenované genomy v našem analyzovaném vzorku, tedy kromě jaderného i např. mitochondriální či plastidový. Takto byla získána sekvence u *Acyrtosiphon pisum*, kdy sekvence z mitochondrie byla vlastně vedlejším produktem genomového projektu (Boore et al., 2005)

2. *Přímé sekvenování* („primer walking“) je metodou, která vyžaduje abychom znali alespoň část sekvenovaného genomu. Primer se naváže na známou část genomu a dále je amplifikována část neznámá, která je následně osekvenována. Z této

nové sekvence je pak možno navrhnout další primery a v sekvenování pokračovat. (Thao et al., 2004)

3. „*Long PCR*“ je metoda přizpůsobená pro malé genomy. Je vhodná pro kruhové genomy či pro genomy o jejichž struktuře máme podrobné znalosti. Úspěch této metody spočívá především ve správné izolaci DNA, aniž by došlo k jejímu mechanickému poškození a „rozlámání“. V prvním kroku po izolaci jsou naamplifikovány tzv. „ukotvující“ oblasti (velké zhruba 1kb), ty jsou vybrány z vysoce konzervovaných částí genomu a následně jsou osekvenovány. Z této sekvence jsou pak navrženy dlouhé PCR primery, které jsou již druhově specifické. Jejich pomocí jsou pak naamplifikovány neznámé části genomu. Tyto produkty „long PCR“ pak mohou být sekvenovány individuálně metodou „primer walking“ či smícháním několika produktů „long PCR“ mohou být vytvořeny náhodné knihovny a dále sekvenovány náhodné klony (Burger et al., 2007).

2. Cíle práce

- Osekvenovat mitochondriální genom mšice zhoubné (*Diuraphis noxia*, Kurdjumov)
- Porovnat strukturu mitochondriálního genomu *D. noxia* s mitochondriálními genomy mšic *S. graminum*, *A. pisum*, phylloxery *D. vitifoliae* a korovnice *D. prelli* a dalšími dostupnými vybranými zástupci podřádu Sternorrhyncha a vybrat nejvíce variabilní úseky (potenciální populačně-genetické markery)
- Na základě získaných dat ověřit fylogenetické vztahy mezi zástupci podřádu Sternorrhyncha

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

Vzorky mšice *Diuraphis noxia* k analýze poskytli Ing. Jan Havelka a RNDr. Petr Starý DrSc. (Biologické centrum AV ČR, Entomologický ústav), kteří provedli i terénní sběr (Strážnice 2009), druhovou identifikaci a založili laboratorní chov.

Vzhledem k tomu, že vzorky pocházely z laboratorního chovu, bylo možné odebrat větší množství klonálních jedinců najednou a dále analyzovat pouze část z nich, další materiál byl do okamžiku potřeby zmražen na -82°C.

Pro komparativní analýzu bylo použito celkem 11 zástupců podřádu Sternorrhyncha z čeledí mšicovití (Aphididae), korovnicovití (Adelgidae), merovití (Psyllidae), molicovití (Aleyrodidae) a čeledi Phylloxeridae. Kromě dat pro částečně osekvenovaný genom korovnice *Dreyfusia prelli*, která byla převzata z bakalářské práce Sattranové (2009), byla veškerá ostatní data vybrána v databázi GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Přístupové číslo do databáze a seznam všech vybraných jedinců jsou uvedeny v tabulce 2.

Tab. 2: Seznam zástupců podřádu Sternorrhyncha použitých k analýzám

| Číslo v databázi NCBI | Latinský název | Český název |
|-----------------------|----------------------------------|-------------------|
| dosud nepublikováno | <i>Diuraphis noxia</i> | mšice zhoubná |
| dosud nepublikováno | <i>Dreyfusia prelli</i> | není |
| NC_006158 | <i>Schizaphis graminum</i> | mšice obilná |
| NC_011594 | <i>Acyrtosiphon pisum</i> | kyjatka hrachová |
| DQ021446 | <i>Dactuloshaira vitifoliae</i> | mšička révokaz |
| NC_006157 | <i>Pachypsylla venusta</i> | není |
| NC_006279 | <i>Bemisia tabaci</i> | molice bavlníková |
| NC_006292 | <i>Tetraleurodes acaciae</i> | není |
| NC_006160 | <i>Aleurochiton aceris</i> | molice javorová |
| NC_005939 | <i>Aleurodicus dugessi</i> | není |
| NC_006159 | <i>Neomaskellia andropogonis</i> | není |

| | | |
|-----------|----------------------------------|-------------------|
| NC_006280 | <i>Trialeurodes vaporariorum</i> | molice skleníková |
|-----------|----------------------------------|-------------------|

Veškeré níže uvedené laboratorní metody byly prováděny výhradně s použitím aerosolových špiček, aby se předešlo případné kontaminaci cizorodou DNA. Pro extrakci DNA bylo vždy bráno 10 klonálních jedinců.

3.2. Izolace DNA

Vzhledem k tomu, že vzorky byly čerstvé, či v pozdější fázi mražené, bylo možné přistoupit rovnou k izolaci DNA. Pro izolaci DNA bylo vyzkoušeno několik komerčních kitů a byla vyzkoušena též izolace čisté mitochondriální DNA.

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

Izolace probíhala dle návodu výrobce. Lišila se pouze v posledním kroku eluce. Místo doporučené frakce o objemu 200 μ l byla provedena eluce DNA do dvou frakcí. První o objemu 100 μ l (polovina první frakce byla ihned po izolaci zamražena na -20°C a uchována pro pozdější použití. Druhá polovina byla ponechána při teplotě 4°C a ihned používána). Druhá frakce měla objem 75 μ l a byla ihned zamražena na -20°C .

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

Izolace probíhala dle návodu výrobce s následujícími úpravami: doba inkubace po přidání proteinázy K probíhala ve vodní lázni o teplotě 52°C po 2 hodiny, závěrečná eluce DNA rozdělena do dvou frakcí. První o objemu 100 μ l, polovina uskladněna při teplotě 4°C a ihned používána, druhá polovina zamražena na -20°C . Druhá frakce o objemu 50 μ l uskladněna při teplotě -20°C .

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

Izolace opět prováděna dle návodu výrobce. Změna byla udělána pouze v posledním kroku, kdy byla eluce opět provedena ve dvou frakcích, každá o objemu 20 μ l.

3.2.4. Izolace čisté mitochondriální DNA

Tato izolace byla prováděna dle protokolu uvedeného Tamurou a Aotsukou (1988), kteří tímto postupem extrahovali mtDNA *Drosophila melanogaster*.

Roztoky, které byly použity k izolaci a jejich složení je uvedeno v tabulce 3. Po přípravě byly všechny roztoky, kromě NaOH+SDS a Tris-HCl, vysterilovány.

Tab. 3: Složení pufrů a roztoků pro extrakci čisté mitochondriální DNA

| Roztok | Složení |
|---------------------------------------|---|
| Homogenizační pufr | 0,25M sacharosa |
| | 10mM EDTA |
| | 30mM Tris-HCl |
| Tris-EDTA (pH8) | 10mM Tris-HCl |
| | 10mM EDTA |
| | 0,15M NaCl |
| NaOH+SDS | 0,2M NaOH |
| | 1% SDS (sodium dodecylsulfate) |
| Octan draselný (3M draslík, 5M octan) | 29,4 g octanu draselného |
| | 11,5 ml ledové kys. octové |
| | dolít do 100 ml ddH ₂ O |
| Fenol-chloroformisoamylalkohol | 1 díl fenolu |
| | 1 díl směsi chloroformu a isopropylalkoholu v poměru 24:1 |
| Tris-HCl pufr (pH 8,0) | 10mM Tris-HCl |
| | 1mM EDTA |
| | 20 µg/ml RNasy |

Samotná izolace pak probíhala v následujících bodech:

V krocích 1-3 byl centrifugací připraven mitochondriální pelet, v následujících krocích byla mitochondriální DNA extrahována metodou alkalické lyze při níž je kruhová molekula mtDNA oddělena od lineární nukleární DNA.

1. 50 mg jedinců bylo dáno do zkumavky o velikosti 1,5 ml, bylo přidáno 500 µl vychlazeného homogenizačního pufru. Sterilním homogenizátorem byla provedena

homogenizace jedinců a následně bylo přidáno dalších 500 μ l vychlazeného homogenizačního pufru.

2. Tato suspenze byla centrifugována 1 minutu při 12 000g (při teplotě 4°C), supernatant přenesen do nové mikrozkušavky a centrifugován 10 minut při 12 000g (při teplotě 4°C).

3. Supernatant byl odpipetován a zbylý pelet byl resuspendován v 50 μ l pufru Tris-EDTA.

4. K resuspendovanému peletu bylo přidáno 100 μ l čerstvě připraveného roztoku NaOH+SDS. Směs byla krátce promíchána na vortexu a poté ponechána 5 minut na ledu.

5. Ke směsi bylo přidáno 75 μ l ledově vychlazené směsi octanu draselného, opět proběhlo krátké promíchání na vortexu a chlazení po dobu 5 minut na ledu.

6. Poté byla směs centrifugována 5 minut při 12 000 g (při teplotě 4°C). Supernatant byl odpipetován do nové zkumavky a bylo k němu přidáno stejné množství směsi fenol-chloroform-isopropylalkoholu. Nově vytvořená směs byla důkladně promíchána na vortexu.

7. Následně byla směs centrifugována 2 minuty při 12 000 g (při pokojové teplotě).

Vytvořená vodní fáze byla přepipetována do nové mikrozkušavky a byly k ní přidány 2 objemy absolutního etanolu.

8. Směs byla promíchána na vortexu a ponechána v klidu stát při pokojové teplotě po dobu 15ti minut.

9. Po uplynutí této doby byla směs opět centrifugována 2 minuty při 12 000g (při pokojové teplotě).

10. Vymytí mitochondriální DNA bylo provedeno přidáním 1 ml 70% etanolu, mikrozkušavka byla mírně promíchána na vortexu a vzorek byl vysušen ve vakuové centrifuze Eppendorf Concentrator 5310 (při pokojové teplotě).

11. Po vysušení bylo přidáno 50 μ l roztoku Tris-HCl a 1 μ l RNázy.

Vyizolovaná čistá mitochondriální DNA byla uchovávána zmražená na -20°C.

3.3. Primery

K amplifikaci jednotlivých úseků mitochondriálního genomu *Diuraphis noxia* byly nejprve použity primery univerzální, převzaté z prací Simon et al. (1994, 2006) a Folmer et al. (1994). Dále byly vyzkoušeny primery specifické pro čeled' Aphididae a Adelgidae, které byly v laboratoři PaedDr. Žurovcové navrženy pro předchozí práce. Po úspěšné amplifikaci úseků s pomocí těchto univerzálních a polospecifických primerů a jejich sekvenaci byly ze získaných sekvencí, metodou tzv. primer walking, navrženy primery specifické přímo pro *Diuraphis noxia*. Přehled použitých primerů s úspěšnou amplifikací je v tabulce 4. Přehled ostatních vyzkoušených primerů, se kterými neproběhla úspěšná amplifikace, je v tabulce 5 příloze 1.

U specifických primerů je v závorce uvedena jejich pozice v genomu, která se vztahuje k referenční sekvenci *Drosophila yakuba* (NC_001322.1) .

Tab. 4: Přehled použitých primerů

| Název primeru | Sekvence primeru 5'→3' | Směr |
|-------------------------|------------------------------------|------|
| TIN-24 ² | ATT TAC CCT ATC AAG GTA A | R |
| TM-J-210b ² | AAG CTA CTG GGT TCA TAC CC | F |
| TY-J-1460 ² | TAC AAT TTA TCG CCT AAA CTT CAG CC | F |
| LCO 1490 ¹ | GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G | F |
| C1-J-1859 ² | GGA ACW GGA TGA ACW GTT TAY CCW CC | F |
| HCO 2198 ¹ | TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA | R |
| C1-J-2756 ² | ACA TTC TTT CCT CAA CAT TT | F |
| TL2-N-3014 ² | TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A | R |
| TL2-J-3033 ² | TCT AAT ATG GCA GAT TAG TGC A | F |
| C2-N-3665 ² | CCA CAA ATT TCT GAA CAT TG | R |
| TK-J-3790 ² | CAT TAG ATG ACT GAA AGC AAG TA | F |
| C3-N-5460 ² | TCA ACA AAG TGT CAG TAT CA | R |
| N3-J-5747 ² | CCA TTT GAA TGT GGR TTT GAY CC | F |
| N5-J-6579 ² | TTC TGA CCA ACC TTG ATC | F |
| N5-N-7793 ² | TTA GGG TGA GAT GGA TTA GG | R |
| N4-J-8944 ² | GGA GCT TCA ACA TGA GCT TT | F |

| | | |
|-----------------------------------|--|---|
| CB-N-10920 ² | CCC TCA GAA TGA TAT TTG TCC TCA | R |
| CB-J-10933 ² | TAT GTA CTA CCA TGA GGA CAA ATA TC | F |
| CB-J-11335 ² | CAT ATT CAA CCA GAA TGA TA | F |
| N1-J-12585b ² | CCC TTA CGA ATT TGA ATA TAT CC | F |
| N1-N-12595 ² | GTA GCA TTT TTA ACT TTA TTA GAA CG | R |
| LR-J-13342 ² | CCT TCG CAC AGT CAA AAT ACT GC | F |
| SR-J-14612 ² | AGG GTA TCT AAT CCT AGT TT | F |
| SR-N-14745b ² | CCA GCA GYY GCG GTT ATA C | R |
| SR-N-14922 ² | AAG TTT TAT TTT GGC TTA | R |
| AphidCO2f ⁴ (3600) | CAA TGC TCA GAA ATT TGT GG | F |
| AphidCO3rev ⁴ (5400) | TTG GTG GTC AAT TTA ATC CTA | R |
| AdelCytBf1 ³ (10908) | TAT GTA TTA CCA TGA GGA CAA ATA TCA | F |
| AdelCytBr1 ³ (11340) | AAA AAT ATC ATT CTG GTT GAA TAT GA | R |
| Adel12Sfor2 ³ (14631) | AAT AGG GTA TCT AAT CCT AG | F |
| AdelATrev1 ³ (210) | TTG AAG TAT GAA TCC AAA AGC | R |
| AdelCOIf1 ³ (3023) | GCA GAA ACC AAT GCA ATG AAC | F |
| AphidND2-J80 ³ | GAT TTT CRA TAT GAA TAG GAT TAG | F |
| AphidND2-N743 ³ | AAT CCT AAT ATA GGA GGT AAA CC | R |
| DnCO3F ³ (4870) | CAA GAT TTA CAA TTA CAT TAA CTC | F |
| AdelCOIf1r1(3615) | CGT CCR GGA ATT GCA TCT ATT | R |
| AdelND5for1 ³ (7706) | GTA ACA AAA CCA GAA CTA TAA G | F |
| AdelND5rev1 ³ (7461) | AGT TCA TTC TTC TAC TTT AG | R |
| AdelCytBfor2 ³ (11261) | GCA AAT CCA ATA ATT ACT CC | F |
| DnoxRepF1 ⁴ (5950) | AAA GAA GCT GCT AAC TAT CTT | F |
| DnoxRepF1rev ⁴ (6922) | AAG ATA GTT AGC AGC TTC TTT | R |
| DnoxND3R ⁵ (5613) | CAA TTT AAA GAT CCA AAT TTT CAT TC | R |
| DnoxC3F ⁵ (5240) | GGA TTA CAT GTA ATT ATC GGA AC | F |
| DnoxND5F ⁵ (6700) | ATG TTG TAA TTG TAC CCA GAC | F |
| Dn12SF ³ (14400) | TAC AAA ATT TAA TAA TCT TAA CTA AAA TT | F |
| NoxATND2F ⁵ (105) | CCT CTA TAT ACT CTC TYT TC | F |
| NoxND2R ⁵ (732) | GAG TGA ATA ACA TCA TCT G | R |
| 11841-for ⁵ | ATC ATA ACG AAA CCG AGG TAA TGT ACC | F |
| NoxCO2F ⁵ (3590) | CCG ACC TGG ATT ATA TTT TGG | F |
| NoxCO2R ⁵ (4115) | GGT GCT ATT TGA GGA ATT AAG | R |
| NoxND2F ⁵ (735) | CTC AAT TAT AGG TTT ACC TCC | F |
| NoxND2R ⁵ (1530) | GAG ATG ATC CAA TTA TAC CTG | R |

| | | |
|--------------------------------|---|---|
| Nox16Srev ⁵ (12966) | CTT TGT TAC GAC TTG TC | R |
| NoxND6F ⁵ (9320) | CTG TGC TAA TCA TCA TCT TT | F |
| NoxND6R ⁵ (10213) | GTC GAA TAG GCC CCT TAT | R |
| NoxND4F ⁵ (8614) | GGT TGA GGT TAT CAA TAT GAA CG | F |
| NoxND4R ⁵ (7500) | GGA GTA GGA GCT GCT ATA GC | R |
| Noxnd5z4f ⁵ (8300) | GAG AAT ATT TAT TAT TAT TTT TAC ATT GAT TAC C | F |
| Noxnd5z5r ⁵ (7498) | CAC CTA AAC GAT TTA AAA TAA CAG TAA CTA TAC C | R |
| Noxnd4end ⁵ (8126) | CAT TGA TTA CCT TTA ATA | F |
| Noxnd5str ⁵ (7650) | CAG TAA CTA TAC CTG AAC | R |
| RepforE ⁵ (6272) | GAA GCT GCT AAC TAT CTT TTA AAG CA | F |
| ReprevF ⁵ (6930) | GCA TTA TAT TGA AGA TAT AAG GG | R |

1 Folmer et al., 1994

2 Simon et al., 1994, 2006

3 Žurovcová, Sattranová

4 Žurovcová

5 Žurovcová, Chundelová

3.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

3.4.1 Reakční směs

Směs pro PCR reakci byla míchána na ledu do mikrozkušavky o objemu 200 μ l. Celkový objem 1 reakce pak byl vždy 12,5 μ l. Při počátečních optimalizacích byly vyzkoušeny tyto polymerázy: Taq DNA polymerasa Unis (Top-Bio s.r.o.), TaKaRa Ex *Taq*, LA DNA polymerases Mix (Top-Bio s.r.o.), Combi PPP Master Mix (Top-Bio s.r.o.), TaKaRa LA *Taq*. Do všech reakcí bylo standardně přidáváno BSA (Bovine Serum Albumine 20mg/ml, Fermentas), pro stabilizaci reakčního prostředí a zvýšení účinnosti.

Jedna reakční směs měla následující složení: 6,75 μ l ddH₂O; 1,25 μ l 10x pufr (10x Ex *Taq* pufr (TaKaRa)); 1,0 μ l dNTP (2,5mM (TaKaRa)); 0,75 μ l primer F/R (5 μ M); 0,5 μ l BSA; 1,0 μ l templátové DNA; 0,1 μ l Taq DNA polymerasa Unis. Přidání polymerázy byl vždy poslední krok.

3.4.2. PCR profil pro amplifikaci jednotlivých fragmentů

Všechny amplifikace proběhly na přístroji Bioer XP thermocyklér. Standardní PCR profil měl tyto kroky: predenaturace 94°C, 1 min., následovalo 35 cyklů (denaturace 94°C, 30 s, annealing 41°C - 60°C 30s - 1min30s, elongace 68°C, 1minuta – 2min30s), reakci ukončila postelongace 72°C, 2 minuty.

V případě, že se amplifikace fragmentů nezdařila při standardním profilu a to ani po úpravě reakční směsi byla snížena teplota elongace v cyklicky se opakujících krocích amplifikace ze 68°C na 60°C.

Byla také vyzkoušena amplifikace dlouhých fragmentů pomocí tzv. „long PCR“ jehož profil byl následující: D94/1 min, (D94/30s, A50/1 min, E72/10 min)x 35 cyklů, E72/10 minut.

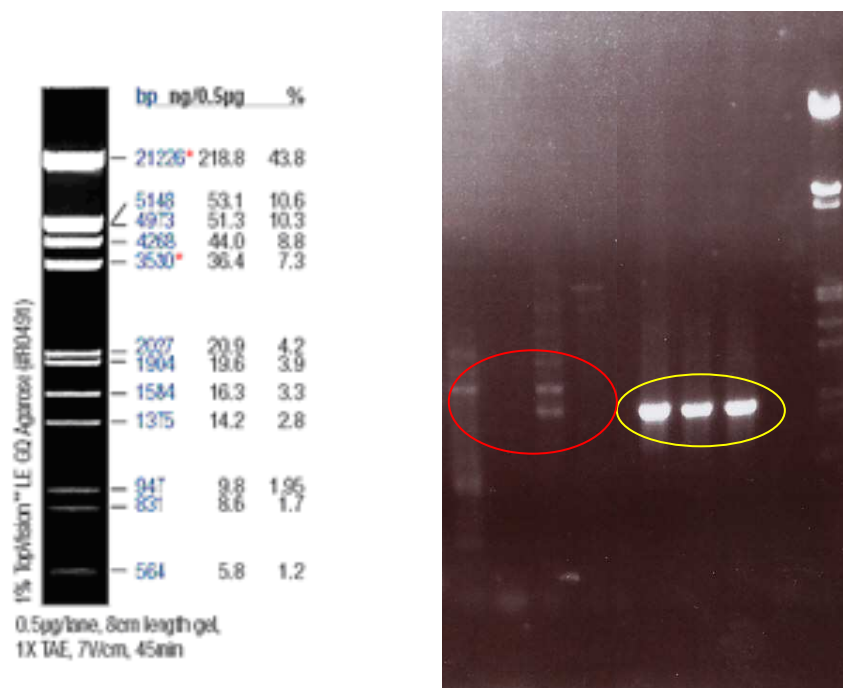
3.5. Gelová elektroforéza

Po proběhnutí PCR reakce byla její úspěšnost (velikost a množství produktu) ověřena pomocí elektroforetické verifikace.

