

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Charakteristika mitochondriálního genomu
mšice *Drepanosiphum platanoidis*
(Aphididae)

Bakalářská práce

Monika Šťacková

Vedoucí práce: PaedDr. Martina Žurovcová, PhD.

České Budějovice 2015

Bakalářská práce:

Štacková, M., 2015. Charakteristika mitochondriálního genomu mšice *Drepanosiphum platanoidis* (Aphididae). [Characteristics of the mitochondrial genome of the aphid *Drepanosiphum platanoidis* (Aphididae). Bc. Thesis, in Czech.] – 41 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

My research was aimed at mitochondrial genome of the aphid *Drepanosiphum platanoidis*. Almost entire mitochondrial genome of this aphid was sequenced and annotated. Due to the high AT content, the part consisting of 300 bp was not obtained. The mitogenome was compared to the set of closest aphid species. The nucleotide composition and the order of genes matches the related species. There was not found gene translocation within the compared set of related species. Phylogenetic tree was constructed with use of the protein coding genes. Position of *D. platanoidis* is in accordance to the assumption to be an ancestral species.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou 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 bakalářské 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, dne 9. 12. 2015

.....

Ráda bych poděkovala své školitelce PaedDr. Martině Žurovcové, Ph.D. za odborné vedení při práci v laboratoři i následném zpracování. RNDr. Petru Starému DrSc. za sběr a určení vzorků. Dále pak celému kolektivu naší laboratoře za podporu ve chvílích, kdy se nedařilo, jmenovitě hlavně M. Flegrové a M. Raškové, které mi byly oporou i po mém odchodu z laboratoře. Nesmím opomenout ani Pavlínu Kočovou, která mi byla velkou psychickou oporou při sepisování celé práce. Děkuji zkrátka všem přátelům a kolegům, kteří jakkoliv přispěli k tomu, abych svou práci mohla dokončit. Hlavní dík potom patří rodině (obzvláště mé mamce) a přáteli, lidem, kteří mě podporují po celou dobu mého studia.

Obsah

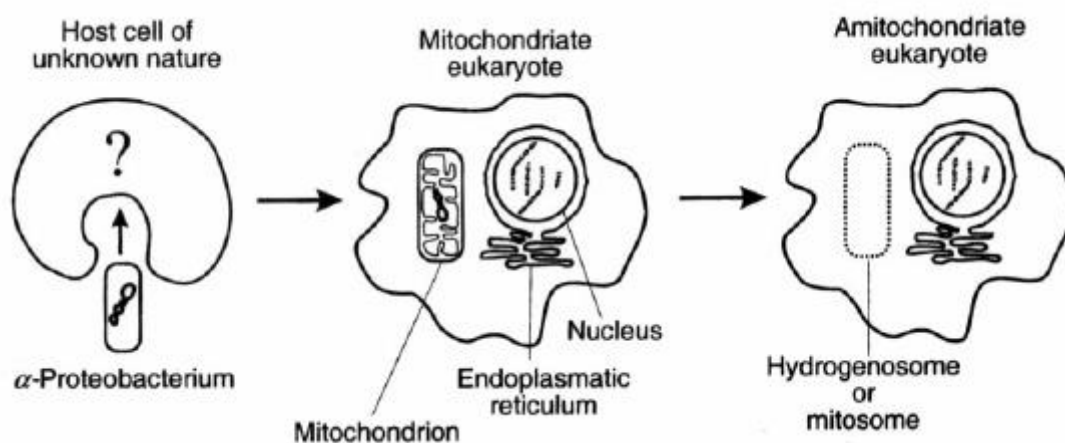
1. Úvod	1
1.1 Mitochondrie: charakteristika, vznik, evoluce	1
1.2 Mitogenomika	3
1.3 Aphididae	4
1.3.1 Fylogenetika, doposud publikované mitogenomy	5
1.3.2 Charakteristika mšice <i>Drepanosiphum platanoidis</i>	7
2. Cíle práce	9
3. Metody	10
3.1 Materiál	10
3.2 Izolace DNA	11
3.3 PCR amplifikace	11
3.3.1 Reakční směs	13
3.3.2 PCR profily pro amplifikaci jednotlivých fragmentů	14
3.4 Gelová elektroforéza	16
3.5 Přečišťování PCR produktu	17
3.6 Sekvenační reakce	17
3.7 Vyhodnocení a zpracování sekvencí	17
4. Výsledky	19
4.1 Mitochondriální genom <i>Drepanosiphum platanoidis</i>	19
4.1.1 Charakteristika mitochondriálního genomu <i>Drepanosiphum platanoidis</i>	19
4.1.2 Geny kódující proteiny	21
4.1.3 tRNA	22
4.1.4 rRNA a nekódující oblasti (AT-control region, repeats region)	25
4.2 Mezidruhové srovnání mitochondriálních genomů vybraných druhů	26
4.2.1 Srovnání velikosti mitogenomů a jejich nukleotidového složení	27
4.2.2 Fylogenetická rekonstrukce	28
5. Diskuze	29
5.1 PCR amplifikace	29
5.2 Sekvenační reakce	30
5.3 Charakteristika mitochondriálního genomu <i>Drepanosiphum platanoidis</i>	30
5.4 Geny kódující proteiny	30
5.5 tRNA	31
5.6 rRNA a nekódující oblasti (AT-control region, repeats region)	31
5.7 Srovnání mitochondriálních genomů vybraných druhů	32
5.8 Fylogenetická rekonstrukce	32

6. Závěr	33
7. Seznam použitých zdrojů	34
8. Seznam tabulek	38
9. Seznam použitých zkratek	39
10. Přílohy.....	40

1. Úvod

1.1 Mitochondrie: charakteristika, vznik, evoluce

Mitochondrie je buněčná organela, v níž dochází k procesu aerobního dýchání vedoucímu k tvorbě ATP. Jde tedy o energii produkující organelu, jakousi „buněčnou elektrárnu“. Obecně uznávaným modelem vzniku mitochondrie je endosymbiotická teorie. Ta říká, že mitochondrie byla původně samostatně žijící α -proteobakterie, která byla pohlcena předkem dnešních eukaryotních buněk (Lang et al., 2004). Nedošlo však k její degradaci jako cizího tělesa, proto zůstala s buňkou v symbióze, viz obrázek 1.



Obrázek 1: Endosymbiotická teorie vzniku mitochondrie (Lang et al., 2004).

To je také důvodem, proč mají mitochondrie 2 membrány, vlastní DNA i ribozomy, na nichž uskutečňují transkripci a translaci. Membrány vytvářejí dva oddělené prostory – vnitřní matrix a vnější mezimembránový prostor. Vnější membrána je propustná pro většinu molekul včetně malých proteinů, vnitřní udržuje specifický obsah matrix – je nepropustná pro ionty a většinu malých molekul, transport do matrix zajišťují membránové transportní proteiny (Alberts, 2001).

Původ mitochondrie je jasně zřetelný v mitochondriálním genomu bazálních (tzv. „minimally derived“) eukaryot, jako například bičíkovce *Reclinomonas americana*. Fylogenetické analýzy prokázaly, že mitochondrie se vyvinula z α -proteobakterií pouze jednou. Vypadá to, že současný nejbližší žijící příbuzný mitochondrie patří mezi Rickettsiae.

U některých eukaryot může mitochondrie chybět, jedná se však o druhotný jev. V tomto případě po mitochondrii často zůstávají reliktní organely jako hydrogenosomy nebo mitosomy (Lang et al., 2004). Tyto organely jsou souhrnně označovány jako MRO („mitochondrion related organelles“) nebo MLO („mitochondrion-like organelles“), vyskytují se např. u anaerobních organismů. Tato označení se používají navzdory tomu, že funkce organel se v jednotlivých druzích mohou lišit (Makiuchi et al., 2014).