1% agarózový gel byl připraven rozpuštěním 1g agarózy (SeaKem LE Agarose, Cambrex)) ve 100 ml 1xTAE pufru (zásobní roztok 50x TAE pufr je následujícího složení: 121 g TRIS; 28,55 ml kyseliny octové; 50 ml 0,5M EDTA pH 8,0; 421,45 ml H₂O) a následným rozehřátím v mikrovlnné troubě. Do takto připraveného gelu bylo dáno 10 µl ethidium bromidu o koncentraci 0,5µg/µl. Připravený gel byl nalit do formy s hřebínky. Tuhnutí gelu probíhalo přibližně 30 minut při pokojové teplotě.

Elektroforéza probíhala 45 minut při napětí 115V a pokojové teplotě. Pro určení množství a velikosti produktu byl spolu se vzorky nanesen také velikostní marker Lambda DNA/EcoRI+Hind III (FERMENTAS).

Rozdělený PCR produkt byl vizualizován na UVP transiluminátoru (UVP transilluminator). Výsledek byl fotograficky zdokumentován digitální kamerou UVP. Fotografie úspěšné amplifikace PCR produktu a velikostní marker jsou na obrázku 1.



Obr. 1: Ukázka běžného výsledku po agaróзовé elektroforéze. Vlevo je Lambda DNA/EcoRI+Hind III marker, vpravo pak gel s úspěšně amplifikovaným úsekem pro COI (označeno žlutě) a úsekem pro ND5 jehož amplifikace byla méně úspěšná a následovaly úpravy podmínek reakce (označeno červeně).

3.6. Purifikace PCR produktu

Po ověření úspěšnosti PCR pomocí gelové elektroforézy byl produkt enzymaticky přečištěn. Přečištění sloužilo k odstranění přesahujících jednořetězců DNA a případných volných nukleotidů.

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

K produktu po PCR reakci bylo přidáno 0,5 µl Exonuclease I (20 U/ µl, Fermentas) a 1,0 µl Shrimp Alkaline Phosphatase (1 U/ µl, Fermentas), vzorek byl promíchán na vortexu. Následující inkubace probíhala v Bioer XP thermocykléru při 37 °C 30 minut následovala inaktivace enzymů při 87 °C 15 minut. Takto přečištěný produkt byl použit do sekvenční reakce.

3.7. Sekvenační reakce

Směs pro sekvenační reakci byla míchána na ledu v mikrozkušnicích o objemu 200 μ l. Do reakce bylo dáno 0,5 μ l primeru, 0,5 - 2 μ l DNA (přesné množství bylo určeno na základě výsledků gelové elektroforézy, kdy byl náš produkt porovnán s velikostním markerem Lambda DNA/EcoRI+Hind III, a bylo tak zjištěno přibližné množství DNA v ng v daném produktu) a ddH₂O v takovém množství, aby celkový objem reakce činil 7,5 μ l. K analýze sekvencí byl použit automatický sekvenátor ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems, Biologické centrum AV ČR, ÚMBR, Laboratoř genomiky).

3.8. Vyhodnocení a zpracování sekvencí

Získané sekvence byly nejprve pro kontrolu identifikovány v programu BLAST v databázi NCBI BlastSearch (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

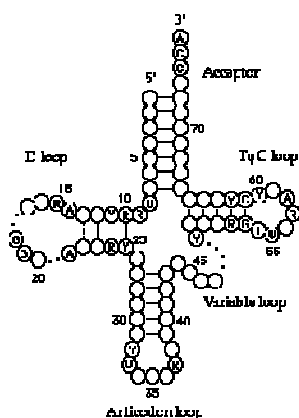
Po této kontrole byly ze sekvencí v programu SeqManII (programový balík DNASTAR ver. 4.0; DNASTAR, Inc.) vytvořeny contigové sekvence (soubor překrývajících se DNA segmentů, které společně vytvářejí celistvou kontinuální sekvenci) a uloženy ve formátu fasta.

Alignmenty těchto sekvencí byly vytvořeny metodou ClustalW (program Mega 4, Tamura et al., 2007), porovnány s referenčními sekvencemi a v případě potřeby byly manuálně opraveny neurčité báze.

Anotace mitochondriálního genomu *Diuraphis noxia* proběhla v programu MITOS, který po vložení fasta formátu mitochondriálního genomu vygeneroval tabulku s pořadím a velikostí genů, tRNA, rRNA a nekódujících oblastí. Bylo zde také možno získat data ve formátu „Gene order“, který byl potřebný pro analýzu translokací v programu CRex. Tento program využívá strukturu dat nazvanou „pq-tree“ (Booth et al., 1976) a heuristicky určuje přestavbové scénáře k transformování jednoho pořadí genů do jiného. Grafické znázornění genomu bylo vytvořeno programem mtviz, který stejně jako MITOS a CRex patří do volně přístupného programového souboru vytvořeného týmem na Department of Computer Science University of Leipzig (pacosy.informatik.uni-leipzig.de).

Protein kódující sekvence byly určeny na základě porovnání s jednotlivými geny u mšice *Schizaphis graminum* v programu Mega 4 (Tamura et al., 2007) a jejich správné určení bylo ověřeno v programu DOGMA (Wyman et al., 2004).

tRNA byly identifikovány pomocí programu tRNAscan-SE (Lowe et al., 1997) kam byl opět vložen formát fasta a z nabídky vybrány parametry pro mitochondriální genom. V tomto programu byly také vizualizovány „trojlístkové“ struktury tRNA. Schematické znázornění obecné trojlístkové struktury je na obrázku 2.



Obr. 2: Schematické znázornění obecné „trojlístkové“ struktury (převz. Lowe and Eddy, 1997)

Fylogenetická analýza genů (vytvoření dendrogramu) byla provedena v programu Mega 4 (Tamura et al., 2007), v němž také byly vypočteny hodnoty p-distance (procentuální vyjádření rozdílu) charakterizující nukleotidovou variabilitu jednotlivých genů. Pro tvorbu dendrogramů byl použit konkatenovaný soubor (sekvence genů v pořadí v jakém se vyskytují v mitogenomech bez nekódujících oblastí, tRNA), tRNA nebyly zahrnuty z důvodu vysoké variability (na úrovni nukleotidů, délky i pozice v genomu) a naopak byly přidány geny pro rRNA. Vzhledem k tomu, že u některých druhů došlo k přesunu genů, byly geny v konkatenovaném souboru seřazeny podle pořadí genů v mitogenu mšice.

Programem Mega 4 (Tamura et al., 2007) byl před tvorbou dendrogramů testován nejvhodnější model pro metodu Maximum likelihood, který byl vybrán na základě Akaike kritéria.

Grafická analýza rozložení nukleotidové variability (vyjádřené parametrem π vypočteném z párových srovnávání) po celé délce mitochondriální sekvence byla provedena metodou „klouzavého okénka“ (sliding window) v programu DNAsp (Librado et al., 2009), opět na konkatenovaném souboru PCG. Podstatou metody je vyhodnocení nukleotidové variability v kratších úsecích („okénku“), které jsou krokově propočítávány po celé délce sekvence, a výsledky jsou zaznamenány do grafu. Velikost „okénka“ i „kroku“ je empirická, neboť jde především o názornost grafu.

4. Výsledky

V této práci byl osekvenován celý mitochondriální genom mšice *Diuraphis noxia*. Veškeré následné analýzy byly prováděny zároveň s dalšími mitochondriálními genomy zástupců podřádu Sternorrhyncha. Celkem bylo vybráno 11 jedinců z čeledí mšicovití (Aphididae), korovnicovití (Adelgidae), merovití (Psyllidae), molícovití (Aleyrodidae) a čeledi Phylloxeridae. Provedeny byly jak analýzy celogenomové tak i analýzy pouze na kódujících sekvencích. Tyto testy měly pomoci vyjasnit vzájemné fylogenetické vztahy mezi jednotlivými čeleděmi.

4.1. Mitochondriální genom *Diuraphis noxia*

Pro osekvenování celého mitochondriálního genomu byla použita kombinace metod „primer walking“ a „long PCR“, která ovšem sama o sobě nevedla k předpokládanému výsledku. Kombinací výše uvedených primerů byly naamplifikovány úseky o velikosti 300bp-1000bp, které byly následně osekvenovány a programem SeqManII (programový balík DNASTAR ver. 4.0; DNASTAR, Inc.) z nich byl vytvořen celkový contig. V tabulce 6 jsou uvedeny podmínky amplifikace jednotlivých primerů, společně s úsekem, který amplifikovaly. Nejsou zde zmíněny tRNA, které byly amplifikovány společně s geny v případě, že byly zvoleny primery z úplných začátků či konců genů. PCR produkty byly sekvenovány ve směru 5'-3' i ve směru 3'-5', oba primery jsou uvedeny v případě, že obě získané sekvence byly použity pro tvorbu contigu. V případě, že sekvenační reakce nebyla v jednom z případů úspěšná je uveden pouze ten primer s nímž proběhla úspěšná sekvenační reakce.

Tab. 6: Podmínky amplifikace jednotlivých primerů společně s naamplifikovaným úsekem

| Naamplifikovaná oblast | Primery | Annealing | | Elongace | |
|------------------------|-----------|-----------|-----|----------|---------|
| | | teplota | čas | teplota | čas |
| COI | TY-J-1460 | 60°C | 45s | 68°C | 1min30s |

| | | | | | |
|-----------|---------------------------------------|------|------|------|---------|
| | LCO1490 HCO2198 | 47°C | 35s | 68°C | 1min30s |
| | C1-J-1859 TL2-N-3014 | 49°C | 45s | 68°C | 1min |
| COII | C1-J-2756 C2-N-3665 | 49°C | 45s | 68°C | 1min |
| | TL2-J--3033 C2-N-3665 | 53°C | 45s | 68°C | 1min |
| | AdelCOIIIf1(3023) AdelCOIIr1(3615) | 57°C | 45s | 68°C | 1min30s |
| | NoxCO2F(3590) | 55°C | 45s | 68°C | 1min |
| | NoxCO2R(4115) | | | | |
| ATP/COIII | TK-J-3790 C3-N-5460 | 51°C | 1min | 68°C | 2min |
| | AphidCO2f(3600) AphidCO3rev(5400) | 49°C | 30s | 68°C | 1min30s |
| COIII | DnCO3f(4870) | 53°C | 45s | 68°C | 1min30s |
| | C3-N-5460 | | | | |
| COIII/ND3 | DnoxC3F(5240) | 59°C | 45s | 68°C | 1min |
| | DnoxND3R(5613) | | | | |
| ND3/ND5 | N3-J-5747 | 47°C | 45s | 68°C | 3min |
| | N5-N-7793 | | | | |
| Repeats | DnoxRepF1(5950) DnoxRepF1rev(6922) | 53°C | 1min | 60°C | 2min |
| | RepforE(6272) ReprevF(6930) | 55°C | 1min | 60°C | 2min |

| | | | | | |
|-----------|--|------|------|------|---------|
| ND5 | DnoxND5F(6700) N5-N-7793 | 55°C | 45s | 68°C | 1min |
| | AdelND5for1(7706) | 51°C | 45s | 68°C | 1min |
| | N5-J-6579 AdelND5rev1(7461) | 47°C | 45s | 68°C | 1min |
| ND4/ND5 | Noxnd5z4f(8300) | 57°C | 45s | 60°C | 1min15s |
| | Noxnd5z5r(7498) | | | | |
| | Noxnd4end(8126) | 41°C | 45s | 60°C | 1min15s |
| | Noxnd5str(7650) | | | | |
| ND4L/CytB | N4-J-8944 | 55°C | 1min | 68°C | 2min |
| | CB-N-10920 | | | | |
| ND4/ND4L | NoxND4F(8614) | 57°C | 45s | 60°C | 1min |
| | NoxND4R(7500) | | | | |
| ND6 | NoxND6F(9320) | 51°C | 45s | 60°C | 1min |
| | NoxND6R(10213) | | | | |
| CytB | CB-J-10933 | 59°C | 45s | 68°C | 1min30s |
| | AdelCytBf1(10908) AdelcytBr1(11340) | 50°C | 45s | 68°C | 45s |
| | AdelCytBfor2(11261) | 51°C | 45s | 68°C | 45s |
| CytB/ND1 | CB-J-11335 | 45°C | 30s | 68°C | 1min30s |
| | N1-N-12595 | | | | |
| ND1 | 11841-for | 43°C | 35s | 60°C | 1min |
| | Nox16Srev | | | | |
| ND1/16S | N1-J-12585b | 51°C | 45s | 68°C | 1min |
| 16S/12S | LR-J-13342 | 53°C | 45s | 60°C | 1min |
| | SR-N-14745b | | | | |
| 12S | Dn12SF(14400) | 41°C | 45s | 68°C | 1min |
| | SR-N-14922 | | | | |

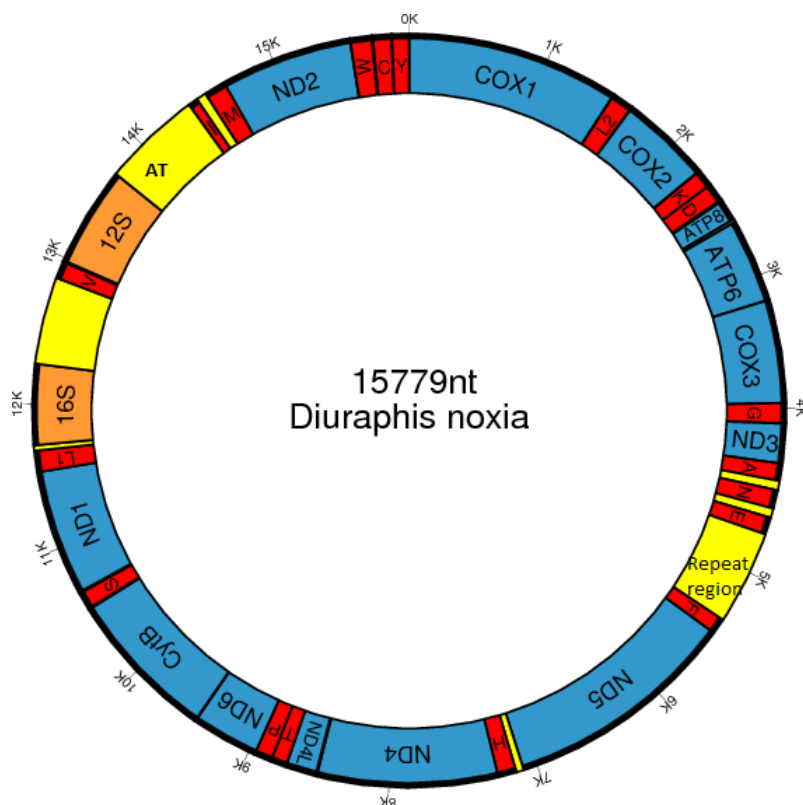
| | | | | | |
|-----|---------------------------------------|------|---------|------|---------|
| AT | SR-J-14612 TIN24 | 47°C | 45s | 68° | 1min30s |
| | Adel12Sfor2(14631) AdelATrev1(210) | 51°C | 1min30s | 68°C | 2min30s |
| ND2 | TM-J-210b | 51°C | 45s | 68°C | 2min |
| | AphidND2-J80 AphidND2-N743 | 57°C | 45s | 68°C | 1min |
| | NoxATND2F(105) NoxND2R | 49°C | 45s | 68°C | 1min |
| | NoxND2F2(735) NoxND2R2(1530) | 55°C | 45s | 68°C | 1min |

4.1.1. Charakteristika mitochondriálního genomu *Diuraphis noxia*

Celková velikost mt genomu je 15779 bp. Celkem bylo identifikováno 13 genů, 2 nekódující oblasti, 2 rRNA a 19 tRNA. Následnou analýzou v programu MitoS (<http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de>) byly identifikovány další 3tRNA (Arg, Ser2, Gln), tyto domnělé tRNA však nebyly identifikovány na základě porovnání jejich sekvencí s tRNA u ostatních zástupců čeledi mšicovití, především pak se mšicí *Schizaphis graminum*, která má mitochondriální genom nejpodobnější nově osekvenovanému genomu *Diuraphis noxia* a nebyly dále brány v úvahu.

Grafické ztvárnění mitochondriálního genomu bylo vytvořeno programem mtviz (pacosy.informatik.uni-leipzig.de) a je na obrázku 3.

Celkový obsah nukleotidů A/T v celém genomu je 84,7% (T 38,9%; A 45,8%; C 9,6%; G 5,7%).



Obr. 3: Model mitochondriálního genomu *Diuraphis noxia* (geny označeny modře, tRNA červeně, rRNA oranžově a nekódující oblasti žlutě)

4.1.2. Geny kódující protein (PCG)

Na hlavním řetězci (J-strand) se vyskytuje 9 genů, ostatní geny se vyskytují na vedlejším (N-strand) řetězci. Jejich pozice, velikost a procentuální zastoupení jednotlivých nukleotidů je uvedeno v tabulce 7. Obsah nukleotidů A/T v kódujících genech je 85,1%. V tabulce 11, kapitole 4.2. vidíme, že procentuální zastoupení A/T nukleotidů je velmi podobné u všech druhů.

Tab. 7: Velikost, délka, pozice a zastoupení nukleotidů u jednotlivých genů

| Gen | začátek | konec | velikost (bp) | kodony | | J / N | zastoupení nukleotidů (%) | | | |
|------|---------|-------|------------------|-----------|------------|-------------|---------------------------|------|------|------|
| | | | | iniciační | terminační | | A | T | C | G |
| COI | 1 | 1529 | 1529 | ATA | TAA | J | 35,6 | 41,5 | 12,6 | 10,3 |
| COII | 1600 | 2271 | 671 | ATA | TAA | J | 41,1 | 40,2 | 11,3 | 7,4 |

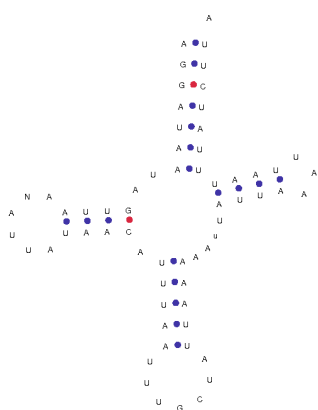
| | | | | | | | | | | |
|-------|-------|-------|------|-----|-----|---|------|------|------|------|
| ATP8 | 2399 | 2566 | 167 | ATA | TAA | J | 45,8 | 44,6 | 8,3 | 1,2 |
| ATP6 | 2547 | 3200 | 653 | ATT | TAA | J | 38,5 | 44,8 | 11,6 | 5,0 |
| COIII | 3200 | 3985 | 785 | ATG | TAA | J | 39,7 | 44,0 | 10,2 | 6,1 |
| ND3 | 4046 | 4402 | 356 | ATA | TAA | J | 39,5 | 47,9 | 8,4 | 4,2 |
| ND5 | 5429 | 7099 | 1670 | ATA | TAA | N | 30,9 | 55,4 | 5,0 | 8,7 |
| ND4 | 7215 | 8523 | 1308 | ATA | 0 | N | 29,6 | 56,2 | 4,7 | 9,5 |
| ND4L | 8532 | 8822 | 290 | ATA | TAA | N | 33,0 | 56,4 | 2,7 | 7,9 |
| ND6 | 8955 | 9446 | 491 | ATT | TAA | J | 43,5 | 46,1 | 6,3 | 4,1 |
| CytB | 9450 | 10565 | 1115 | ATG | TAA | J | 36,6 | 44,3 | 10,8 | 8,3 |
| ND1 | 10647 | 11582 | 935 | ATT | TAA | N | 31,1 | 53,1 | 5,6 | 10,3 |
| ND2 | 14611 | 15588 | 977 | ATT | TAA | J | 41,7 | 46,7 | 7,9 | 3,7 |

0 Stop kodon nebyl detekován je patrně vytvořen až posttranslační polyadenilací

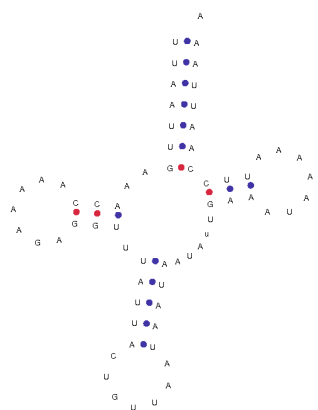
4.1.3 tRNA

Celkem bylo identifikováno 19 tRNA, jejichž „trojlístková“ struktura je znázorněno na obrázku 4. Antikodony jsou orientovány směrem dolů jak je patrné z ilustračního obrázku 2.

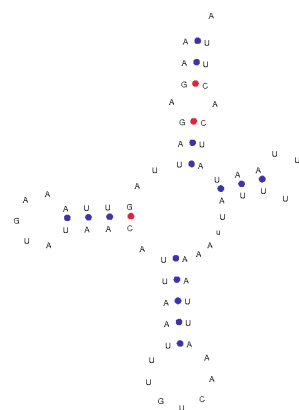
Velikost, poloha na řetězci, nukleotidové složení a antikodony jednotlivých tRNA jsou uvedeny v tabulce 8. Celkem je v tRNA obsah nukleotidů A/T 85,7%.