Mitochondrie živočichů jsou obvykle kruhové (Raimond et al., 1999) a poměrně malé, jejich velikost se pohybuje v rozmezí 14–17 kbp (Lang et al., 2004). Mitogenomy větší nebo dokonce lineární se vyskytují výjimečně (Raimond et al., 1999). V samotné mitochondrii zůstalo genů poměrně málo, protože většina původních bakteriálních genů se přenesla do buněčného jádra. Aby mitochondrie mohla fungovat, je velká většina mitochondriálních proteinů, včetně těch, které jsou potřebné k tvorbě mRNA a všech enzymů cyklu kyseliny citronové, produkována geny z jádra a musí být do mitochondrií přenášena z cytosolu, kde tyto látky vznikají (Alberts, 2001). Mitochondrie tedy mají jen následující geny: geny kódující velkou a malou podjednotku ribozomální RNA (16S (*rrnS*), 12S (*rrnL*)), 13 genů kódujících proteiny (3 podjednotky cytochrom oxidázy: *cox1*, *cox2*, *cox3*; 2 podjednotky ATP: *atp6* a *atp8*; 7 podjednotek NADH dehydrogenázy: *nad1*, *nad2*, *nad3*, *nad4*, *nad4L*, *nad5*, *nad6*; cytochrom b: *cytB* a až 22 genů kódujících tRNA (Lang et al., 2004).

Mitochondriální DNA je přítomna u široké škály organismů (u jednobuněčných eukaryot může druhotně chybět, viz výše), je jí poměrně velké množství a snadno se izoluje. Má také maternální a nerekombinující dědičnosti, a proto byla prvním molekulárním markerem, používaným v populační genetice a evolučních studiích (Awise, 1987).

V roce 1989 byla v práci T. D. Kochera ověřena možnost využití pro fylogenetickou rekonstrukci. Byla zpracována část mitogenomu u celkem 100 různých živočichů. Fylogenetický strom vytvořený na základě sekvence *cytB* byl porovnán s fylogenetickým stromem vytvořeným na základě vnějších fylogenetických znaků. Tyto dva stromy obsahovaly totožnou fylogenetickou informaci (Kocher et al., 1989).

1.2 Mitogenomika

Mitogenomika je věda zabývající se studiem kompletních mitochondriálních genomů. Mitochondriální genomy různých druhů se mohou lišit pořadím genů nebo množstvím tandemových repetit. Lze je tedy použít ke komparativní analýze a poté i aplikovat na evoluční genetiku, populační genetiku a fylogeografii i fylogenezi.

Využití v rámci evoluční genetiky najdeme např. v práci S. Castellana (2011), jde o detekci role mutací a selekce v mitochondriálních genech kódujících protein.

Práce A. Tachera et al. (2012) se naopak zabývala populační genetikou a fylogeografií sledů obecných a souvislostmi s prostředím, ve kterém žijí, jako např. salinita vody nebo teplota. V některých genech byla prokázána pozitivní selekce, nicméně korelace mezi genetickou diverzitou a faktory prostředí byla slabá.

Pro fylogenezi v rámci hmyzu byly mitogenomy využity např. v práci zabývající se fylogenetickou analýzou kmene Arthropoda (Cook et al. 2005). Tato práce byla zaměřena na vztah mezi podkmeny korýšů (Crustacea), šestinohých (Hexapoda), stonožkovců (Miriapoda) a klepítkačů (Chelicerata). Autoři testovali dřívější hypotézu, že mezi podkmeny korýšů a šestinohých je úzký fylogenetický vztah, zároveň bylo řečeno, že šestinozí by mohly být parafyletická skupina. Byly osekvenovány kompletní nebo téměř kompletní mitogenomy 3 korýšů (*Parhyale hawaiiensis*, *Squilla mantis* a *Triops longicaudatus*), dvou chvostoskoků (Collembola) spadajících do podkmenu šestinozí (*Onychiurus orientalis* a *Podura aquatica*) a rybenky skleníkové (*Thermobia domestica*). Byly zjištěny přesuny tRNA u *O. orientalis*, *P. aquatica* and *P. hawaiiensis*. Nicméně jen přesun u *O. orientalis* se ukázal být fylogeneticky informativní. Z různých molekulárně fylogenetických analýz vyplývá stejný výsledek, korýši a šestinozí jsou vzájemně parafyletické skupiny. Třídy korýšů rakovci (Malacostraca) a lupenonožci (Branchiopoda) jsou pravděpodobně sesterská skupina hmyzu (Insecta). A chvostoskoci se seskupují s třídou korýšů Maxillopoda (bez českého ekvivalentu). Ačkoliv statistické testy nevyvrátily nulovou hypotézu o monofylii šestinohých (Hexapoda) ani korýšů (Crustacea), autoři se přiklánějí k názoru, že tyto skupiny jsou vzájemně parafyletické.