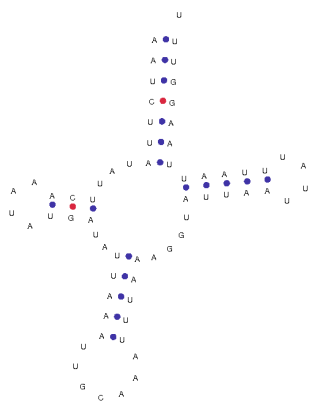
Ala



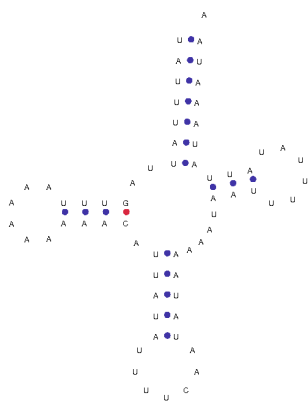
Asn



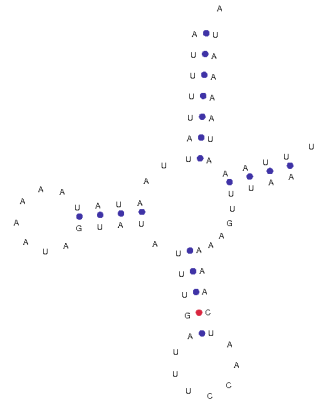
Asp



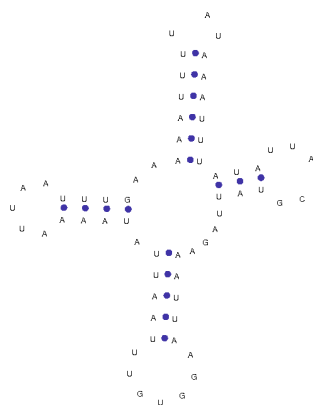
Cys



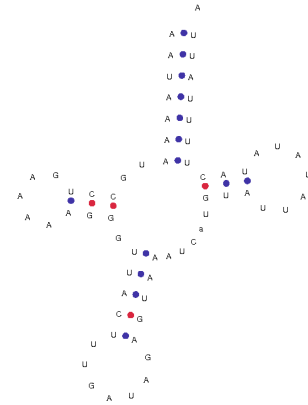
Glu



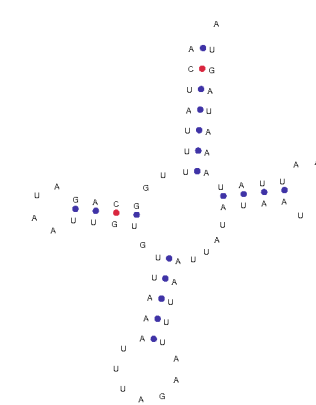
Gly



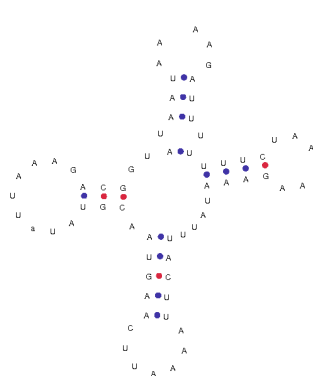
His



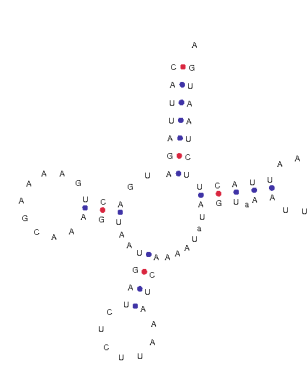
Ile



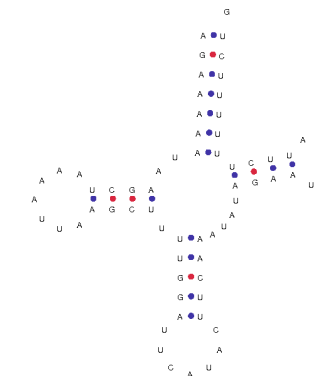
Leu



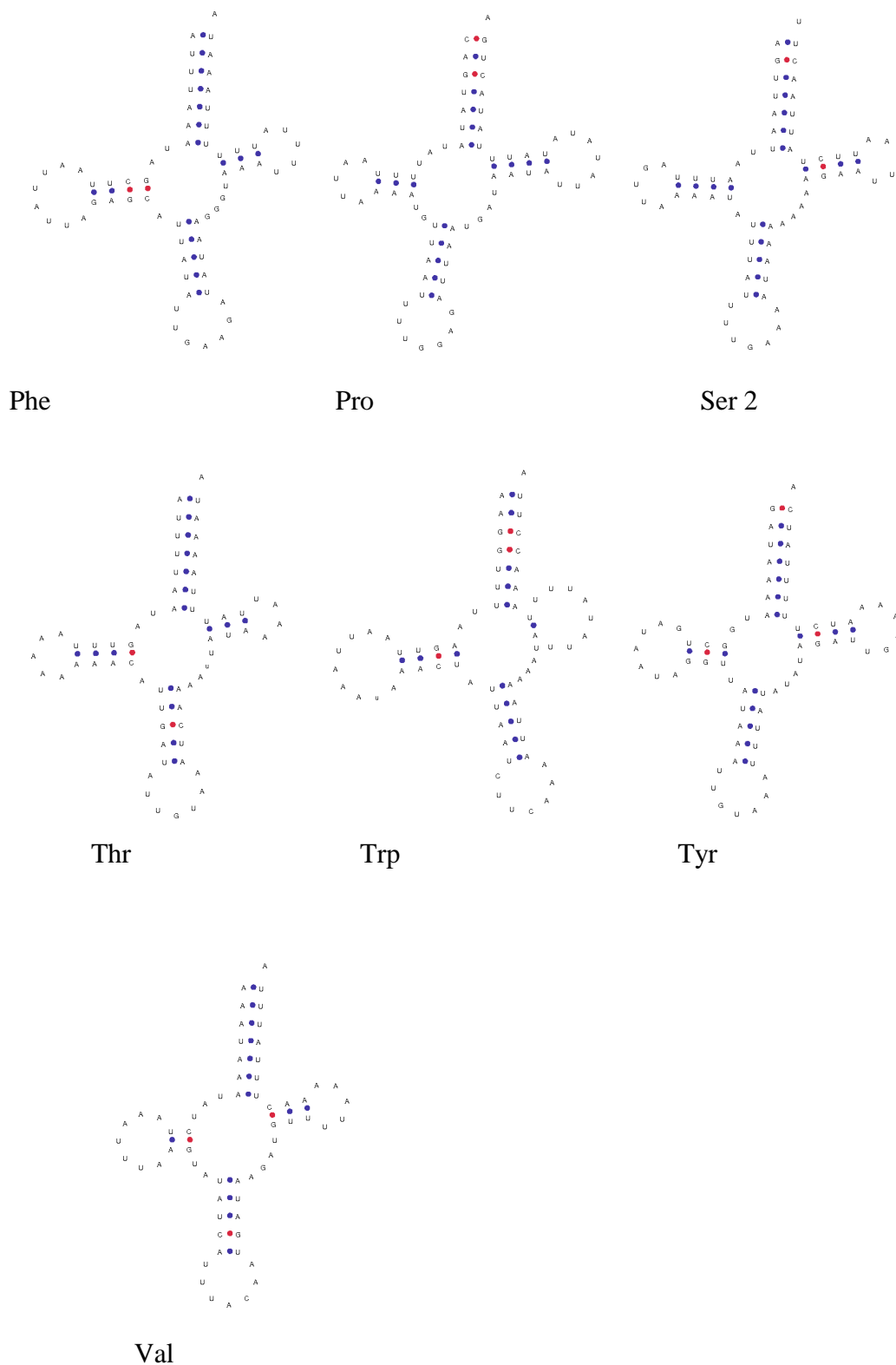
Leu 2



Lys



Met



Obr. 4: „Trojlístková“ struktura tRNA vytvořená v programu tRNAscan-SE (Lowe et al., 1997)

Tab. 8: Velikost, délka, pozice, antikodony a zastoupení nukleotidů u tRNA

| tRNA | začátek | konec | velikost (bp) | řetězec | antikodon | zastoupení nukleotidů (%) | | | |
|------|---------|-------|------------------|---------|-----------|---------------------------|------|------|------|
| | | | | | | A | T | C | G |
| L2 | 1529 | 1596 | 67 | J | TAA | 45,6 | 36,8 | 7,4 | 10,3 |
| K | 2274 | 2346 | 72 | J | CTT | 45,2 | 30,1 | 12,3 | 12,3 |
| D | 2347 | 2408 | 61 | J | GTC | 45,2 | 40,3 | 6,5 | 8,1 |
| G | 3985 | 4048 | 63 | J | TCC | 48,4 | 42,2 | 4,7 | 4,7 |
| A | 4403 | 4466 | 63 | J | TGC | 44,4 | 44,4 | 4,8 | 6,3 |
| N | 4530 | 4595 | 65 | J | GTT | 50,0 | 33,3 | 7,6 | 9,1 |
| E | 4660 | 4724 | 64 | J | TTC | 50,8 | 44,6 | 3,1 | 1,5 |
| F | 5363 | 5428 | 65 | N | GAA | 40,9 | 43,9 | 3,0 | 12,1 |
| H | 7151 | 7214 | 63 | N | GTG | 43,8 | 43,8 | 1,6 | 10,9 |
| T | 8824 | 8885 | 61 | J | TGT | 53,2 | 38,7 | 3,2 | 4,8 |
| P | 8887 | 8953 | 66 | N | TGG | 40,3 | 46,3 | 3,0 | 10,4 |
| S | 10573 | 10637 | 64 | J | TGA | 47,7 | 43,1 | 3,1 | 6,2 |
| L1 | 11583 | 11647 | 64 | N | TAG | 40,0 | 46,2 | 3,1 | 10,8 |
| V | 12906 | 12968 | 62 | N | TAC | 46,0 | 41,3 | 6,3 | 6,3 |
| I | 14412 | 14475 | 63 | J | GAT | 40,6 | 37,5 | 7,8 | 14,1 |
| M | 14544 | 14610 | 66 | J | CAT | 41,8 | 37,3 | 10,4 | 10,4 |
| W | 15587 | 15652 | 65 | J | TCA | 47,0 | 40,9 | 7,6 | 4,5 |
| C | 15645 | 15709 | 64 | N | GCA | 41,5 | 44,6 | 4,6 | 9,2 |
| Y | 15713 | 15778 | 65 | N | GTA | 42,4 | 39,4 | 4,5 | 13,6 |

4.1.4. rRNA a nekódující oblasti (AT – control region, Repeats region)

Sekvence pro rRNA i nekódující oblasti byly určeny v programu MITOS (pacosy.informatik.uni-leipzig.de). Pro kontrolu byly následně porovnány se sekvencemi referenčních druhů. Jejich velikost, pozice a zastoupení nukleotidů je uvedeno v tabulkách 9 a 10. U nekódujících oblastí není uvedena poloha na J/N řetězci neboť není objasněna. Obsah nukleotidů A/T je v rRNA 81,6% a v nekódujících oblastech 88,5%.

Tab. 9: Velikost, pozice a zastoupení nukleotidů u rRNA

| rRNA | začátek | konec | velikost (bp) | řetězec | Zastoupení nukleotidů (%) | | | |
|------------|---------|-------|------------------|---------|---------------------------|------|------|-----|
| | | | | | A | T | C | G |
| rrnL (16S) | 11685 | 12315 | 631 | N | 41,5 | 36,9 | 13,8 | 7,8 |
| rrnS (12S) | 12979 | 13738 | 760 | N | 43,8 | 40,5 | 9,9 | 5,8 |

Tab. 10: Velikost a zastoupení nukleotidů u nekódujících oblastí

| nekódující oblasti | začátek | konec | velikost (bp) | Zastoupení nukleotidů (%) | | | |
|-----------------------|---------|-------|------------------|---------------------------|------|-----|-----|
| | | | | A | T | C | G |
| AT | 13739 | 14411 | 672 | 44,0 | 42,6 | 8,5 | 4,9 |
| repeats | 4725 | 5362 | 637 | 54,1 | 36,4 | 8,0 | 1,6 |

V nekódující sekvenci označované jako „repeats“ se vyskytuje celkem 6 krátkých tandemových repetit dlouhých 11 bazí. Dále se zde vyskytuje úsek dlouhý 69 bazí, který je téměř totožný s částí „repeats“ oblasti *Schizaphis graminum*. Zbýlá část repeats oblasti *Diuraphis noxia* je tvořena především dlouhými řetízky jednotlivých nukleotidů A či T.

Druhá nekódující oblasti („AT region“) je charakterizována především úseky, kde dochází k pravidelnému střídání nukleotidů A/T. Jako celek však AT oblast již nevykazuje příliš velkou homologii při porovnání s AT oblastí ostatních zástupců čeledi Aphididae.

Sekvence obou nekódujících oblastí jsou uvedeny v příloze 2.

4.2. Mezidruhové srovnání mitochondriálních genomů vybraných zástupců podřádu Sternorrhyncha

Komparativní analýza zahrnuje jednak 10 úplných mitogenomů a dále fragmentované mitogenomy *D. vitifoliae* (Phylloxeridae) a *D. prelli* (Adelgidae).

4.2.1. Srovnání velikosti mitogenomů a jejich nukleotidového složení

Přehled srovnávaných parametrů uvádí tabulka 11. Z ní je patrné, že velikost mitogenomů zástupců Sternorrhyncha se pohybuje v rozmezí zhruba od 15kbp (nejmenší mitogenom má *P. venusta*) do 18,5 kbp (největší mitogenom byl nalezen u *T. vaporariorum*). *D. noxia* se délkou mitogenomu přibližuje více *S. graminum*, neboť *A. pisum* je téměř o 1kbp delší.

Tab. 11: Velikosti mitochondriálních genomů analyzovaných jedinců a zastoupení AT nukleotidů

| Zástupce | Velikost genomu bp | Zastoupení nukleotidů (%) |
|----------------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| <i>Diuraphis noxia</i> | 15799 bp | 84,7% |
| <i>Dreyfusia prelli</i> | zatím osekvenováno 7258 bp | 82,4% |
| <i>Schizaphis graminum</i> | 15721 bp | 85,4% |
| <i>Acyrtosiphon pisum</i> | 16971 bp | 85,4% |
| <i>Dactuloshaira vitifoliae</i> | zatím osekvenováno 12349 bp | 84,9% |
| <i>Pachypsylla venusta</i> | 14711 bp | 75% |
| <i>Bemisia tabaci</i> | 15322 bp | 75,6% |
| <i>Tetraleurodes acaciae</i> | 15080 bp | 72% |
| <i>Aleurochiton aceris</i> | 15388 bp | 77,9% |
| <i>Aleurodicus dugessi</i> | 15723 bp | 86,3% |
| <i>Neomaskellia andropogonis</i> | 14496 pb | 81,3% |
| <i>Trialeurodes vaporariorum</i> | 18414 bp | 72,3% |

Obsah nukleotidů A/T je u téměř všech jedinců vyrovnaný a pohybuje se kolem 80%. Výrazně vyšší obsah nukleotidů nemá ani jeden ze zástupců čeledi mšicovití (Aphididae) ačkoliv je známo, že mšice mají kromě nekódující oblasti AT-control region ještě další nekódující oblast mezi geny ND3 a ND5 a obě tyto oblasti jsou velmi bohaté na nukleotidy A a T.

V tabulce 12 jsou uvedeny velikosti a polohy nekódujících oblastí společně s obsahem nukleotidů. Ačkoliv jsou u čeledi mšicovití 2 nekódující úseky pro lepší orientaci nazvány oblast AT a „repeats“ (nebo častěji „repeats region“), v GenBanku se obě oblasti vyskytují pod stejným názvem „repeats region“, a proto je i zde v tabulce toto označení zachováno. Dále byly do tabulky zaznamenány i velké nekódující oblasti těch druhů, kde tato oblast nebyla označena jako „repeats region“ z důvodu absence palindromické sekvence či bloky opakujících se nukleotidů A/T, ale vyskytovala se přibližně ve stejné poloze na genomu jako u ostatních druhů.

Tab. 12: Nekódující oblasti, jejich délka a obsah nukleotidů

| Jedinec | nekódující oblasti | začátek | konec | velikost (bp) | Zastoupení nukleotidů (%) | | | |
|---------------------------------|--------------------|---------|-------|---------------|---------------------------|------|------|------|
| | | | | | A | T | C | G |
| <i>Diuraphis noxia</i> | AT | 13739 | 14411 | 672 | 44,0 | 42,6 | 8,5 | 4,9 |
| | repeats | 4725 | 5362 | 637 | 54,1 | 36,4 | 8,0 | 1,6 |
| <i>Dreyfusia prelli</i> | AT | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | repeats | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>Schizaphis graminum</i> | nekód. obl. | 13734 | 14355 | 621 | 40,2 | 46,6 | 7,9 | 5,3 |
| | repeats | 4757 | 5364 | 607 | 49,0 | 32,2 | 12,0 | 3,8 |
| <i>Acyrtosiphon pisum</i> | repeats (AT) | 14729 | 15189 | 460 | 49,9 | 43,4 | 5,2 | 1,5 |
| | repeats | 4700 | 6212 | 1512 | 56,8 | 32,4 | 8,5 | 2,3 |
| <i>Dactuloshaira vitifoliae</i> | repeats (AT) | 6800x | 7175x | 375 | 39,9 | 45,5 | 7,2 | 7,4 |
| <i>Pachypsylla venusta</i> | nekód. obl. | 12745 | 13341 | 596 | 42,6 | 41,4 | 9,0 | 7,0 |
| <i>Bemisia tabaci</i> | nekód. obl. | 13614 | 13983 | 369 | 46,4 | 31,9 | 6,4 | 15,3 |
| <i>Tetraleurodes acaciae</i> | nekód. obl. | 12982 | 13714 | 732 | 30,2 | 39,6 | 15,4 | 14,9 |
| <i>Aleurochiton aceris</i> | repeats (AT) | 13687 | 14122 | 435 | 36,5 | 44,0 | 9,9 | 9,6 |
| <i>Aleurodicus dugessi</i> | repeats (AT) | 12892 | 14266 | 1374 | 58,0 | 34,3 | 3,0 | 4,8 |

| | | | | | | | | |
|----------------------------------|--------------|-------|-------|------|------|------|-----|------|
| <i>Neomaskellia andropogonis</i> | repeats (AT) | 11845 | 12016 | 171 | 48,8 | 39,0 | 3,5 | 8,7 |
| <i>Trialeurodes vaporariorum</i> | repeats (AT) | 13015 | 16739 | 3724 | 43,7 | 37,7 | 8,3 | 10,4 |

0 – zatím není osekvenováno

X – sekvence mitochondriálního genomu *Dactulosphaira vitifoliae* v GenBanku začíná tRNA histidin nikoliv genem pro COI jako u všech ostatních jedinců. Nehledě na číselné označení bází je však repeats oblast svým výskytem mezi 12S rRNA a tRNA Ile lokalizována totžně jako AT oblasti u ostatních jedinců.

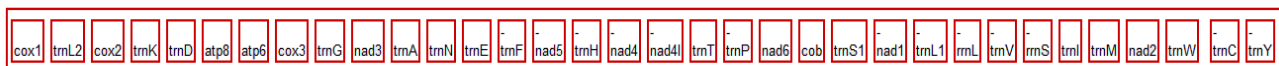
Ze zástupců čeledi Aphididae má nejdelší nekódující oblasti mšice *Acyrtosiphon pisum*. Naopak délka nekódujících oblastí mšic *Diuraphis noxia* a *Schizaphis graminum* jsou téměř totožné. Ze všech testovaných druhů má vůbec nejdelší nekódující oblast zástupce čeledi Aleyrodidae, *Trialeurodes vaporariorum*, délka jeho nekódující oblasti je téměř 4 kb.

4.2.2. Srovnání na základě změněného pořadí genů

V programu CReX (pacosy.informatik.uni-leipzig.de) byly porovnány jednotlivé mitochondriální genomy mezi sebou (nekódující oblasti nebyly brány v úvahu) a následně byly graficky znázorněny přesuny tRNA a dokonce i genů mezi jednotlivými mitochondriálními genomy analyzovaných jedinců. Pro tuto analýzu byly vyřazeny neúplné genomy phylloxery *Dactulosphaira vitifoliae* a korovnice *Dreyfusia prelli* neboť ty nebylo možné porovnat. Na obrázku 5 je schematický náčrt pořadí genů, tRNA a rRNA u čeledi Aphididae mezi jejímiž zástupci analyzovanými v této práci nebyly žádné přesuny nalezeny.

Vzhledem k tomu, že některé aminokyseliny nebyly v jednotlivých genomech detekovány, jsou rozdíly ve výskytu tRNA zaznamenány v tabulce 13 Tyto tRNA se pak v jednotlivých případech nevyskytují ani v grafickém porovnání analyzovaných mitogenomů.

V tabulce 14 jsou pak zaznamenány jednotlivé přesuny genů a tRNA v mitogomech testovaných druhů. Grafické znázornění přesunu a jejich možné původy jsou uvedeny v příloze 3 obrázcích 6-12.



Obř. 5: Schematický nářkes pořadí genů tRNA a rRNA u řeledi Aphididae

Tab. 13: Změny ve výskytu tRNA u jednotlivých zástupců

| tRNA | Výskyt ři změna |
|---------------|--|
| Serin (S) | u <i>Diuraphis noxia</i> , <i>Acyrtosiphon pisum</i> , <i>Tetraleurodes acacieae</i> a <i>Aleurodicus dugesii</i> se vyskytuje pouze v 1 kopii |
| Tyrosin (Y) | u <i>Pachypsylla venusta</i> leží na N řetězci |
| Valin (V) | u <i>Neomaskellia andropogonis</i> leží na J řetězci |
| Methionin (M) | u <i>Acyrtosiphon pisum</i> se vyskytuje ve 2 kopiích |
| Isoleucin (I) | nevyskytuje se u <i>Tetraleurodes acacieae</i> , <i>Neomaskellia andropogonis</i> , <i>Aleurochiton aceris</i> |
| Asparagin (N) | nevyskytuje se <i>Tetraleurodes acacieae</i> , <i>Neomaskellia andropogonis</i> |
| Alanin (A) | nevyskytuje se u <i>Neomaskellia andropogonis</i> |
| Glutamin (Q) | nevyskytuje se u, <i>Aleurodicus dugesii</i> , |
| Arginin (R) | nevyskytuje se u <i>Diuraphis noxia</i> , <i>Neomaskellia andropogonis</i> |

Tab. 14: Jednotlivé detekované řesuny genů a tRNA u testovaných druhů

| Porovnávané druhy | Detekované změny u druhů porovnávaných s řeledí Aphididae |
|--|---|
| řeled' Aphididae ⁰ x <i>Trialeurodes vaporariorum</i> | tRNA G (glycin) se vyskytuje až za tRNA W (tryptofan) |
| | tRNA S (serin) se vyskytuje již řřed tRNA E (kys.glutamová) |
| | tRNA C (cystein) se vyskytuje až za tRNA Y (tyrosin) |
| řeled' Aphididae ⁰ x <i>Tetraleurodes acacieae</i> | po genech pro ATP následuje rovnou tRNA E (kys.glutamová) vyskytuje se na N řetězci, |
| | tRNA A (alanin) je až za geny pro obě podjednotky rRNA |
| | blok genů a tRNA: ND3, tRNA G (glycin), COIII, tRNA D (kys. aspargová) se vyskytuje na N řetězci ¹ . Tento blok se vyskytuje mezi 12S rRNA a tRNA A (alanin) |
| řeled' Aphididae ⁰ x <i>Aleurodicus dugesii</i> | tRNA C (cystein) se nachází za tRNA Y |

| | |
|---|---|
| | (tyrosin) |
| čeleď Aphididae ⁰ x <i>Aleurochiton aceris</i> | po genech pro ATP následuje tRNA S (serin) na N řetězci |
| | blok genů a tRNA: tRNA A (alanin), ND3, tRNA G (glycin), COIII, tRNA N (asparagin) se nacházejí na N řetězci ¹ v poloze mezi genem pro CytB a genem ND1 |
| | tRNA C (cystein) se nachází za tRNA Y (tyrosin) |
| čeleď Aphididae ⁰ x <i>Bemisia tabaci</i> | pro genech pro ATP následuje tRNA S (serin), na N řetězci |
| | tRNA E (kys. glutamová) se vyskytuje také na N řetězci, v pozici ihned za tRNA S (serin) |
| | tRNA D (kys. aspargová) je na N řetězci, vyskytuje se mezi tRNA V (valin) a 12S rRNA |
| | mezi 12S rRNA a tRNA I (isoleucin) se nachází blok genů a tRNA: tRNA N (asparagin), tRNA A (alanin), ND3, tRNA G (glycin), COIII. Tento blok je na N řetězci ¹ |
| | tRNA C (cystein) se nachází za tRNA Y (tyrosin) |
| čeleď Aphididae ⁰ x <i>Neomaskellia andropogonis</i> | pro genech pro ATP následuje tRNA S (serin), na N řetězci |
| | tRNA K (lysin) je mezi geny CytB a ND1 |
| | tRNA P (prolin) je až za 16s rRNA |
| | blok ND3, tRNA G (glycin), COIII se nachází na N řetězci ¹ až za tRNA P (prolin) |
| | 12S rRNA a tRNA V (valin) se vyskytují až za tRNA C (cystein) a tRNA Y (tyrosin) |
| čeleď Aphididae ⁰ x <i>Pachypsylla venusta</i> | tRNA S (serin) je již před tRNA E (kys. glutamová) |

0 jednotlivé druhy čeledi Aphididae se neliší a proto je zde uváděna celá čeleď

Z tabulky lze vyčíst, že největší variabilita v uspořádání mitogenomů je mezi čeledí Aphididae a většinou druhů čeledi Aleyrodidae naopak čeleď Psyllidae, zastoupená druhem *Pachypsylla venusta* se svým mitogenomem liší od čeledi Aphididae nejméně. Dále je patrné, že nejčastější záměna pozic probíhá mezi tRNA C (cystein) a Y (tyrosin). Druhou nejčastější záměnou je přesunutí tRNA S (serinu) z oblasti mezi geny pro CytB a ND1 do oblasti před tRNA E (kys. glutamovou), která se nachází za genem ND3. Přesuny genů nejsou příliš časté, ve všech zaznamenaných případech šlo o přesun 2 genů (ND3 a COIII) v kombinaci s 1-3 tRNA, tento blok byl

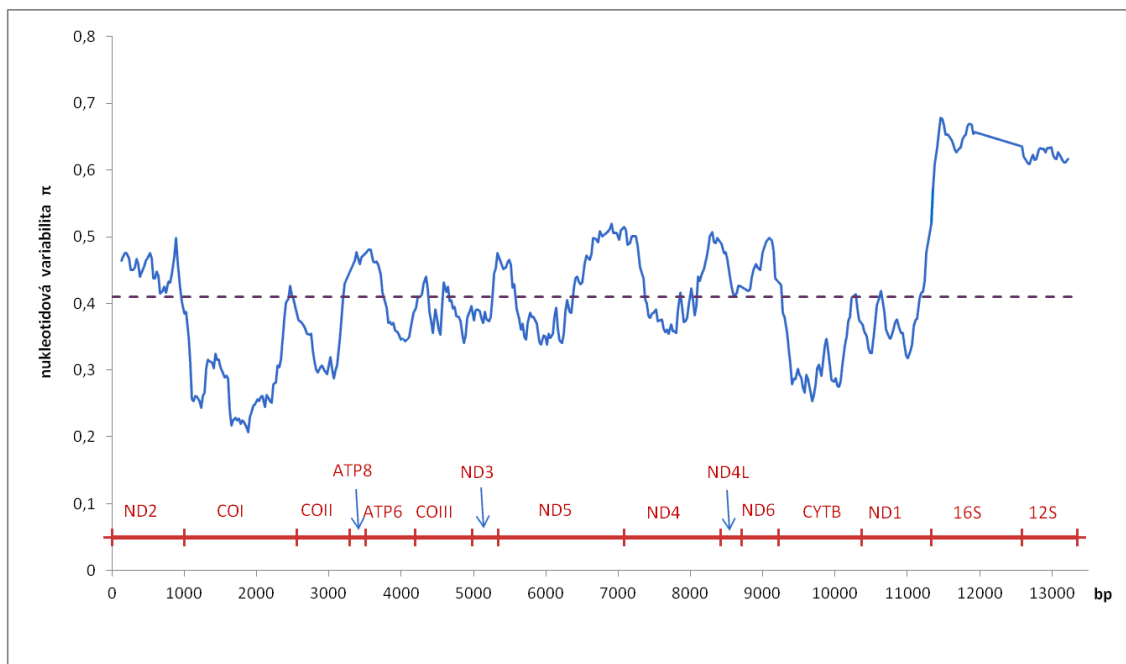
přesunut z řetězce J na řetězec N, jeho poloha na v genomu je variabilní mezi geny CytB a 12S rRNA

4.2.3 Analýza nukleotidové variability pro výběr možného populačně-genetického markeru

V programu Mega 4 (Tamura et al., 2007) byly nejprve pro každý gen vypočteny hodnoty p-distance k určení variability jednotlivých genů. Matice pro každý gen jsou v příloze 4, zde jsou v tabulce 15 uvedeny průměrné hodnoty p-distance pro každý gen. Grafická analýza rozložení variability v celém mitochondriálním genomu byla provedena metodou „klouzavého okénka“ (sliding window) v programu DNAsp (Librado et al., 2009) a je na obrázku 13.

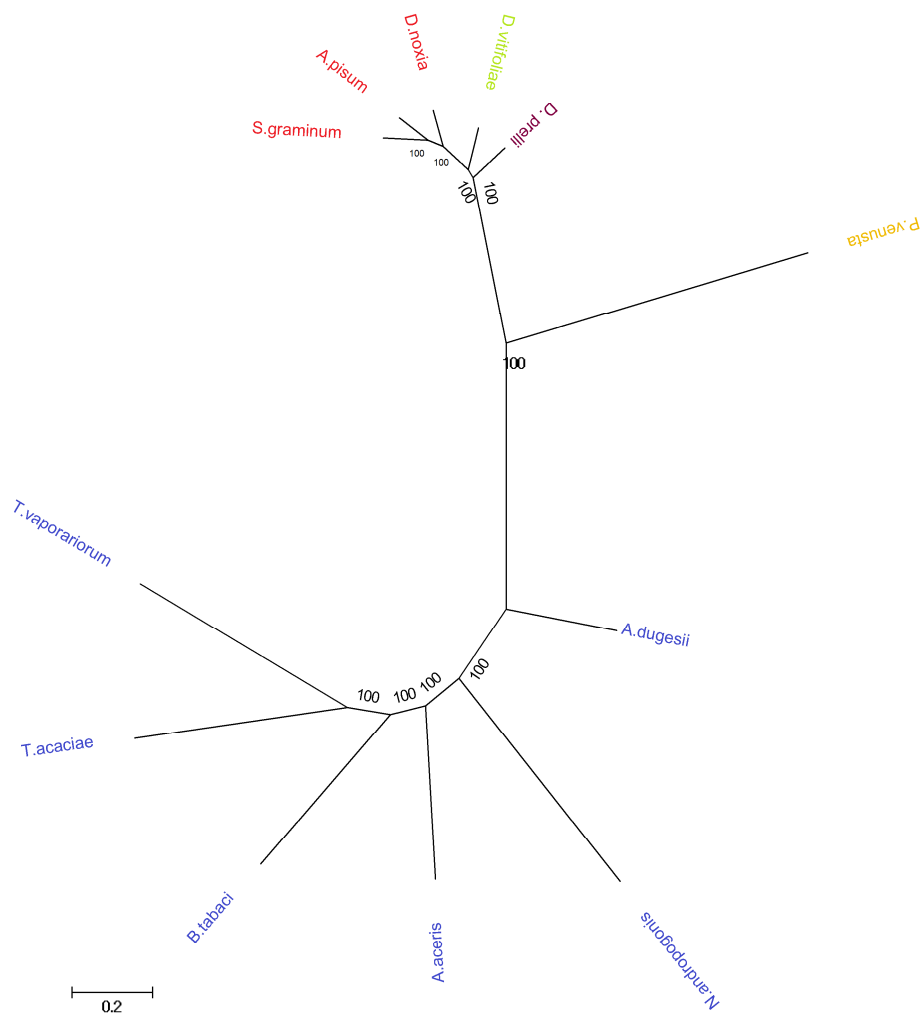
Tab. 15: Průměrné hodnoty p-distance

| Gen | Průměrná hodnota p-distance |
|----------|-----------------------------|
| ATP6 | 0,380 |
| ATP8 | 0,522 |
| COI | 0,271 |
| COII | 0,314 |
| COIII | 0,369 |
| CytB | 0,311 |
| ND1 | 0,350 |
| ND2 | 0,422 |
| ND3 | 0,381 |
| ND4 | 0,415 |
| ND4L | 0,422 |
| ND5 | 0,414 |
| ND6 | 0,448 |
| 16S rRNA | 0,652 |
| 12S rRNA | 0,617 |



Obr. 13: Analýza divergence 10ti mt genomů metodou „klouzavého okénka“ (sliding window). Krok = 25b, okénko = 200b. Červená linka znázorňuje pořadí PCG v konkatenovaném souboru (odpovídá skutečnému pořadí genů na mitochondrii), modrá úroveň variability. Přerušovaná čára znázorňuje průměrnou hodnotu π .

Na základě průměrných hodnot p-distance je nejvariabilnějším úsekem mitochondriálního genomu oblast 12S, 16S rRNA a ATP8. Tato skutečnost byla potvrzena i analýzou rozložení variability (Obr.13). Na tomto diagramu je patrné, že variabilita se liší nejen mezi jednotlivými geny, ale může dosahovat různé hodnoty i v rámci jednotlivých genů. Např. v rámci genu COI je vidět „peak“ vyšší variability v první polovině sekvence (tedy konec 5'), zatímco druhá polovina (konec 3') má naopak variabilitu výrazně nižší. Obdobnou situaci, kdy se střídají úseky o rozdílné variabilitě, lze pozorovat i u dalších genů ATP8, ND5 a ND4 a jako marker by tak mohly sloužit jen některé jejich části.



Obr. 15: Dendrogram z kódujících oblastí a rRNA (Minimum Evolution, GTR+G+I, Bootstrap 1000x; červeně je označena čeleď Aphididae, modře čeleď Aleyrodidae, fialově čeleď Adelgidae, žlutě Psyllidae a zeleně Phylloxeridae)

Topologie dendrogramů shoduje a jasně z nich vyplývá rozdělení na jednotlivé čeledi, tedy mšicovití (Aphididae), korovnicovití (Adelgidae), merovití (Psyllidae), molicovití (Aleyrodidae) a Phylloxeridae. Čeledi Aphididae, Adelgidae a Phylloxeridae přitom tvoří jeden velký klast. Druhým je skupina Aleyrodidae. Čeleď Psyllidae,

zastoupena pouze jedním vzorkem (*Pachypsylla venusta*) je sesterskou skupinou ke klastru čeledí Aphididae a Adelgidae. *D. prelli* z čeledi Adelgidae je nejvíce příbuzná s phylloxerou *D. vitifoliae*. *D. noxia* vytvořila v rámci klastru Aphididae jednu skupinu s *A. pisum*.

5. Diskuze

Jak již bylo zmíněno v úvodu, je mitogenom hmyzu velmi bohatý na nukleotidy A a T (Zhang et al., 1997). Tato skutečnost ovlivňovala veškeré pracovní postupy od izolace DNA přes optimalizaci PCR reakcí až po optimalizaci sekvenační reakce. Obzvláště během PCR reakcí a sekvenování bylo potřeba počítat s náhodným výskytem řetízků nukleotidů A či T a výskytem tandemových repetitiv těchto nukleotidů a to nejenom v nekódujících oblastech, ale i v PCG.

5.1. Izolace DNA

V průběhu práce byly vyzkoušeny celkem 4 metody izolace DNA, kromě izolace pomocí kitů ještě izolace čisté mitochondriální DNA. Při použití DNA vyizolované pomocí různých kitů brzy po provedené izolaci nebyl při amplifikaci stejného úseku zaznamenán významný rozdíl v úspěšnosti amplifikace. V případě pozdějších amplifikací docházelo k postupné degradaci vyizolované DNA. Nejstabilnější vzorky byly získány při izolaci pomocí kitu DNeasy blood and tissue (QIAGEN).

Při izolaci DNA pomocí komerčních kitů je však kromě mitochondriální DNA vyizolována i DNA nukleární. Byla proto též provedena izolace čisté mitochondriální DNA. Na základě studia literatury (Arctander, 1995; Zhang et al., 1997) byla tato metoda použita z důvodu ověření amplifikace pravých mitochondriálních úseků, neboť často dochází k přesunu části mitochondriálního genomu do jádra (tzv. NUMTs) a při směsné izolaci (pomocí kitů) může být tato přesunutá část naamplifikována společně s anebo místo autentických mitochondriálních úseků a vykazovat tak falešně pozitivní signál reakce, obzvláště při použití nespecifickým primerů u konzervovaných oblastí genomu.

Rozdíly v amplifikaci u DNA vyizolované pomocí kitů a čisté mitochondriální DNA však nebyly zaznamenány. S největší pravděpodobností bylo hlavním důvodem brzké použití specifických či polospecifických primerů, které se vázaly pouze na mitochondriální úseky.

5.2. Optimalizace PCR reakční směsi a PCR profilu

Reakce byly míchány ve standardizovaném objemu 12,5 µl. Celkem bylo vyzkoušeno 5 typů polymeráz (s různou účinností pro amplifikaci dlouhých fragmentů či „proof-reading“ aktivitou), při elektroforetické verifikaci však nebyly patrné rozdíly v použití polymerázy a proto byla standardně používána Taq DNA polymerasa Unis (Top-Bio s.r.o.). Standardně bylo do všech reakcí přidáváno i BSA (Bovine Serum Albumin), pro stabilizaci reakce. V počátcích práce byly testovány i reakce bez použití BSA, které ovšem vykazovaly horší výsledky (nespecifické či slabší produkty), a z tohoto důvodu se BSA stalo standardní součástí PCR reakčního mixu.

Primery pro PCR reakce byly nejprve používány univerzální z prací Simon et al. (1994 a 2006) či Folmer et al. (1994). Podařilo se s nimi naamplifikovat především konzervované části genů. Většinou však produkovaly pouze nespecifické produkty a to i za použití čisté mitochondriální DNA. Dále byly testovány primery polospecifické, navržené převážně pro osekvenování mitochondriálního genomu *Dreyfusia prelli* (Žurovcová, Sattranová). Ani zde však nebyla amplifikace příliš úspěšná a proto byly ze získaných sekvencí navrženy primery specifické, jejichž úspěšnost byla téměř 100%.

Pro původně plánovanou metodu „long PCR“ se však pro polovinu vybraných fragmentů nepodařilo optimalizovat PCR profil, dalším problémem u této metody byly příliš dlouhé fragmenty, u kterých se nezdařila reamplifikace v rozředěném množství a ani jejich následná sekvenace. Vzhledem k neuspokojivým výsledkům bylo od této metody již v začátcích práce upuštěno.

K amplifikaci všech fragmentů mitogenomu byla následně použita kombinace metod „primer walking“ s navrženými specifickými primery a „long PCR“ s primery univerzálními.

Při optimalizaci PCR profilu pro „primer walking“ bylo nutné navrhnout individuální teploty annealingu a elongace pro každý pár specifických primerů amplifikovaného úseku. I přes používání specifických primerů a čisté mitochondriální DNA se při elektroforetické verifikaci objevovaly nespecifické produkty, které byly způsobeny s největší pravděpodobností sklouzáváním polymerázy v A/T bohatých částech genu či nekódující oblasti. V těchto případech pak bylo přistoupeno ke snížení

teploty elongace pro PCR reakci na 60°C. při této teplotě již byla amplifikace A/T bohatých částí mitogenomu úspěšná (protože nukleotidy A/T jsou spojeny pouze 2 H-můstky a stačí nižší energie k jejich spojení).

Pro sekvenační reakce byla dodržována stejná teplota elongace, při které byla úspěšná amplifikace PCR neboť i zde se předpokládal problém při „čtení“ A/T bohatých částí mitogenomu, který byl částečně eliminován právě sníženou teplotou elongace.

Po snížení elongační teploty byly bez výrazných problémů amplifikovány i 2 nekódující oblasti, v nichž je zastoupení nukleotidů A/T téměř 90%.

5.3. Charakteristika mitochondriálního genomu *Diuraphis noxia*

V této práci se podařilo osekvenovat celý mitochondriální genom mšice *Diuraphis noxia*, celosvětově významného škůdce obilovin. Studium celého mitochondriálního genomu si kladlo za cíl především objevit vhodnou, variabilní část pro snadné a rychlé testování populací z celého světa, neboť žádná z doposud publikovaných fylogeografických prací nevedla k definitivnímu závěru zejména z důvodu nízké variability zvolených markerů. Pro následné porovnání mitochondriálního genomu mšice *Diuraphis noxia* byly vybrány druhy z čeledi mšicovití (Aphididae), merovití (Psyllidae), molicovití (Aleyrodidae), čeledi Phylloxeridae, jejichž mitochondriální genomy byly osekvenovány a porovnávány v práci Thao et al. (2004) a dále byla přidána neúplná sekvence mitochondriálního genomu korovnice *Dreyfusia prelli* osekvenovaného v bakalářské práci (Satranová, 2009).

Ačkoliv bylo očekáváno, že bude *Diuraphis noxia* složením svého genomu odpovídat mšici *Acyrtosiphon pisum* patřící do stejného taxonu Macrosiphini, je složením svého genomu podobnější mšici *Schizaphis graminum* z taxonu Aphidini.

Největší mitogenom ze zástupců čeledi Aphididae má mšice *Acyrtosiphon pisum* (16971 bp), mitogenomy mšice *Diuraphis noxia* a *Schizaphis graminum* jsou téměř totožné (15799 bp, respektive 15721 bp). Celkově má největší mitogenom ze všech porovnávaných druhů *Trialeurodes vaporariorum* (18414 bp) Celkové procentuální zastoupení nukleotidů A/T je nejvyšší u *Aleurodicus dugessi* (86,3%), u

všech zástupců čeledi Aphididae je toto zastoupení v průměru o 2-3% nižší ačkoliv právě mšice mají 2 velké nekódující oblasti bohaté na nukleotidy A a T, existence druhé nekódující oblasti tedy nemá výrazný vliv na celkové nukleotidové složení genomu.

5.4. Protein kódující geny

U *Diuraphis noxia* bylo zjištěno 6 přesahů, kdy do sebe zasahovaly čtecí rámce různých genů či případů, že tRNA přesahovala do genů. Tyto přesahy jsou většinou velké 1-5 bazí, výjimku tvoří přesah genu ATP 6 do genu ATP 8, který je velký 19 bazí. U členovců je však tento stav častým jevem (Boore, 1999) a vyskytuje se i u dalších druhů porovnávaných v této práci.

Iniciační a terminační kodony u jednotlivých genů mšice *Diuraphis noxia* jsou totožné s iniciačními a terminačními kodony u zástupců čeledi Adelgidae, liší se pouze kodony uvedené v tabulce 16.

Tab. 16: Rozdílné iniciační a terminační kodony u čeledi Adelgidae

| Gen | Iniciační /Terminační kodon | <i>Diuraphis noxia</i> | Liší se kodon a druh u kterého se vyskytuje |
|------|-----------------------------|------------------------|--|
| CytB | terminační | TAA | <i>Schizaphis graminum</i> , TAG |
| ND2 | iniciační | ATT | <i>Schizaphis graminum</i> , <i>Acyrtosiphon pisum</i> ATA |
| ND5 | iniciační | ATA | <i>Acyrtosiphon pisum</i> ATT |
| ATP6 | iniciační | ATT | <i>Acyrtosiphon pisum</i> ATA |

U genu ND4 se u většiny druhů nevyskytuje stop kodon, jeho funkce je obnovena posttranskripční polyadenilací. U několika zástupců čeledi Aleyrodidae chybí stop kodony i u dalších genů. V souladu s literaturou (Boore 2004; Boore 2006) chybí stop kodony vždy u genů, za nimiž následuje tRNA vyskytující se na N řetězci.

Ve 4 případech (všechny z čeledi Aleyrodidae) byl zaznamenán přesun bloku genů (COIII a ND3) a tRNA z řetězce J na řetězec N a na zcela nové místo (mezi geny CytB a ND2) v genomu. Toto nové místo výskytu bloku genů je nejspíše druhově specifické.

5.5. tRNA

Z 22 obvyklých tRNA vyskytujících se v mitogenomech jich programem tRNAscan-SE (Lowe et al., 1997) bylo v *Diuraphis noxia* identifikováno 19. Ačkoliv byly zbylé 3 aminokyseliny identifikovány programem MITOS (<http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de>) jejich sekvence se nepodařilo přiřadit k sekvencím stejných tRNA u ostatních druhů. Poloha jednotlivých tRNA *Diuraphis noxia* odpovídá polohám tRNA u ostatních zástupců čeledi Adelgidae. Rozdíly v polohách jednotlivých tRNA mezi porovnávanými čeledmi se shodují s výsledky práce Lang et al. (2004), kde bylo konstatováno, že přesuny tRNA v mitochondriálním genomu jsou velmi časté.