Stejnou problematikou se o 3 roky později zabývala práce A. Carapelli et al. (2007). Práce porovnávala 100 kompletních nebo téměř kompletních mitogenomů. Objevuje se zde termín Pancrustacea, což je skupina zahrnující korýše a šestinohé (Crustacea a Hexapoda). Fylogenetická rekonstrukce byla provedena na základě 13 genů kódujících proteiny

a potvrzuje parafyletické postavení mezi podkmeny: šestinozí (Hexapoda) a korýši (Crustacea).

V roce 2014 se tentýž autor se svými kolegy zaměřil na další fylogenetickou rekonstrukci v rámci kmene členovců, konkrétně *Folsomotoma octooculata* (Collembola). Práce je zacílena na fylogenetickou rekonstrukci vnitřních vztahů v taxonu Collembola na základě současně dostupných mitogenomů. Přesto, že se v práci podařilo rozšířit fylogenetickou strukturu taxonu, autor zmiňuje, že jsou stále jisté nejasnosti, kterým je potřeba se věnovat (Carapelli et al., 2014).

Ačkoli se počet osekvenovaných mitogenomů hmyzu od roku 2005 zvýšil přibližně desetkrát, většina těchto mitogenomů spadá pod Arthropoda (Cameron et al., 2014). V databázi MetAmiga (<http://amiga.cbmeg.unicamp.br/>) je v současné době publikováno celkem 1 197 mitogenomů hmyzu, z toho 118 mitogenomů jedinců řádu polokřídlí (Hemiptera), avšak jen 12 z nich jsou mitogenomy zástupců podřádu mšicosaví (Sternorrhyncha), oproti tomu celých 71 mitogenomů zástupců podřádu plošnice (Heteroptera). Pravděpodobně je to způsobeno tím, že mšičí mitogenomy jsou velmi AT bohaté a jejich sekvenování je proto problematické. Není proto výjimkou, že mitogenom je publikován nekompletní (viz tabulka 1).

1.3 Aphididae

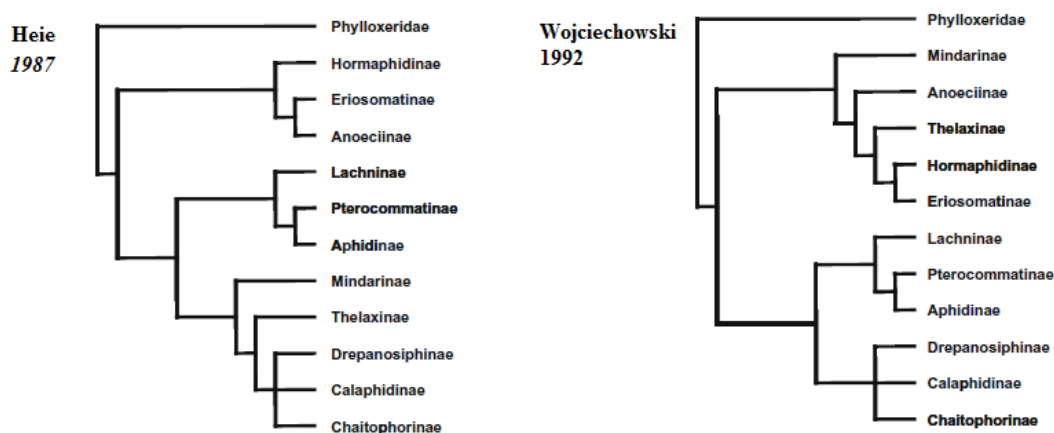
Čeď mšicovití (Aphididae) tvoří monofyletickou větev v řádu polokřídlí (Hemiptera), podřádu mšicosaví (Sternorrhyncha). Tato čeď zahrnuje 4 000 druhů mšic. Jde o malé jedince s měkkým tělem a bodavě sacím ústrojím (Dixon, 1998). Sají z rostlinných pletiv, čímž rostlinu poškozují a mohou tak i přenášet virová onemocnění. Organismy této skupiny se rozmnožují jak sexuálně tak asexuálně. V některých, popřípadě ve všech generacích, se vyskytují parthenogeneticky se rozmnožující samice, které jsou živorodé a nevyžadují oplození, což vede k rychlé expanzi (Dixon, 1998).