Charakteristickým rozdílem v přesunu tRNA mezi čeledi Aphididae a ostatními testovanými druhy jsou přesuny tRNA S (serin), která se u ostatních čeledí vyskytuje na N řetězci a již před tRNA E (kys. glutamová) a tRNA C (cystein), která se naopak nachází až za za tRNA Y (tyrosin). Dále byly zaznamenány přesuny tRNA A (alanin), K (lysin), P (prolin), G (glycin), D (k. aspargová), N (asparagin).

5.6. rRNA a nekódující oblasti

Obě podjednotky rRNA se u *Diuraphis noxia* vyskytují na předpokládaném místě, před velkou podjednotkou (16S rRNA) je tRNA L (leucin), před malou podjednotkou rRNA)12S rRNA) je tRNA V (Valin). Charakteristickým znakem *Diuraphis noxia* je menší velikost 16S rRNA vzhledem ke všem druhům porovnávaným v této práci. Vzhledem k této menší velikosti vznikla mezi oběma podjednotkami nekódující oblast, kde se však mohou vyskytovat 3 zbylé tRNA nebo jejich části, které se nepodařilo identifikovat v programu tRNAscan-SE (Lowe and Eddy, 1997).

U *Neomaskellia andropogonis* se 12S rRNA a tRNA V (valin) vyskytují až za tRNA C (cystein) a tRNA Y (tyrosin).

Nekódující oblasti *Diuraohis noxia* svou délkou a strukturou odpovídají nekódujícím oblastem mšice *Schizaphis graminum*. U posledního zástupce čeledi Aphididae, *Acyrtosiphon pisum*, je oblast „repeats“ dvakrát delší. Tato čeleď je také jedinou z porovnávaných druhů mající 2 nekódující oblasti. U ostatních porovnávaných druhů se vyskytuje pouze jedna nekódující oblast, která v některých případech

(*Pachypsylla venusta*, *Bemisia tabaci*, *Tetraleurodes acaciae*) není označena jako repeats, protože neobsahuje žádné patrné formy repetice nukleotidů A/T. Přesto byly v této práci tyto úseky porovnány s AT bohatými oblastmi ostatních druhů a až na *Tetraleurodes acaciae* (A 30,2%, T39,6%) zde nebyly patrné přílišné odchylky od nukleotidového zastoupení.

5.7. Analýza nukleotidové variability a fylogenetická rekonstrukce

Podle předpokladu neutrální teorie (Kimura, 1984) je mezidruhová divergence pokračováním vnitrodruhového polymorfismu, a obě hodnoty by tedy měly korelovat. Porovnáním nukleotidové variability mitogenomů by tedy měly geny s nejvyšší hodnotou divergence být i nejvíce variabilní v rámci druhu, resp. populací, a být tak možným genetickým markerem pro jejich strukturu.

Analýza variability pomocí p – distance a metodou „sliding window“ umožnila najít ty lokusy a úseky, které by podmínku pro populačně- genetický marker mohly splňovat.

Jsou to především malá a velká podjednotka rRNA a dále geny ATP8, ND5 (především druhá polovina genu), ND4L. Všechny tyto geny vykazují nadprůměrnou variabilitu.

Na základě literatury však byla očekávána nižší variabilita na 3' koncích 12S i 16S. V práci Simon (1994) byla tato místa považována za silně konzervativní a nebyly doporučovány pro studium blízce příbuzných druhů.

Caterino et al. (2000) porovnávali vhodnost mnoha markerů mj. geny COI, COII a 16S. Z výsledků vyplývá, že gen COII byl příliš uniformní, naopak gen COI a 16S rRNA byly doporučovány pro použití při fylogenetických studiích hmyzu.

Rozpor v teoretické a reálné variabilitě a tím i vhodnosti vybraného markeru byl potvrzen i dřívějším předběžným testováním, kdy byl skrínovaný gen pro ATP 8. Ačkoliv dle výsledků mezidruhového srovnání je jeho variabilita nadprůměrná, u populací *D. noxia* se ukázal být téměř monomorfní (Chundelová, Sattranová, unpublished) V rámci předběžného testování byla také zjištěna nulová variabilita získaných úseků z oblastí AT a „repeats“, které se však tehdy nepodařilo osekvenovat v celé délce (důvodem byly zřejmě již zmiňované „řetízky“ A nebo T bazí). Opět to

bylo poněkud neočekávané, neboť např. AT oblast byla pro svou variabilitu označena za vhodný populačně-genetický marker u Lepidopter (Vila et al., 2004). Důvodem pro pozorovaný snížený polymorfismus bude s největší pravděpodobností efekt zakladatele v souvislosti s invazemi z centra šíření, což zapadá i do zjištění Shuffrana et al. (Shufra et al., 2009). Zajímavějším vysvětlením však je také možné působení selekce na kódujících lokusech, které by rozhodně mělo být předmětem dalšího výzkumu.

Dendrogramy byly vytvořeny jednak metodou Neighbor-Joining s parametrem Kimura-2 (tato metoda zohledňuje různou délku sekvencí a dále transiční a transversní substituce) a metodou Maximum Likelihood, pro níž byl nejvhodnější parametr vybrán na základě Akaike kritéria. Pro tvorbu obou dendrogramů byl použit soubor dat obsahující všechny PCG a obě rRNA.

Oba dendrogramy potvrzují fylogenetické vztahy rekonstruované v práci Thao et al., 2004 a to i přes to, že zde byly pro tvorbu dendrogramů použity pouze tři lokusy, cytB, ND2 a 16S RNA.

Novinkou oproti uvedené práci je postavení *Diuraphis noxia* v čeledi Aphididae a zařazení *D. prelli* (Adelgidae). *D. noxia* patří spolu s *A. pisum* do taxonu Microsiphini, zatímco *S. graminum* je zařazena do Aphidini. Nicméně, vyšší taxonomie mšic byla sestavena na základě biologie a morfologických znaků, takže výsledky na základě genetickém nejsou v zásadním rozporu, spíš jen opět poukazují na mezery, které by měl další výzkum objasnit a zaplnit.

6. Závěr

Podářilo se osekvenovat celý mitochondriální genom mšice *Diuraphis noxia*, kde bylo identifikováno 13 genů kódujících proteiny, 2 geny kódující malou a velkou podjednotku rRNA, 19 tRNA a 2 nekódující oblasti se zvýšeným počtem nukleotidů A/T. Pozice všech genů, rRNA i tRNA genů se shodují se zjištěným pořadím genů v mitochondriálních genomech příbuzných druhů *S. graminum* a *A. pisum*. Jediným výrazným rozdílem, který byl zjištěn, je zkrácení genu pro 16S rRNA zhruba o 600bp oproti dalším zástupcům z čeledi Aphididae.

Analýzou nukleotidové variability byly vybrány variabilní lokusy a úseky vhodné jako markery pro studium genetiky populací, ovšem bude nutno napřed vyloučit působení selekce nebo efektu zakladatele.

Na základě fylogenetické analýzy kódujících oblastí a rRNA bylo potvrzeno zařazení *D. noxia* do čeledi Aphididae a blízká příbuznost s čeledí Adelgidae. Ačkoliv patří *D. noxia* spolu s *A. pisum* do taxonu Microsiphini, na základě komparativní analýzy mitogenomů je přiřazena k *S. graminum* z taxonu Aphidini.

7. Literatura

Adams, K. L., Palmer, J. D., 2003. Evolution of mitochondrial gene content: Gene loss and transfer to the nucleus. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29: 380-395.

Anderson, S., Bankier, T., Barrell, B. G., De Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., Young, G., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457-465.

Arctander, P., 1995. Comparison of a mitochondrial gene and a corresponding nuclear pseudogene. *Proceedings of Royal Society in London B262*: 13-19.

Avise, J. C., 2000. Phylogeography. *Harvard University Press*, London.

Basky, Z., Eastop, V. F., 1991. *Diuraphis noxia* in Hungary. *Newsletter Barley Yellow Dwarf*, vol. 4, p. 34.

Basky, z., 2003. Biotypic and pest status differences between Hungarian and South African populations of Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Kurdjumov) (Homoptera: Aphididae). *Pest Management. Science* 59: 1152-1158.

Baumann, P., Moran, N. A., Baumann, L., 2000. Bacteriocyte-associated endosymbionts of insects. *The prokaryotes*, 1: 403-438.

Bazin, E., Glemin, S., Galtier, N., 2006. Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science* 312: 570-572.

Behura, S. K., Lobo, N. F., Haas, B., deBruyn, B., Lovin, D. D., Shumway, M. F., Puiu, D., Romero-Severson, J., Nene, V., Severson, D. W., 2011. Complete sequences of mitochondrial genomes of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* and

comparative analysis of mitochondrial DNA fragments inserted in the nuclear genomes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41: 770-777.

Belay, T., Smith, C. M., Stauffer. Ch., 2003. Biotypic status of the RWA, *Diuraphis noxia*, in Ethiopia, *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Entomologie* 15: 1-4.

Bensasson, D., Zhang, D., Hartl, D.L., Hewitt, G.M., 2001. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in Ecology & Evolution* 2, 314-321.

Birky, C. W., 1978. Transmission genetics of mitochondria and chloroplasts. *Annual Review of Genetics* 12: 471-512.

Black, W. C. IV., Du Teau, N. M., Puterka, G. J., Nechols, J. R., Pettorini, J. M., 1992. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* 82: 151-159.

Blanchard, J.L., Schmidt, G.W., 1996. Mitochondrial DNA migration events in yeast and humans: integration by a common end-joining mechanism and alternative perspectives on nucleotide substitution patterns. *Molecular Biology and Evolution* 13, 537-548.

Boore J.L., Brown W.M., 1995. Complete sequence of the mitochondrial DNA of the annelid worm *Lumbricus terrestris*. *Genetics* 141:305-319

Boore J.L., Lavrov D.V., Brown W.M. 1998. Gene translocation links insects and crustaceans. *Nature* 392:667-668

Boore J. L., 1999. Animal Mitochondrial Genomes *Nucleic Acids Research* . Vol. 27 No.8 1767-1780.

Boore, J. L., Brown, W. M., 2000. Mitochondrial genomes of *Galathealinum*, *Helobdella*, and *Platynereis*: Sequence and gene arrangement comparisons indicate that Pogonophora is not a phylum and Annelida and Arthropoda are not sister taxa. *Molecular Biology and Evolution* 17 (1): 87-106.

Boore, J. L., Medina, M., Rosenberg, L. A., 2004. Complete sequences of two highly rearranged molluscan mitochondrial genomes, those of the scaphopod *Graptacme eborea* and of the bivalve *Mytilus edulis*. *Molecular Biology and Evolution* 21 (8):1492-1503.

Boore J. L., Macey J. R., Medina M., 2005. Sequencing and comparing whole mitochondrial genomes of animals. *Molecular Evolution* 395: 311-348.

Boore, J. L., 2006. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Nautilus macromphalus* (Mollusca: Cephalopoda). *BMC Genomics* 7:182.

Booth K. S., and Lueker G. S., 1976. Testing for the consecutive ones property, interval graphs, and graph planarity using PQ-tree algorithms. *Journal of computer and System Sciences* 13: 335-379

Bridge, d., Cunningham, C. W., Schierwater, B., DeSalle, R., Buss, L. W., 1992. Class-level relationships in the phylum Cnidaria: Evidence from mitochondrial genome structure. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 76(4): 1967-1971.

Brooks, L., Hein, G., Johnson, G., Legg, D., Massey, B., Morrison, P., Weiss, M., Peairs, F., 1994. Economic impact of the Russian wheat aphid in the western United States, 1991-1992. In: *Proceedings of the 6th Russian Wheat Aphid Workshop, Fort*

Collins, CO, 23-25 January 1994, Great Plains Agric. Council Publ. No. 147, pp. 250-268.

Buchner, P., 1965. Endosymbiosis of animal with plant microorganisms. *New York: John Wiley.* 909 pp.

Burd, J. D., Elliot, N. C., 1996. Changes in chlorophyll a fluorescence induction kinetics in cereals infested with Russian wheat aphid. *Journal of Economic Entomology* 89: 1332-1337.

Burd, J. D., Butrs, R. A., Elliot, N. C., Shufran, K. A., 1998. Seasonal development, overwintering biology, and host-plant interactions of Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) in North America. In: Quisenberry, S. S., Pearis, F. B. (eds.): *Response model for an Introduced Pest – the Russian Wheat Aphid (Diuraphis noxia, Mordv.). Research in the Republic of South Africa.* Repub. S. Africa, Dept. Agric. Tech. Communication 191, pp. 47-52.

Burd, J. D., Porter, D. R., Puterka, G. J., Haley, S. D., Peairs F. B., 2006. Biotypic variation among North American Russian wheat aphid populations *Journal of Economic Entomology* 99: 1862-1866.

Burger, G., Lavrov, V. D., Forget, L., Lang, F.B., 2007. Sequencing complete mitochondrial and plastid genomes. *Nature* 2 (3): 603-614.

Butts, P., Pakendorf, K., 1984. Wheat breeding for resistance to *Diuraphis noxia*, methodology and progress. In: Walters M. C. (ed.): *Progress in Russian Wheat Aphid (Diuraphis noxia, Mordv.). Research in the Republic of South Africa.* Repub. S. Africa, Dept. Agric. Tech. Communication 191, pp. 47-52.

Butts, R. A., Schaalje, G. B., 1997. Impact of subzero temperatures on survival, longevity and natality of adult Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). *Environmental Entomology* 26: 661-667.

Caterino M. S., Cho S., Sperling F. A. H., 2000. The current state of insect molecular systematics: A thriving tower of Babel. *Annual Review of Entomology* 45: 1-54

Clayton, D. A., 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28: 693-705.

Clayton, D. A., 1991. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 7: 453-478.

Clayton, D. A., 1992. Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs. *International Review of Cytology* 141:217-232.

Curole, J., Kocher, T. D., 1999. Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes. *Trends in Ecology & Evolution* 14: 394-398.

Dixon, A., 1985. Aphid Ecology. Blackie and Son, Ltd. Glasgow. 136 pages. (ISBN: 0-412-00381-3).

Dolatti, L., Ghareyazie, B., Moharramipour, S., Noori-Daloi, M. R., 2005. Evidence for regional diversity and host adaptation in Irani populations of the Russian wheat aphid. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 114:171-180.

Douglas, A., 1998. Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annual Review of Entomology*, 43: 17-37.

Downie, D. A., 2002. Locating the sources of an invasive pest, grape phylloxera, using mitochondrial DNA gene genealogy. *Molecular Ecology* 11: 2013-2026.

Drouin, J., 1980. Cloning of human mitochondrial DNA in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 140: 15-34.

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

Durr, H. J. R., 1983. *Diuraphis noxia* (Mordvilko)(Hemiptera: Aphididae), a recent addition to the aphid fauna of South Africa. *Phytophylactica* 15: 81-83.

du Buy, H.G., Riley, F.L., 1967. Hybridization between the nuclear and kinetoplast DNA's of *Leishmania enriettii* and between nuclear and mitochondrial DNA's of mouse liver. *Proceedings of the National Academy of Science. USA* 57, 790-797.

Du Toit, F., Walters, M. C., 1984. *Diuraphis noxia* (Mordvilko) on winter wheat. Technical communication of the departement of agriculture (Republic of South Africa) 191: 58-62.

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

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

Footit, R. G., Maw, H. E. L., Von Dohlen, C. D., Hebert, P. D. N., 2008. Species identification of aphids (*Insecta: Hemiptera: Aphididae*) through DNA barcodes, *Molecular Ecology Resources*, 8: 1189-1201.

Fouché, A., Verhoeven, R. L., Hewitt, P. H., Walters, M. C., Kriel, C. F., DeJager, F., 1984. Russian aphid (*Diuraphis noxia*) feeding damages on wheat, related cereals and a *Bromus* grass species. Technical communication of the departement of agriculture (Republic of South Africa) 191, 22-33.

Franzen, L., Gutsche, A., Heng-Moss, T., Higley, L., Macedo, T., 2008. Physiological responses of wheat and barely to Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko) and bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hemiptera: Aphididae). *Arthropod-Plant Interactions*, Vol. 2, No. 4. pp. 227-235.

Frohlich, D. R., Torres-Jerez, I., Bedford, I. D., Markham, P. G., Brown, J. K., 1999. A phylogeographical analysis of the *Bemisia tabaci* species complex based on mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology* 8: 1683-1691.

Gerber, A. S., Loggins, R., Kumar, S., Dowling, T. E., 2001. Does nonneutral evolution shape observed patterns of DNA variation in animal mitochondrial genomes? *Annu. Review of Genetics* 35: 539-566.

Gilchrist, L. I., Rodriguez, R., and Burnett, P. A. (1984). The extent of freestate streak and *Diuraphis noxia* in Mexiko. In Barley Yellow Dwarf, *A Proceedings of the Workshop*, pp 157-163. CIMMYT. Mexico City, Mexico. 209pp.

Gissi, C., Reyes, A., Pesole, G., Saccone, C., 2000. Lineage-specific evolutionary rate in mammalian mtDNA. *Molecular Biology and Evolution* 17 (7): 1022-1031.

Grossheim, N. A., 1914. The barley aphid, *Brachycolus noxius* Mordwilko. In: *Morrison, W. P. (Ed.), Proceedings of the 5th Russian Wheat Aphid Conference*, 26-28 January 1992. Mem. Natl. Hist. Mus. Zemstwo Province Tavria 3, 35-78 (in Russian; English translation by Poprawski, T. J., Wraight, S. P., Peresyphkina, S., Great Plains Agricultural Council Publication 142, pp. 34-55.

Gutschke, A. R., Heng-Moss, T. M., Higley, L. G., Sarath, G., Mornhinweg, D. W. (2009): Physiological response of resistant and susceptible barely, *Hordeum vulgare* to the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko). *Arthropod-plant Interactions* 3:233-240

Halbert, S. E., Stoetzel, M. B., 1998. Historical overview of the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). In S. S. Quisenberry and F. B. Pearis (eds.). Response Model for an Introduced Pest – The Russian Wheat Aphid, pp. 12-30. *Proceedings. Thomas Say Publications in Entomology. Entomological Society of America. Lanham, MD.* 442 pp.

Hales, D. F., Tomiuk, J., Wöhrmann, K., Sunnuck, P., 1997. Evolutionary and genetic aspects of aphid biology: A review, *European Journal of Entomology*, 94: 1-55.

Haley, S. D., Peairs, F. B., Walker, C. B., Rudolph, J. B., Randolph, T. L., 2004. Occurrence of a new Russian wheat aphid biotype in Colorado. *Crop Science* 44: 1589-1592.

Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., DeWaard JR 2003a. Biological identifications through DNA Barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 270:313-321

Heie, O. E., 1987. Palaeontology and phylogeny. in Aphids: Their biology, natural enemies, and control, *Eds. A. K. Minks and P. Harrewijn. Elsevier, Amsterdam,* Vol 2A. pp. 367-391.

Heng-Moss, T. M., Ni, X., Macedo, T., Markwell, J. P., Baxendale, F. P., Quisenberry, S. S., Tolmay V., 2003. Comparison of chlorophyll and carotenoid concentrations among Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) – infested wheat isolines. *Journal of Economic Entomology* 96: 75-81.

Hughes, R. D., Maywald, G. F., 1990. Forecasting the favourableness of the Australian environment for the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia*, (Homoptera: Aphididae), and its potential impact on Australian wheat yields. *Bulletin of Entomological Research* 80: 165-175.

Ingman, M., Kaessmann, H., Pääbo, S., Gyllensten, U., 2001. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature* 408: 708-713.

Kimura, M., 1983. The Neutral Theory of Molecular Evolution. *Cambridge University Press*, Cambridge. ISBN 0-521-23109-4

Kindler, S. D., Spomer, S. D., 1986. Biotypic status of six greenbug (Homoptera: Aphididae) isolates. *Environmental Entomology* 80: 394-397.

Kindler, S.D., Springer, T. L., 1989. Alternate hosts of Russian Wheat Aphid (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 82:1358-1362.

Kiplagat, O., 2005. The Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko): Damage on Kenyan wheat (*Triticum aestivum* L.) varieties and possible control through resistance breeding, *Thesis Wageningen University, The Netherlands, CIP-DATA Koninklijke bibliotheek, Den Haag*, 137 pp.

Krakauer, D. C., Mira, A., 1999. Mitochondria and germ-cell death. *Nature*. 400: 125-126.

Kriel, C. F., Hewitt, P. H., De Jager, J., Walters, M. C., Fouche, A., Van der Westhuizen, M. C., 1984. Aspects of the ecology of the Russian Wheat Aphid, *Diuraphis noxia*, in the Bloemfontein district. II. Population dynamics. *In: Walters M. C. (ed.): Progress in Russian Wheat Aphid (Diuraphis noxia, Mordv.)*. Research in the

Republic of South Africa. Technical communication of the department of agriculture (Republic of South Africa) 191, pp. 14-21.

Lai, C. Y., Baumann, L., Baumann, P., 1994. Amplification of *trpEG*; adaptation of *Buchnera aphidicola* to an endosymbiotic association with aphids. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*, 91: 3819-3823.

Lang, B. F., Gray, M. W., Burger, G., 1999. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annual Review of Genetics* 33: 351-397.

Lang, B. F., Lavrov, D. V., Burger, G., 2004. Mitochondrial Genome, Evolution. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, Vol. 2, 703-708.

Lapitan, N. L. V., 2007. Limited nuclear and mitochondrial DNA variation among Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*) biotypes from the United States and South Africa. *ESA Annual Meeting*

Lavrov, D. V., Brown, W. M., Boore, J. L., 2000. A novel type of RNA editing occurs in the mitochondrial tRNAs of the centipede *Lithobius forficatus*. *Proceedings of National Academy of Science USA* 97:13738-13742.

Liu, X. M., Smith, C. M., Gill, B. S. 2002: Identification of microsatellite markers linked to Russian wheat aphid resistance genes Dn4 and Dn6. *Theoretical and Applied Genetics* 104:1042-1048

Liu, X., Marshal, J., Starý, P., Edwards, O., Puterka, G. J., Dolatti, L., El Bouhssini, M., Malinga, J., Lage, J., Smith, C., 2010. Global Phylogenetics of *Diuraphis noxia* (Kurdjumov), an invasive aphid species: evidence for multiple invasion into North America, *Journal of Heredity*.

- Llewellyn, K., Loxdale, H. D., Harrington, R., Clark, S. J., Sunnucks, P., 2004.** Evidence for gene flow and local clonal selection in field populations of the grain aphid (*Sitobion avenae*) in Britain revealed using microsatellites. *Journal of Heredity* 93: 143-153.
- Librado, P. and Rozas, J. 2009.** DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452
- Lowe, A.J., Hanotte, O., Guarino, L., 1996.** Standardization of molecular genetic techniques for the characterization of germplasm collections: the case of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Plant Genetic Resource Newsletter*. 107:50-54.
- Lowe T. M., Eddy S. R., 1997.** tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic semence. *Nucleic Acids Res.* 25: 955-964
- Loxdale, H. D., Lushai, G., 1998.** Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research*, 88: 577-600.
- Macey, J. R., Larson, A., Ananjeva, N. B., Papenfuss, T. J., 1997c.** Replication slippage may cause parallel evolution in the secondary structures of mitochondrial transfer RNAs. *Molecular Biology and Evolution* 14:30-39.
- Macey, J. R., Schulte, J. A. II, Larson, A., 2000b.** Evolution and phylogenetic information content of mitochondrial genomic structural features illustrated with acrodont lizards. *Systematic Biology* 49: 257-277.
- Macey, J. R., Papenfuss, T. J., Kuehl, J. V., Fourcade, H. M., Boore, J. L., 2004.** Phylogenetic relationship among amphisbaenian reptiles based on complete mitochondrial genome sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 33 (1): 22-31.

Michaud, J. P., Sloderbeck, P. E., 2005. Russian Wheat Aphid: An introduction pest of small grains in the High Plains. *Kansas State University*, MF-2666.

Moin, N. S., Amirnazary, M., 1994. Final report on the Russian wheat aphid. *Plant Protection Organization*, Tehran, Iran.

Moore, W. S., 1995. Inferring phylogenetics from mtDNA variations: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* 49: 718-726.

Munthali, M., Ford-Lloyd, B. V., Newbury, H. J., 1992. The random amplification of polymorphic DNA for fingerprinting plants. *PCR Methods and Applications* 1(4):274-276.

Nagley, p., Wei, Y. H., 1998. Ageing and mammalian mitochondrial genetics. *Trends in Genetics* 14: 513-517.

Nardi, F., Spinsanti, G., Boore, J. L., Carapelli, A., Dallai, R., Frati, F., 2003. Hexapod origins, monophyletic or paraphyletic? *Science* 299: 1887-1889.

Nieminen, A. L., 2003. Apoptosis and necrosis in health and disease: Role of mitochondria. *International Review of Cytology* 224: 29-55.

Nikaido, M., Rooney, A. P., Okada, N., 1999. Phylogenetic relationships among cetartiodactyls based on insertions of short and long interspersed elements: Hippopotamuses are the closest extant relatives of whales. *Proceedings of National Academy of Science USA* 96: 10261-10266.

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

Nosek, J., Tomáška, L., 2003. Mitochondrial genome diversity: evolution of the molecular architecture and replication strategy. *Current Genetics* 44: 73-84.

Nyakaana, S., Arctander, P., Siegismund, H., 2002. Population structure of the African savannah elephant inferred from mitochondrial control region sequences and nuclear microsatellite loci. *Heredity* 89 (2): 90-98.

Ortego, J., Delfino, M. A., 1994. *Diuraphis noxia* (Mordvilko) (Homoptera: Aphididae) in Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía La Plata* 70: 51-55.

Pakendorf, K. W., 1984. The research program for combating the Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia* Mordvilko) in South Africa. In Barley Yellow Dwarf, *A Proceedings of the Workshop*, p. 164-170. CIMMYT. Mexico City, Mexico. 209pp.

Payton, T. L., 2004. Genetic variation within and between Russian Wheat Aphid, *Diuraphis noxia* (Kurdjumov), biotypes found in the united states, *Diplome Thesis, Horticulture Oklahoma State University Stillwater, Oklahoma*, 51 pp.

Pearis, F. V., Brooks L., Hein, G., Johnson G., Massey B., McBride, D., Morrison, W. P., Schultz, J. T., Spackman, E., 1989. Economic impact of the Russian wheat aphid in the western United States: 1987-88. *Great Plain Agricultural Council Publ.* N°129, 23pp.

Poprawski, T. J., Wright, S. P., Peresykina, S., 1992. The barley aphid *Brachycolus noxius* Mordvilko – an edited translation. *Proceedings of 5th Russian Wheat Aphid Conference* 26-28 January 1992 (ed. By P. Morrison), pp. 34-55. Worth, Texas, USA

Quisenberry, S. S., Peairs, F. B., 1998. A response model for an introduced pest-the Russian wheat aphid. Thomas Say Publications in Entomology, *Entomological Society America*, Lanham, MD.

Puterka, G. J., Black, W. C., Steiner, W. M., Burton, R. L., 1993. Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. *Heredity* 70: 604-618.

Raimond, R., Marcade, I., Bouchon, D., Rigaud, T., Bossy, J. P., Souty-Grosset, C., 1999. Organization of the large mitochondrial genome in the isopod *Armadillidium vulgare*. *Genetics* 151: 203-210.

Richly, E., Leister, D., 2004. NUMTs in sequenced eukaryotic genomes. *Molecular Biology and Evolution* 21, 1081-1084.

Robinson, J., 1993. Conditioning host plant affects antixenosis and antibiosis to Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 86: 602-606.

Saccone, C., DeGiorgio, C., Gissi, C., Pesole, G., Reyes, A., 1999. Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* 238: 195-209

Simon Ch., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P., 1994. Evolution, weighting, phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 651-701.

Simon Ch., Buckley T. R., Frati F., Stewart J. B., Beckenbach A. T., 2006. Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37: 545-579

Shadel G. S., Clayton D. A., 1997. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annual Review of Biochemistry* 66: 409-435

Shao, R., Barker, S. C., 2003. The highly rearranged mitochondrial genome of the plague thrips, *Thrips imagines* (Insecta: Thysanoptera): convergence of two novel gene boundaries and an extraordinary arrangement of rRNA genes. *Molecular Biology and Evolution* 20:362-370.

Shmitz, J., Ohme M., Zischler, H., 2001. SINE insertions in cladistic analyses and the phylogenetic affiliations of *Tarsius bancanus* to other primates. *Genetics* 157: 777-784.

Shufan, K. A., Kiekman, L. R., Puterka, G. J., 2007. Absence of Mitochondrial DNA Sequence variation in RWA (*Hemiptera: Aphididae*) populations consistent with a single introduction into the United States, *Journal of the Kansas entomological society* 80 (4): 319-320.

Shufan, K. A., Payton, T. L., 2009. Limited genetic variation within and between RWA(*Hemiptera:Aphididae*) biotypes in the US, *Journal of Economic Entomology*, 102(1): 440-445.

Smith, C. M., Schotzko, D., Zemetra R. S., Souza, E. J., Schroeder-Teeter, S., 1991. Identification of Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) resistance in wheat. *Journal of Economic Entomology* 84: 328-332.

Starý, P.,1996. The expansit Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordw.) detected in the Czech Republic. *Anzeiger für Schädlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz* 69: 19-20.

Starý, P., Basky, Z., Tanigoshi, L. K., Tomanovic, Z., (2003). Distribution and history of Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Kurdj.) in the Carpathian Basin (Hom., Aphididae), *Anzier für Schädlingskunde Journal of Pest Science*, 76: 17-21.

Stoetzel, M. B., 1987. Information on and identification of *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae) and other aphid species colonizing leaves of wheat and barley in the United States. *Journal of Economic Entomology*, 80: 696-704.

Tamura, K., Aotsuka, T., 1998. Rapid isolation method of animal mitochondrial DNA by the alkaline lysis procedure. *Biochemical Genetics* 26: 11/12 815-819.

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

Thao, M. L., Baumann, L., Baumann, P., 2004. Organization of the mitochondrial genomes of whiteflies, aphids and psyllids (Hemiptera, Sternorrhyncha). *BMC Evolutionary Biology* 4:25.

Thorsness, P.E., Weber, E.R., 1996. Escape and migration of nucleic acids between chloroplasts, mitochondria and the nucleus. *International Review of Cytology* 165: 207-234.

Timmis, J.N., Ayliffe, M.A., Huang, C.Y., Martin, W., 2004. Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nature Reviews Genetics* 5: 123-135.

van Emden, H. F., Harrington, R., 2007. Aphids as Crop Pests, *CAB International, Oxford*, 699 pp.

Vila, M., Björklund, M., 2004. The Utility of the neglected mitochondrial control region for evolutionary studies in Lepidoptera (Insecta). *Journal of Molecular Evolution* 58:280-290.

Walters, m. C., Penn, F., du Toit, F., Botha, T.C., Aalbersberg, Y. K., Hewitt, P. H., Broodryk, S. W., 1980. The Russian wheat aphid. Farming in South Africa, Leaflet Ser., *Wheat C3*: 1-6.

Webster, J. A., Starks, K. J., 1987. Fecundity of *Schizaphis graminum* and *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae) at three temperature regimes. *Journal of the Kansas Entomological Society* 60: 580-582.

Weiland, A. A., Pearis, F. B., Randolph, T. L., Rudolph, J. B., Haley, S. D., Puterka, G. J., 2008. Biotypic diversity in Colorado Russian wheat aphid (Hemiptera: Aphididae) populations. *Journal of Economic Entomology* 101 (2):569-574.

Wernegreen, J., 2002. Genome evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nature Reviews Genetics* 3: 850-831.

Wilson, A. C., Cann, R. L., Carr, S. M., George, M., Gyllensten, U. B., Helm-Bychowski, K. M., Higuchi, R. G., Palumbi, S. R., Prager, E. M., Sage, R. D., Stoneking, M., 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on the evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society* 26: 375-400.

Wolstenholme, D. R., 1992. Animal mitochondrial DNA: Structure and evolution. *International Review of Cytology* 141: 173-216.

Wyman S. K., Jansen R. K., Boore J. L., 2004. Automatic annotation of organellar genomes with DOGMA. *Bioinformatics* 20(17): 3252-3255

Yost, H. J., Phillips, C. R., Boore, J. L., Bertman, J., Whalen, B., Danilchik, M. V., 1995. Relocation of mitochondrial RNA to the prospective dorsal midline during *Xenopus* embryogenesis. *Developmental Biology* 170: 83-90.

Zhang, G., 1991. Russian wheat aphid (RWA) in China. *Proceedings of Aphid-plant Interactions: Populations to Molecules*, August 1990, pp.327-328, Stillwater, Oklahoma, USA.

Zhang, De-X., Hewitt, G. M., 1997. Insect mitochondrial control region: A review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochemical Systematics and Ecology* 25(2): 99-120.

Internetové zdroje:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

pacosy.informatik.uni-leipzig.de

<http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de>

8. Přílohy

Příloha 1: Primery u nichž se nezdařila amplifikace

Tab. 5: neúspěšně amplifikované primery

| Název primeru | Sekvence primeru 5' → 3' | Směr |
|----------------------------------|--|------|
| A8-N-4061 ² | GAG AAT AAG TTT GTT ATC ATT TTC A | R |
| C3-J-5014 ² | TTA TTT ATT GCA TCA GAA GT | F |
| TN-J-6165 ² | TTT AAT TGA ARC CAA AAA GAG G | F |
| N5-J-7077 ² | TTA AAT CCT TWG ART AAA AYC C | F |
| N5-N-7211 ² | TTA AGG CTT TAY TAT TTA TRT GYG C | R |
| N4-N-8487 ² | TAT CAG CTA ATA TAG CAG CTC C | R |
| N4-J-8502 ² | GTA GGA GGA GCT GCT ATA TTA G | F |
| N1-N-11841 ² | GGT ACA TTA CCT CGG TTT CGT TAT GAT | R |
| LR-N-13398 ² | CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT | R |
| SR-N-14220 ² | ATA TGY ACA YAT CGC CCG TC | F |
| SR-J-14233 ² | AAG AGC GAC GGG CGA TGT GT | F |
| SR-N-14275b ² | AAG GTG GAT TTG GTA GTA A | R |
| AdelCOIrev1 ³ (1650) | GAA TGA TAT ATC AGG TGA TCC | R |
| AdelATP8rev1 ³ (3900) | GTT TAT TGG TGA TAT TTG TGG | R |
| Aphid12Sfor ⁴ (14120) | ATG TTT AAC CGC AAC TGC TGC | F |
| AphidND2rev ⁴ (830) | CCT TCA ATT ATA GAT GGT AAT CA | R |
| DactCO3for1 ³ (5215) | CAC TAG CAC CAT CAA CTG AAA TTG | F |
| AdelMet-for ³ (210) | AAG CTA AAT TAA GCT TTT GG | F |
| AdelATfor1(14400) | CAA TTA TAG AAC AGA TTC CTC | F |
| DnCO3R ³ (5300) | GAG TTA ATG TAA TTG TAA ATC TTG | R |
| AdelND6rev ³ (1650) | GAA ATT CAT GAA GTT TTA TTG ATT AAG TT | R |
| DnND5R ³ (7320) | GGG TGG ATT AAT TGA TTA TTT ACC | R |
| DnoxND5R1 ⁴ (7515) | TCA AGA TAT TCG TAA AAT GGG | R |
| 12585rev ⁵ | GGA TAT ATT CAA ATT CGT AAG GG | R |
| NoxND5F ⁵ (6900) | GGT ATA TGA AAT TTT ATA TGG CTG ATG CC | F |

| | | |
|--------------------------------|---|---|
| DNRepF ⁵ (6345) | TCC CAT AAT TCA AAA ACG CTG | F |
| DNRepR ⁵ (6500) | CAT TCT TCT ACT TTA GTA ACT GCT GG | R |
| DNnd2F ⁵ (7225) | CAG ATG ATG TTA TTC ACT C | F |
| 1460rev ⁵ | GGC TGA AGT TTA GGC GAT AAA TTG TA | R |
| NoxND1F ⁵ (12315) | CCA TCA CCT ATA GGT TG | F |
| NoxAKrepF ⁵ (6000) | CCG ACC TGG ATT ATA TTT TGG | F |
| NoxrepF ⁵ (6100) | CCC AAG ATT AGC AAT TAA AAT AGA TGC AAT | F |
| NoxrepR ⁵ (6500) | GTT GGT TGA ATT GAG TAT AAT TTA AAT AGA GG | R |
| Repreverse ⁵ (6615) | GTT TTT TAA TAA AGA TTA AAT TTT GAG | R |
| Nox5f ⁵ (6930) | GTG TGG TTT TCC TTT TTT CTG TAG | F |
| Nox5r ⁵ (7790) | CTC AAT TCA ACC AAC TTC AAT AAC C | R |

1 Folmer et al., 1994

2 Simon et al., 1994, 2006

3 Žurovcová, Sattranová

4 Žurovcová

5 Žurovcová, Chundelová

Příloha 2: sekvence oblasti AT a Repeats u *D. noxia*

Repeats

Část totožná se *Schizaphis graminum* (barevně označeny nukleotidy A/T)

ACCTGCAAAGGTAACCTTTAACAAAATTTTAAAAAAAAAACTCAA
ATTTAATCTTTATTA AAA

Repetice v *D. noxia*:

TTATAAAAAA

Celková sekvence repeats oblasti:

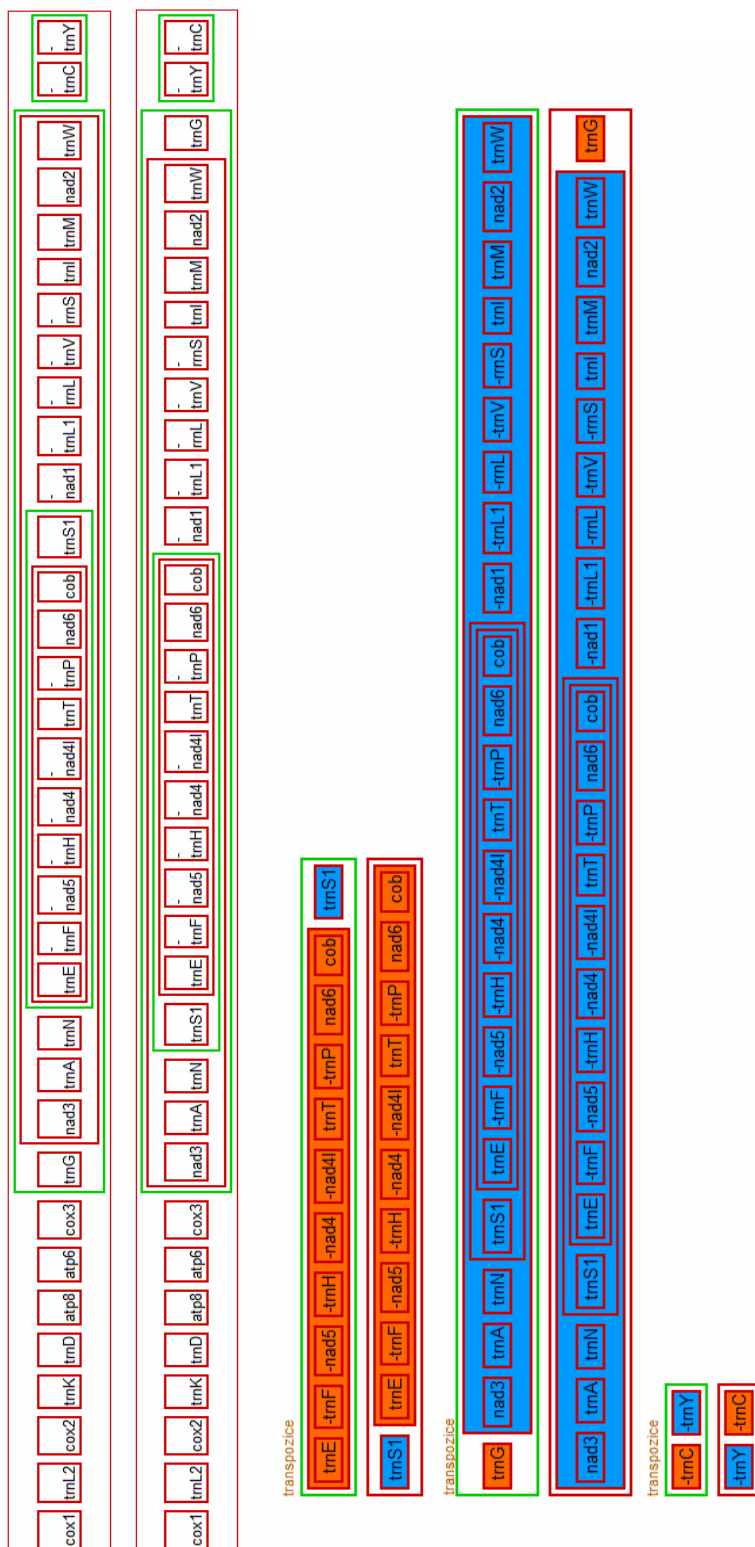
AATAAAATTTTATAACTAAAATTTTACTTTTTTAAAAAAAAAATTATAAAA
AAATTATTTCTAAAAATTAAAATTATAAAAAAAAAATAACTATAAATATAC
ATAAATTTATATAAAAAAAAACATGCAAAGGTAACCTTTAACAAAATT
TTAAAAAAAAAAAACTCAAATTTAATCTTTATTAAAAACTATAAATTTT
TAACTAAAATTTTACTTTTTTAAAAAAAAATTATAAAAAAATTATTTCTAAA
AATTAAAATTATAAAAAAAAAATAA CTTTAAATATACTTAATTTTATATA
AAAAAACAGGC AAAGGTAACCTCCCTTTAACAAAATTTTAAAAAAAAAAC
TCAAATTTAATCTTTATTAAAAACTATAAAATTTTATAACTAAAATTTT
ACTTTTTTAAAAAAAAATTATAAAAAATTTTTTCTAAAATTTAAATTTAAA
AAAAAAAAAAAACTATAAATATCCTTAATTTTATATAAAAAACCTGCA
AAGGTAACCTTTAACAAAATTTTAAAAAAAAAAAACTCAAATTTAAT
CTTTATTAAAAACTAAAAATTTTTTAACTAAAATTTTACTTTTTTAAAA
AAAATTTATAAAAAAC

AT-oblast:

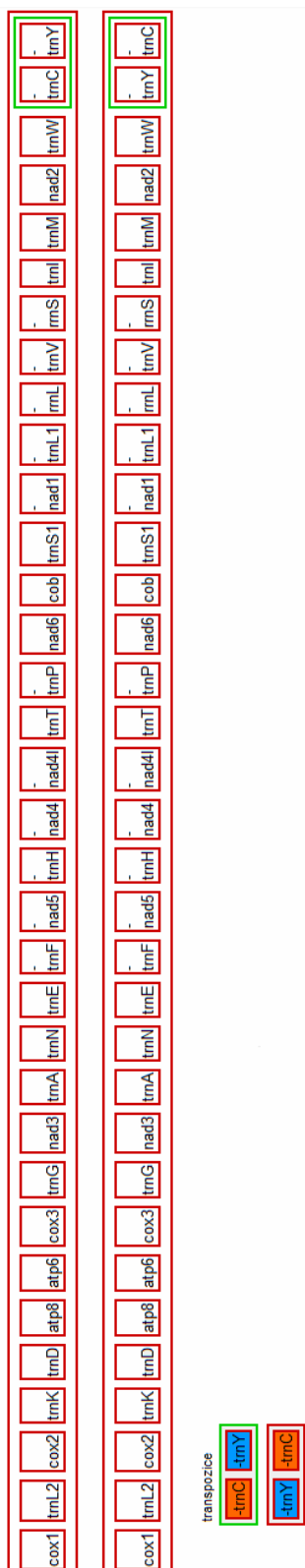
TATATATAAAATAATAATTATACGGTTTTATATTTTTAAAATAATTAATATT
ATTTTTAAAATTATTAATTTTATTAATAAAGTAAAAAATCCAATAATTTA
ATAAAATTAATATTAATTAATACAAAATTTAATAATCTTAACCTAAAATTTA
ATTATTTATTTTTAAATAATTTTAATAAATATTAATACTTATTTTTATAATTT
AATTTAAATAAAAACTTAAATTAAGTAAAAATAGCAAATTATCCCAAAT
TATCTCATCCCCATATATATATATACAATTAATATATGTATATATTATATA
AGGATTTATATAAATATATATATATATATATATAGATGTATAGATAAGTAATA
TCATATAAGGATTTATATATATATATATATATATATAAATATATAAGCT
ATATAGATGTATATATATATATATATATACTATATACATAAGAAGTCTA
TATATGTATACTACTATATATATTAATAAATCCTCTATACTCTTTCTTCTT
TCTTTTTTTTTTAAAGGAGGGCTACGCCCCCTTTTTAGACAATTAGAAACG
TCATGCCTCACTAAACATTTTTTTTTAAAAAATTTATTGGTAATTTTACCAA
TATTAGTATAAACCATAAACATTTTTTTTATTAACAATATTA AAA

Příloha 3: Grafické znázornění přesunů tRNA a genů u jednotlivých druhů

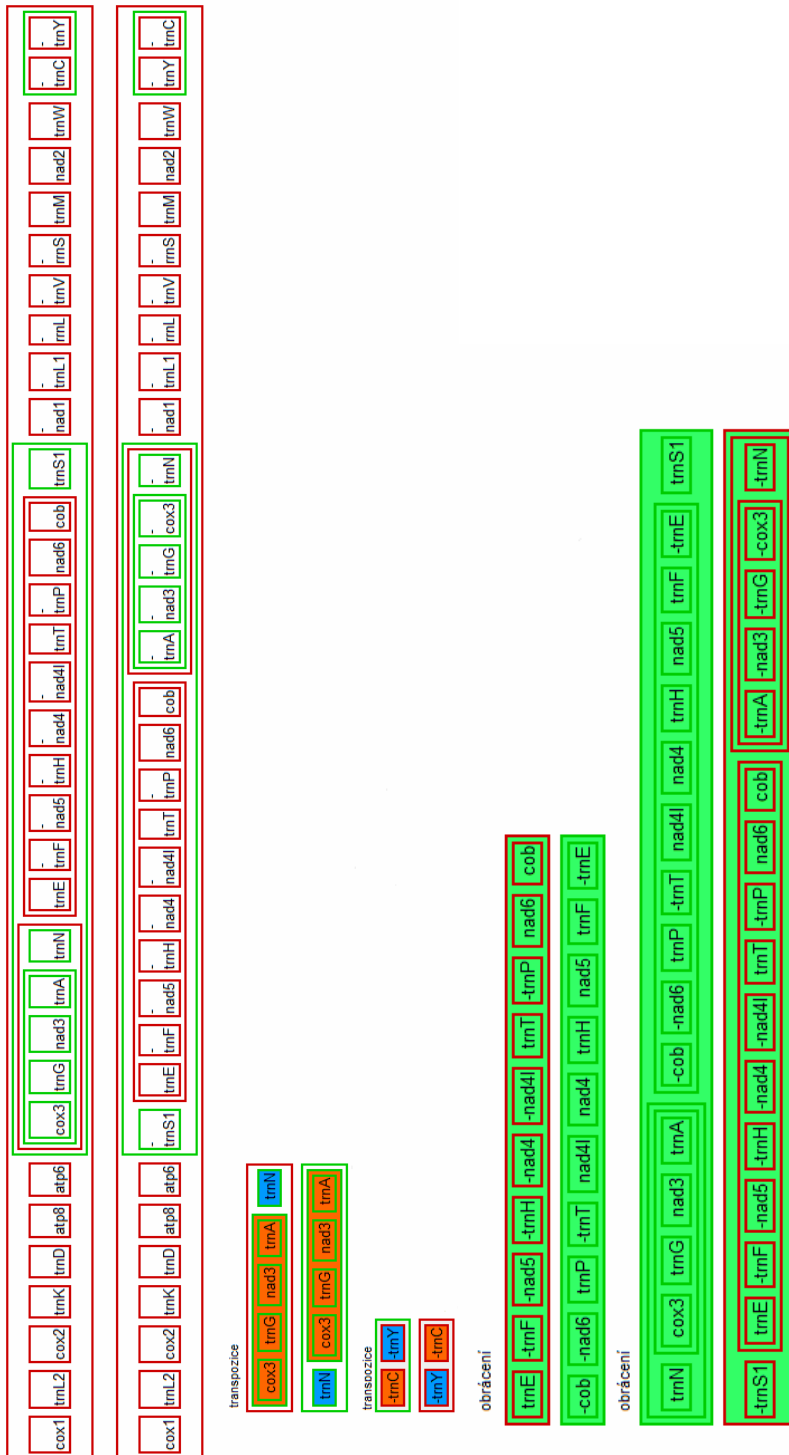
Obř. 6: Porovnání genomů *D. noxia* (horní genom) a *T. vaporariorum*



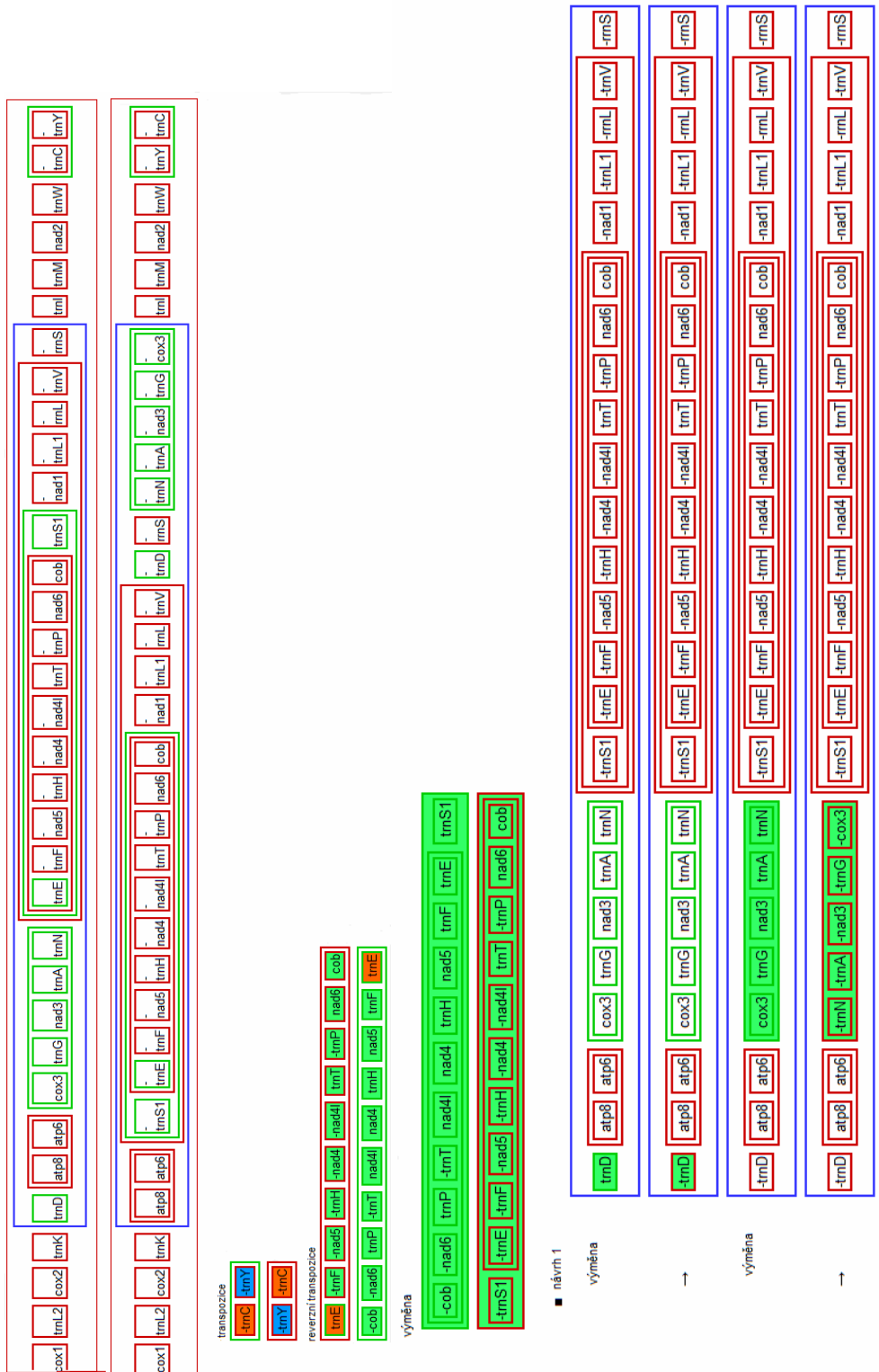
Obr. 8: Porovnání genomů *D. noxia* (horní genom) a *A. dugesii*.



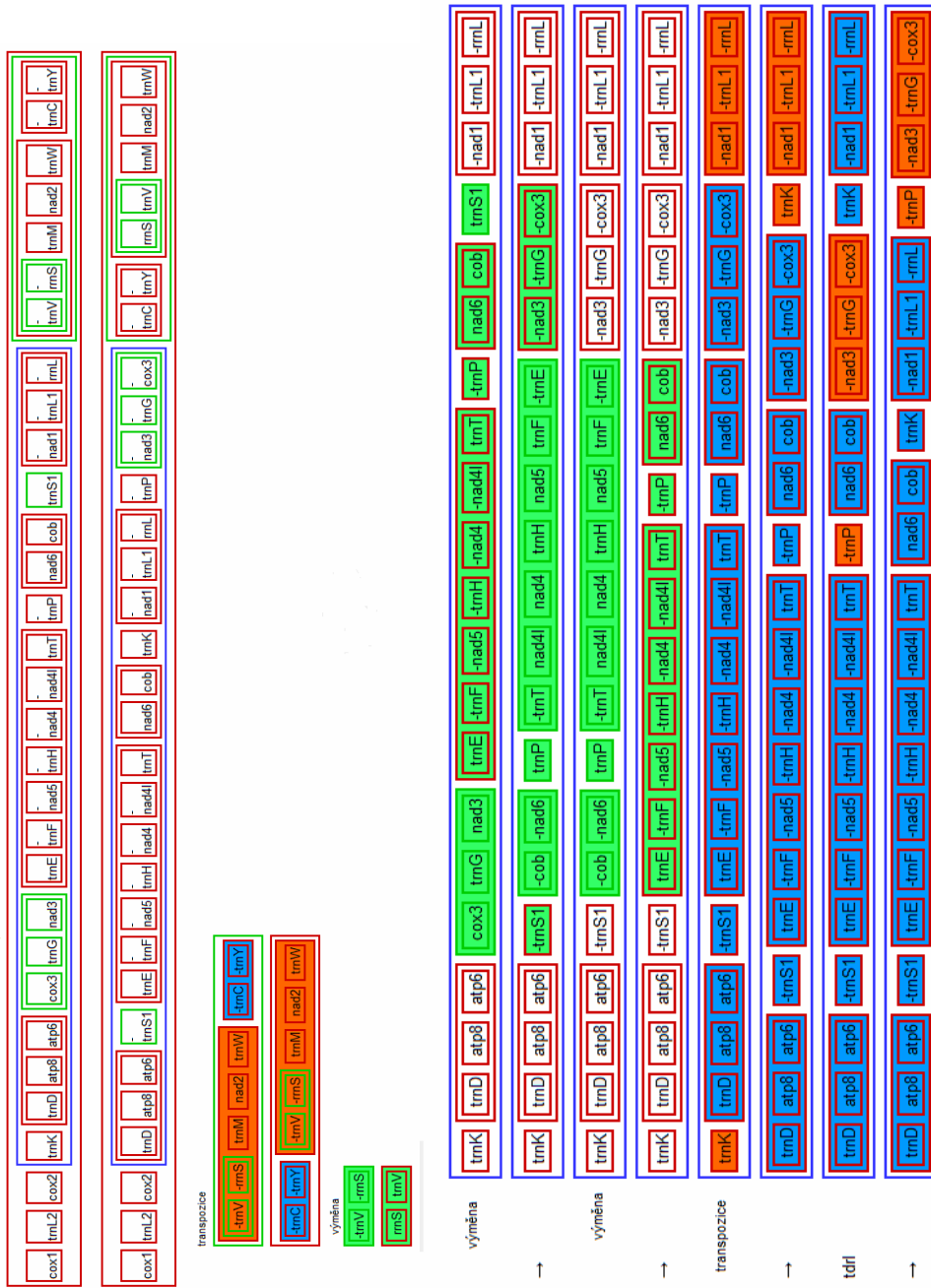
Obr. 9: Porovnání genomů *D. noxia* (horní genom) a *A. aceris*



Obr. 10: Porovnání genomů *D. noxia* (horní genom) a *B. tabaci*



Obr. 11: Porovnání genomů *D. noxia* (horní genom) a *N. andropogonis*



Příloha 4: Matice p-distance pro jednotlivé geny

p-distance matice pro gen ATP 6:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. D.noxiaATP6 | | 0,012 | 0,011 | 0,015 | 0,016 | 0,019 | 0,018 | 0,019 | 0,020 | 0,018 | 0,019 | 0,019 |
| 2. S.graminumATP6 | 0,113 | | 0,011 | 0,015 | 0,016 | 0,018 | 0,019 | 0,019 | 0,020 | 0,019 | 0,020 | 0,019 |
| 3. A.pisumATP6 | 0,096 | 0,103 | | 0,016 | 0,016 | 0,018 | 0,019 | 0,019 | 0,020 | 0,019 | 0,020 | 0,020 |
| 4. D.vitifoliaeATP6 | 0,197 | 0,200 | 0,208 | | 0,015 | 0,018 | 0,018 | 0,019 | 0,019 | 0,020 | 0,019 | 0,019 |
| 5. D.prelliATP6 | 0,188 | 0,207 | 0,205 | 0,171 | | 0,018 | 0,019 | 0,019 | 0,020 | 0,019 | 0,020 | 0,019 |
| 6. A.acerisATP6 | 0,433 | 0,436 | 0,451 | 0,450 | 0,443 | | 0,017 | 0,019 | 0,019 | 0,018 | 0,017 | 0,018 |
| 7. A.dugesiiATP6 | 0,377 | 0,383 | 0,396 | 0,358 | 0,355 | 0,292 | | 0,018 | 0,018 | 0,019 | 0,018 | 0,018 |
| 8. B.tabaciATP6 | 0,433 | 0,411 | 0,438 | 0,410 | 0,407 | 0,352 | 0,326 | | 0,020 | 0,018 | 0,018 | 0,019 |
| 9. N.andropogonisATP6 | 0,457 | 0,460 | 0,481 | 0,443 | 0,457 | 0,370 | 0,354 | 0,394 | | 0,020 | 0,018 | 0,018 |
| 10. P.venustaATP6 | 0,392 | 0,376 | 0,400 | 0,394 | 0,369 | 0,437 | 0,390 | 0,426 | 0,470 | | 0,019 | 0,019 |
| 11. T.acaciaeATP6 | 0,459 | 0,468 | 0,462 | 0,469 | 0,465 | 0,375 | 0,355 | 0,352 | 0,402 | 0,437 | | 0,017 |
| 12. T.vaporariorumATP6 | 0,471 | 0,478 | 0,489 | 0,495 | 0,478 | 0,418 | 0,370 | 0,421 | 0,450 | 0,478 | 0,387 | |

p-distance matice pro gen ATP8:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. D.noxiaATP8 | | 0,032 | 0,037 | 0,033 | 0,034 | 0,038 | 0,040 | 0,038 | 0,043 | 0,044 | 0,041 | 0,038 |
| 2. S.graminumATP8 | 0,244 | | 0,037 | 0,036 | 0,037 | 0,041 | 0,041 | 0,037 | 0,042 | 0,041 | 0,039 | 0,036 |
| 3. A.pisumATP8 | 0,307 | 0,253 | | 0,038 | 0,041 | 0,041 | 0,044 | 0,040 | 0,044 | 0,040 | 0,044 | 0,042 |
| 4. D.vitifoliaeATP8 | 0,250 | 0,327 | 0,373 | | 0,033 | 0,041 | 0,041 | 0,038 | 0,040 | 0,039 | 0,041 | 0,039 |
| 5. D.prelliATP8 | 0,310 | 0,357 | 0,413 | 0,256 | | 0,039 | 0,040 | 0,038 | 0,042 | 0,043 | 0,041 | 0,040 |
| 6. A.acerisATP8 | 0,521 | 0,542 | 0,536 | 0,563 | 0,521 | | 0,042 | 0,041 | 0,041 | 0,042 | 0,042 | 0,043 |
| 7. A.dugesiiATP8 | 0,458 | 0,444 | 0,403 | 0,486 | 0,472 | 0,457 | | 0,042 | 0,040 | 0,043 | 0,041 | 0,043 |
| 8. B.tabaciATP8 | 0,571 | 0,542 | 0,527 | 0,480 | 0,536 | 0,585 | 0,483 | | 0,041 | 0,038 | 0,038 | 0,040 |
| 9. N.andropogonisATP8 | 0,589 | 0,582 | 0,543 | 0,589 | 0,553 | 0,512 | 0,471 | 0,558 | | 0,040 | 0,038 | 0,040 |
| 10. P.venustaATP8 | 0,530 | 0,492 | 0,519 | 0,533 | 0,576 | 0,579 | 0,488 | 0,601 | 0,612 | | 0,036 | 0,037 |
| 11. T.acaciaeATP8 | 0,616 | 0,659 | 0,610 | 0,624 | 0,616 | 0,635 | 0,606 | 0,653 | 0,600 | 0,705 | | 0,042 |
| 12. T.vaporariorumATP8 | 0,646 | 0,667 | 0,629 | 0,605 | 0,583 | 0,530 | 0,486 | 0,573 | 0,569 | 0,681 | 0,631 | |

p-distance matice pro gen COI:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. D.noxiaCOX1 | | 0,007 | 0,006 | 0,007 | 0,008 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,012 | 0,010 | 0,012 | 0,012 |
| 2. S.graminumCox1 | 0,092 | | 0,006 | 0,007 | 0,008 | 0,012 | 0,011 | 0,012 | 0,011 | 0,011 | 0,012 | 0,011 |
| 3. A.pisumCox1 | 0,070 | 0,085 | | 0,007 | 0,008 | 0,012 | 0,011 | 0,011 | 0,011 | 0,011 | 0,012 | 0,011 |
| 4. D.vitifoliaeCox1 | 0,105 | 0,115 | 0,104 | | 0,008 | 0,011 | 0,011 | 0,011 | 0,011 | 0,011 | 0,012 | 0,011 |
| 5. D.prelliCOX1 | 0,125 | 0,139 | 0,131 | 0,114 | | 0,012 | 0,011 | 0,011 | 0,011 | 0,011 | 0,012 | 0,011 |
| 6. A.acerisCOX1 | 0,321 | 0,326 | 0,318 | 0,314 | 0,328 | | 0,010 | 0,010 | 0,011 | 0,012 | 0,010 | 0,011 |
| 7. A.dugesiiCOX1 | 0,264 | 0,268 | 0,261 | 0,261 | 0,269 | 0,252 | | 0,010 | 0,010 | 0,012 | 0,010 | 0,011 |
| 8. B.tabaciCOX1 | 0,330 | 0,333 | 0,328 | 0,329 | 0,332 | 0,230 | 0,245 | | 0,010 | 0,011 | 0,010 | 0,010 |
| 9. N.andropogonis | 0,303 | 0,301 | 0,299 | 0,297 | 0,303 | 0,271 | 0,229 | 0,255 | | 0,012 | 0,010 | 0,010 |
| 10. P.venustaCOX1 | 0,262 | 0,280 | 0,267 | 0,272 | 0,263 | 0,347 | 0,292 | 0,342 | 0,335 | | 0,013 | 0,011 |
| 11. T.acaciaeCOX1 | 0,331 | 0,337 | 0,340 | 0,340 | 0,341 | 0,263 | 0,257 | 0,260 | 0,273 | 0,349 | | 0,010 |
| 12. T.vaporariorumcox1 | 0,350 | 0,346 | 0,349 | 0,341 | 0,352 | 0,255 | 0,279 | 0,286 | 0,275 | 0,371 | 0,264 | |

p-distance matice pro gen COII:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. D.noxiaCOX2 | | 0,010 | 0,009 | 0,013 | 0,013 | 0,017 | 0,016 | 0,019 | 0,017 | 0,017 | 0,018 | 0,018 |
| 2. S.graminumCox2 | 0,070 | | 0,009 | 0,013 | 0,013 | 0,017 | 0,016 | 0,019 | 0,018 | 0,017 | 0,017 | 0,018 |
| 3. A.pisumCox2 | 0,074 | 0,074 | | 0,012 | 0,013 | 0,017 | 0,016 | 0,018 | 0,018 | 0,017 | 0,017 | 0,018 |
| 4. D.vitifoliaeCox2 | 0,140 | 0,137 | 0,134 | | 0,012 | 0,017 | 0,016 | 0,018 | 0,017 | 0,016 | 0,017 | 0,018 |
| 5. D.prelliCOX2 | 0,135 | 0,137 | 0,135 | 0,129 | | 0,017 | 0,016 | 0,018 | 0,017 | 0,017 | 0,017 | 0,017 |
| 6. A.acerisCOX2 | 0,374 | 0,373 | 0,362 | 0,368 | 0,359 | | 0,016 | 0,016 | 0,017 | 0,018 | 0,015 | 0,016 |
| 7. A.dugesiiCOX2 | 0,278 | 0,286 | 0,283 | 0,281 | 0,292 | 0,277 | | 0,017 | 0,017 | 0,017 | 0,017 | 0,016 |
| 8. B.tabaciCOX2 | 0,389 | 0,385 | 0,377 | 0,385 | 0,388 | 0,277 | 0,289 | | 0,017 | 0,019 | 0,016 | 0,017 |
| 9. N.andropogonisCOX2 | 0,365 | 0,370 | 0,376 | 0,365 | 0,355 | 0,308 | 0,287 | 0,360 | | 0,018 | 0,016 | 0,016 |
| 10. P.venustaCOX2 | 0,306 | 0,321 | 0,311 | 0,309 | 0,323 | 0,405 | 0,336 | 0,409 | 0,418 | | 0,018 | 0,018 |
| 11. T.acaciaeCOX2 | 0,402 | 0,411 | 0,397 | 0,394 | 0,386 | 0,292 | 0,315 | 0,313 | 0,330 | 0,418 | | 0,017 |
| 12. T.vaporariorumCOX2 | 0,405 | 0,402 | 0,396 | 0,393 | 0,402 | 0,301 | 0,283 | 0,307 | 0,336 | 0,416 | 0,303 | |

p-distance matice pro gen COIII:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. D.noxiaCOx3 | | 0.011 | 0.009 | 0.016 | 0.015 | 0.016 | 0.017 | 0.018 | 0.016 | 0.017 | 0.017 | 0.016 |
| 2. S.graminumCox3 | 0.120 | | 0.011 | 0.018 | 0.018 | 0.017 | 0.016 | 0.017 | 0.016 | 0.017 | 0.017 | 0.016 |
| 3. A.pisumCox3 | 0.080 | 0.116 | | 0.017 | 0.017 | 0.017 | 0.017 | 0.018 | 0.016 | 0.018 | 0.017 | 0.016 |
| 4. D.vitifoliaeCOx3 | 0.140 | 0.179 | 0.157 | | 0.020 | 0.024 | 0.022 | 0.024 | 0.024 | 0.023 | 0.024 | 0.024 |
| 5. D.prelli COx3 | 0.105 | 0.163 | 0.135 | 0.139 | | 0.024 | 0.024 | 0.025 | 0.023 | 0.024 | 0.025 | 0.025 |
| 6. A.acerisCOx3 | 0.412 | 0.420 | 0.407 | 0.422 | 0.391 | | 0.015 | 0.017 | 0.015 | 0.017 | 0.017 | 0.017 |
| 7. A.dugesiiCOx3 | 0.381 | 0.386 | 0.382 | 0.396 | 0.374 | 0.335 | | 0.016 | 0.017 | 0.017 | 0.016 | 0.016 |
| 8. B.tabacicox3 | 0.408 | 0.413 | 0.406 | 0.431 | 0.416 | 0.369 | 0.358 | | 0.017 | 0.016 | 0.015 | 0.017 |
| 9. N.andropogoniscox3 | 0.380 | 0.396 | 0.385 | 0.407 | 0.367 | 0.339 | 0.335 | 0.376 | | 0.017 | 0.016 | 0.017 |
| 10. P.venustaCOx3 | 0.366 | 0.380 | 0.364 | 0.383 | 0.365 | 0.425 | 0.420 | 0.434 | 0.420 | | 0.015 | 0.017 |
| 11. T.acaciaeCOx3 | 0.469 | 0.464 | 0.474 | 0.498 | 0.466 | 0.410 | 0.383 | 0.378 | 0.427 | 0.465 | | 0.016 |
| 12. T.vaporariorumcox3 | 0.475 | 0.480 | 0.492 | 0.489 | 0.477 | 0.391 | 0.367 | 0.425 | 0.413 | 0.518 | 0.395 | |

p-distance matice pro gen CytB:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. D.noxiaCytB | | 0.008 | 0.008 | 0.009 | 0.010 | 0.015 | 0.014 | 0.015 | 0.015 | 0.014 | 0.014 | 0.015 |
| 2. S.graminumcytB | 0.080 | | 0.008 | 0.009 | 0.011 | 0.015 | 0.014 | 0.015 | 0.015 | 0.013 | 0.015 | 0.016 |
| 3. A.pisumCytB | 0.077 | 0.079 | | 0.009 | 0.010 | 0.015 | 0.014 | 0.014 | 0.015 | 0.014 | 0.015 | 0.015 |
| 4. D.vitifoliaeCytB | 0.123 | 0.121 | 0.111 | | 0.010 | 0.014 | 0.014 | 0.015 | 0.015 | 0.014 | 0.014 | 0.015 |
| 5. D. prelli cyt b | 0.146 | 0.148 | 0.146 | 0.133 | | 0.015 | 0.014 | 0.015 | 0.013 | 0.014 | 0.014 | 0.015 |
| 6. A.acerisCytB | 0.360 | 0.369 | 0.377 | 0.369 | 0.373 | | 0.012 | 0.012 | 0.013 | 0.014 | 0.013 | 0.013 |
| 7. A.dugesiiCytB | 0.322 | 0.314 | 0.316 | 0.310 | 0.339 | 0.270 | | 0.013 | 0.013 | 0.014 | 0.013 | 0.013 |
| 8. B.tabaciCytB | 0.364 | 0.375 | 0.367 | 0.359 | 0.385 | 0.292 | 0.292 | | 0.013 | 0.014 | 0.014 | 0.012 |
| 9. N.andropogonisCytB | 0.345 | 0.340 | 0.341 | 0.329 | 0.340 | 0.300 | 0.263 | 0.316 | | 0.013 | 0.014 | 0.013 |
| 10. P.venustaCytB | 0.322 | 0.325 | 0.322 | 0.320 | 0.323 | 0.398 | 0.372 | 0.415 | 0.391 | | 0.014 | 0.015 |
| 11. T.acaciaeCytB | 0.377 | 0.376 | 0.376 | 0.366 | 0.392 | 0.321 | 0.321 | 0.302 | 0.323 | 0.390 | | 0.012 |
| 12. T.vaporariorumCytB | 0.390 | 0.379 | 0.393 | 0.386 | 0.411 | 0.302 | 0.286 | 0.296 | 0.326 | 0.400 | 0.319 | |

p-distance matice pro gen ND1:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. D.noxiaND1 | | 0.007 | 0.007 | 0.011 | 0.015 | 0.015 | 0.015 | 0.016 | 0.015 | 0.014 | 0.016 | 0.017 |
| 2. S.graminumND1 | 0.062 | | 0.007 | 0.010 | 0.016 | 0.015 | 0.015 | 0.016 | 0.015 | 0.015 | 0.016 | 0.017 |
| 3. A.pisumND1 | 0.056 | 0.054 | | 0.011 | 0.014 | 0.015 | 0.016 | 0.016 | 0.014 | 0.014 | 0.016 | 0.016 |
| 4. D.vitifoliaeND1 | 0.137 | 0.131 | 0.125 | | 0.014 | 0.015 | 0.015 | 0.016 | 0.015 | 0.014 | 0.016 | 0.017 |
| 5. D. prelli ND1 | 0.129 | 0.135 | 0.113 | 0.121 | | 0.020 | 0.020 | 0.022 | 0.022 | 0.019 | 0.021 | 0.022 |
| 6. A.acerisND1 | 0.378 | 0.387 | 0.369 | 0.384 | 0.386 | | 0.015 | 0.015 | 0.015 | 0.016 | 0.016 | 0.016 |
| 7. A.dugesiiND1 | 0.359 | 0.342 | 0.343 | 0.353 | 0.353 | 0.318 | | 0.014 | 0.014 | 0.015 | 0.015 | 0.014 |
| 8. B.tabaciND1 | 0.394 | 0.397 | 0.390 | 0.385 | 0.413 | 0.323 | 0.317 | | 0.016 | 0.015 | 0.015 | 0.015 |
| 9. N.andropogonisND1 | 0.385 | 0.385 | 0.383 | 0.393 | 0.388 | 0.328 | 0.323 | 0.357 | | 0.015 | 0.017 | 0.016 |
| 10. P.venustaND1 | 0.368 | 0.383 | 0.370 | 0.380 | 0.363 | 0.457 | 0.409 | 0.461 | 0.449 | | 0.016 | 0.016 |
| 11. T.acaciaeND1 | 0.437 | 0.449 | 0.438 | 0.448 | 0.465 | 0.363 | 0.355 | 0.372 | 0.374 | 0.471 | | 0.015 |
| 12. T.vaporariorumND1 | 0.447 | 0.444 | 0.439 | 0.454 | 0.472 | 0.345 | 0.378 | 0.362 | 0.393 | 0.518 | 0.412 | |

p-distance matice pro gen ND2:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. D.noxiaND2 | | 0.010 | 0.010 | 0.012 | 0.013 | 0.016 | 0.016 | 0.017 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.015 |
| 2. S.graminumND2 | 0.118 | | 0.010 | 0.013 | 0.013 | 0.016 | 0.016 | 0.017 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.016 |
| 3. A.pisumND2 | 0.104 | 0.101 | | 0.013 | 0.014 | 0.015 | 0.016 | 0.017 | 0.017 | 0.016 | 0.016 | 0.016 |
| 4. D.vitifoliaeND2 | 0.185 | 0.197 | 0.195 | | 0.012 | 0.016 | 0.016 | 0.016 | 0.015 | 0.015 | 0.017 | 0.015 |
| 5. ND2 D. prelli | 0.206 | 0.215 | 0.219 | 0.179 | | 0.015 | 0.016 | 0.016 | 0.015 | 0.016 | 0.016 | 0.015 |
| 6. A.acerisND2 | 0.482 | 0.492 | 0.482 | 0.491 | 0.490 | | 0.015 | 0.015 | 0.015 | 0.015 | 0.015 | 0.015 |
| 7. A.dugesiiND2 | 0.394 | 0.389 | 0.407 | 0.401 | 0.413 | 0.429 | | 0.015 | 0.016 | 0.016 | 0.017 | 0.016 |
| 8. B.tabaciND2 | 0.496 | 0.495 | 0.508 | 0.492 | 0.491 | 0.431 | 0.444 | | 0.016 | 0.017 | 0.017 | 0.017 |
| 9. N.andropogonisND2 | 0.473 | 0.469 | 0.476 | 0.487 | 0.470 | 0.443 | 0.391 | 0.452 | | 0.017 | 0.016 | 0.017 |
| 10. P.venustaND2 | 0.497 | 0.495 | 0.493 | 0.506 | 0.488 | 0.545 | 0.510 | 0.543 | 0.534 | | 0.015 | 0.014 |
| 11. T.acaciaeND2 | 0.533 | 0.528 | 0.536 | 0.544 | 0.553 | 0.484 | 0.467 | 0.482 | 0.503 | 0.602 | | 0.016 |
| 12. T.vaporariorumND2 | 0.553 | 0.545 | 0.551 | 0.527 | 0.558 | 0.480 | 0.462 | 0.482 | 0.480 | 0.580 | 0.498 | |

p-distance matice pro gen ND3:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----------------------|-------|-------|-------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. D.noxiaND3 | | 0.016 | 0.015 | n/c | 0.003 | 0.025 | 0.024 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.026 |
| 2. S.graminumND3 | 0.106 | | 0.017 | n/c | 0.017 | 0.025 | 0.023 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.023 | 0.025 |
| 3. A.pisumND3 | 0.087 | 0.115 | | n/c | 0.015 | 0.024 | 0.024 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.026 |
| 4. D.vitifoliae ND3 | n/c | n/c | n/c | | n/c | n/c | n/c | n/c | n/c | n/c | n/c | n/c |
| 5. D.prelli ND3 | 0.003 | 0.110 | 0.083 | n/c | | 0.026 | 0.024 | 0.026 | 0.026 | 0.026 | 0.025 | 0.026 |
| 6. A.acerisND3 | 0.424 | 0.441 | 0.435 | n/c | 0.414 | | 0.026 | 0.026 | 0.026 | 0.025 | 0.024 | 0.025 |
| 7. A.dugesiiND3 | 0.375 | 0.389 | 0.367 | n/c | 0.370 | 0.427 | | 0.025 | 0.024 | 0.024 | 0.025 | 0.024 |
| 8. B.tabaciND3 | 0.410 | 0.395 | 0.424 | n/c | 0.417 | 0.376 | 0.370 | | 0.026 | 0.026 | 0.026 | 0.026 |
| 9. N.andropogonisND3 | 0.370 | 0.373 | 0.381 | n/c | 0.370 | 0.387 | 0.387 | 0.407 | | 0.024 | 0.025 | 0.025 |
| 10. P.venustaND3 | 0.458 | 0.449 | 0.444 | n/c | 0.446 | 0.476 | 0.483 | 0.536 | 0.427 | | 0.024 | 0.025 |
| 11. T.acaciaeND3 | 0.395 | 0.376 | 0.379 | n/c | 0.392 | 0.401 | 0.356 | 0.393 | 0.365 | 0.467 | | 0.026 |
| 12. T.vaporariorumND3 | 0.446 | 0.432 | 0.444 | n/c | 0.463 | 0.464 | 0.398 | 0.439 | 0.458 | 0.536 | 0.407 | |

p-distance matice pro gen ND4:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----------------------|-------|-------|-------|-------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. D.noxiaND4 | | 0.007 | 0.006 | 0.009 | n/c | 0.013 | 0.014 | 0.014 | 0.013 | 0.013 | 0.014 | 0.015 |
| 2. S.graminumND4 | 0.070 | | 0.008 | 0.009 | n/c | 0.013 | 0.014 | 0.014 | 0.012 | 0.014 | 0.013 | 0.014 |
| 3. A.pisumND4 | 0.050 | 0.075 | | 0.009 | n/c | 0.013 | 0.015 | 0.014 | 0.014 | 0.013 | 0.014 | 0.015 |
| 4. D.vitifoliaeND4 | 0.140 | 0.139 | 0.145 | | n/c | 0.013 | 0.015 | 0.014 | 0.012 | 0.014 | 0.013 | 0.014 |
| 5. D.prelli ND4 | n/c | n/c | n/c | n/c | | n/c | n/c | n/c | n/c | n/c | n/c | n/c |
| 6. A.acerisND4 | 0.449 | 0.452 | 0.449 | 0.472 | n/c | | 0.013 | 0.013 | 0.013 | 0.014 | 0.013 | 0.012 |
| 7. A.dugesiiND4 | 0.415 | 0.422 | 0.410 | 0.413 | n/c | 0.377 | | 0.014 | 0.014 | 0.014 | 0.014 | 0.013 |
| 8. B.tabaciND4 | 0.485 | 0.480 | 0.480 | 0.488 | n/c | 0.376 | 0.406 | | 0.013 | 0.014 | 0.014 | 0.014 |
| 9. N.andropogonisND4 | 0.461 | 0.460 | 0.458 | 0.473 | n/c | 0.395 | 0.387 | 0.425 | | 0.015 | 0.013 | 0.013 |
| 10. P.venustaND4 | 0.402 | 0.415 | 0.405 | 0.415 | n/c | 0.502 | 0.444 | 0.476 | 0.477 | | 0.015 | 0.014 |
| 11. T.acaciaeND4 | 0.504 | 0.516 | 0.504 | 0.519 | n/c | 0.418 | 0.414 | 0.426 | 0.436 | 0.509 | | 0.014 |
| 12. T.vaporariorumND4 | 0.525 | 0.518 | 0.526 | 0.521 | n/c | 0.447 | 0.422 | 0.435 | 0.432 | 0.514 | 0.448 | |

p-distance matice pro gen ND4L:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. D.noxiaND4L | | 0.013 | 0.015 | 0.020 | n/c | 0.028 | 0.027 | 0.028 | 0.028 | 0.028 | 0.027 | 0.028 |
| 2. S.graminumND4L | 0.052 | | 0.012 | 0.021 | n/c | 0.029 | 0.026 | 0.029 | 0.028 | 0.029 | 0.027 | 0.028 |
| 3. A.pisumND4L | 0.069 | 0.048 | | 0.020 | n/c | 0.029 | 0.027 | 0.027 | 0.028 | 0.028 | 0.028 | 0.027 |
| 4. D.vitifoliaeND4L | 0.141 | 0.158 | 0.155 | | n/c | 0.028 | 0.027 | 0.027 | 0.027 | 0.028 | 0.027 | 0.027 |
| 5. D.prelli ND4L | n/c | n/c | n/c | n/c | | n/c | n/c | n/c | n/c | n/c | n/c | n/c |
| 6. A.acerisND4L | 0.433 | 0.457 | 0.450 | 0.447 | n/c | | 0.027 | 0.029 | 0.029 | 0.030 | 0.027 | 0.028 |
| 7. A.dugesiiND4L | 0.402 | 0.412 | 0.419 | 0.426 | n/c | 0.378 | | 0.028 | 0.028 | 0.029 | 0.028 | 0.029 |
| 8. B.tabaciND4L | 0.474 | 0.481 | 0.474 | 0.474 | n/c | 0.361 | 0.425 | | 0.029 | 0.029 | 0.028 | 0.030 |
| 9. N.andropogonisND4L | 0.474 | 0.491 | 0.488 | 0.474 | n/c | 0.354 | 0.388 | 0.396 | | 0.028 | 0.028 | 0.027 |
| 10. P.venustaND4L | 0.429 | 0.432 | 0.425 | 0.421 | n/c | 0.520 | 0.487 | 0.487 | 0.538 | | 0.029 | 0.026 |
| 11. T.acaciaeND4L | 0.522 | 0.540 | 0.533 | 0.519 | n/c | 0.457 | 0.497 | 0.474 | 0.491 | 0.553 | | 0.027 |
| 12. T.vaporariorumND4L | 0.493 | 0.500 | 0.486 | 0.521 | n/c | 0.413 | 0.418 | 0.401 | 0.396 | 0.560 | 0.497 | |

p-distance matice pro gen ND5:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----------------------|-------|-------|-------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. D.noxiaND5 | | 0.006 | 0.006 | n/c | 0.017 | 0.012 | 0.012 | 0.012 | 0.012 | 0.014 | 0.012 | 0.013 |
| 2. S.graminumND5 | 0.057 | | 0.006 | n/c | 0.016 | 0.012 | 0.012 | 0.012 | 0.012 | 0.014 | 0.012 | 0.012 |
| 3. A.pisumND5 | 0.061 | 0.068 | | n/c | 0.017 | 0.013 | 0.013 | 0.012 | 0.012 | 0.014 | 0.012 | 0.012 |
| 4. D.VITIFOLIAE nd5 | n/c | n/c | n/c | | n/c | n/c | n/c | n/c | n/c | n/c | n/c | n/c |
| 5. D. prelli ND5 | 0.135 | 0.145 | 0.137 | n/c | | 0.024 | 0.025 | 0.023 | 0.024 | 0.024 | 0.025 | 0.024 |
| 6. A.acerisND5 | 0.474 | 0.476 | 0.474 | n/c | 0.395 | | 0.013 | 0.013 | 0.012 | 0.012 | 0.012 | 0.012 |
| 7. A.dugesiiND5 | 0.419 | 0.429 | 0.419 | n/c | 0.383 | 0.378 | | 0.012 | 0.011 | 0.013 | 0.012 | 0.012 |
| 8. B.tabaciND5 | 0.494 | 0.495 | 0.494 | n/c | 0.418 | 0.402 | 0.405 | | 0.012 | 0.012 | 0.011 | 0.012 |
| 9. N.andropogonisND5 | 0.479 | 0.485 | 0.473 | n/c | 0.439 | 0.394 | 0.378 | 0.391 | | 0.012 | 0.012 | 0.012 |
| 10. P.venustaND5 | 0.414 | 0.410 | 0.411 | n/c | 0.368 | 0.521 | 0.475 | 0.520 | 0.506 | | 0.012 | 0.012 |
| 11. T.acaciaeND5 | 0.522 | 0.522 | 0.525 | n/c | 0.427 | 0.403 | 0.402 | 0.421 | 0.425 | 0.544 | | 0.012 |
| 12. T.vaporariorumND5 | 0.532 | 0.534 | 0.527 | n/c | 0.457 | 0.445 | 0.415 | 0.449 | 0.440 | 0.541 | 0.441 | |

p-distance matice pro gen ND6:

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1. <i>D. noxia</i> ND6 | | 0.016 | 0.014 | 0.018 | 0.020 | 0.024 | 0.024 | 0.023 | 0.023 | 0.023 | 0.024 | 0.026 |
| 2. <i>S. graminum</i> ND6 | 0.167 | | 0.014 | 0.018 | 0.019 | 0.024 | 0.024 | 0.024 | 0.023 | 0.023 | 0.025 | 0.026 |
| 3. <i>A. pisum</i> ND6 | 0.114 | 0.121 | | 0.019 | 0.020 | 0.024 | 0.024 | 0.023 | 0.023 | 0.023 | 0.023 | 0.026 |
| 4. <i>D. vitifoliae</i> ND6 | 0.217 | 0.256 | 0.228 | | 0.018 | 0.024 | 0.024 | 0.023 | 0.023 | 0.022 | 0.022 | 0.025 |
| 5. ND6 <i>D. prelli</i> kus | 0.245 | 0.226 | 0.243 | 0.174 | | 0.025 | 0.024 | 0.024 | 0.024 | 0.024 | 0.023 | 0.027 |
| 6. <i>A. aceris</i> ND6 | 0.475 | 0.528 | 0.502 | 0.463 | 0.491 | | 0.022 | 0.022 | 0.022 | 0.023 | 0.022 | 0.025 |
| 7. <i>A. dugesii</i> ND6 | 0.456 | 0.458 | 0.475 | 0.436 | 0.432 | 0.367 | | 0.023 | 0.022 | 0.024 | 0.023 | 0.025 |
| 8. <i>B. tabaci</i> ND6 | 0.526 | 0.524 | 0.540 | 0.526 | 0.521 | 0.399 | 0.400 | | 0.024 | 0.024 | 0.023 | 0.025 |
| 9. <i>N. andropogonis</i> ND6 | 0.472 | 0.498 | 0.488 | 0.479 | 0.459 | 0.399 | 0.369 | 0.424 | | 0.023 | 0.023 | 0.024 |
| 10. <i>P. venusta</i> ND6 | 0.497 | 0.486 | 0.488 | 0.528 | 0.495 | 0.579 | 0.525 | 0.546 | 0.541 | | 0.024 | 0.024 |
| 11. <i>T. acaciae</i> ND6 | 0.507 | 0.523 | 0.516 | 0.516 | 0.531 | 0.381 | 0.421 | 0.414 | 0.435 | 0.579 | | 0.025 |
| 12. <i>T. vaporariorum</i> ND6 | 0.566 | 0.548 | 0.566 | 0.571 | 0.570 | 0.491 | 0.505 | 0.510 | 0.509 | 0.614 | 0.515 | |