1.3.1 Fylogenetika, doposud publikované mitogenomy

První komplexní fylogenetická rekonstrukce Aphididae založená na mtDNA byla publikována v roce 2000 (von Dohlen et al.) a byla zde použita ribosomální DNA (částečně 12S a 16S). Práce potvrdila dřívější morfologické studie s výjimkou 2 skupin – Aphidinae a Lachnidae, které byly monofyletické. Bylo odhadnuto, že po období přesouvání z nahosemenných hostitelů na krytosemenné následovala velká radiace na úrovni tribů. Tomu odpovídají i fosilní záznamy, které ukazují na přítomnost několika podčeledí v pozdní křídě, ale většina kmenů vznikla do období mladších třetihor (von Dohlen et al., 2000).

Práce týkající se podřádu Sternorrhyncha, do kterého patří i námi zvolená *Drepanosiphum platanoidis*, poprvé vyšla v roce 2004 (Thao et al., 2004). Byla zaměřena na 6 druhů molic (Aleyrodoidea), 1 druh mery (Psylloidea) a 1 druh mšice (Aphidoidea). Zjistilo se, že u molic může docházet k přesunu úseků kódujících *cox3*, *tRNAgly*, *nad3*, *tRNAala*, *tRNAarg*, *tRNAasn* a to do 4 různých míst mitogenomu.

Téhož roku byla publikována i fylogenetická práce s využitím opsinu, kde byla nastíněna fylogeneze na základě morfologických znaků od dvou různých autorů (obrázek 2). První z těchto rekonstrukcí byla publikována již v roce 1987 (Heie, cit. dle Ortiz–Rivas et al., 2004) a následně ji potvrdily některé fylogenetické práce na základě DNA symbionta Buchnera, ověřující a podporující jejich koevoluci. V roce 1992 přišel ale Wojciechowski s alternativní hypotézou. Vedly ho k tomu různé interpretace homologie některých morfologických znaků (Wojciechowski 1992, cit. dle Ortiz–Rivas et al., 2004). Ve výsledcích vyvracela Heieho (1987) fylogenetickou rekonstrukci a naopak se přikláněla k výsledkům práce Wojciechovského (1992) (Ortiz–Rivas et al., 2004).



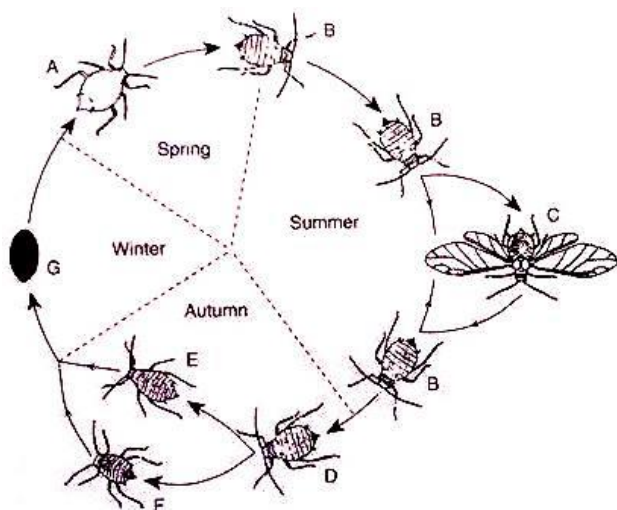
Obrázek 2: Fylogenetické rekonstrukce Aphididae na základě morfologických znaků od dvou různých autorů. Převzato Ortiz–Rivas et al. (2004).

V roce 2010 byla stejným autorem publikována práce založená na kombinaci dvou jaderných genových sekvencí a mitochondriální DNA (geny kódující podjednotku 6 u F-ATPázy a podjednotku II cytochrome oxidázy), která potvrdila výsledky seskupování podčeledí ve 3 hlavních liniích, publikované již v práci z roku 2004. Linie byly pojmenovány A + D (podčeledi Aphidinae, Calaphidinae, Chaitophorinae, Drepanosiphinae a Pterocommatinae), E + T (podčeledi Anoeciinae, Eriosomatinae, Hormaphidinae, Mindarinae a Thelaxinae) a L (podčeleď Lachninae) (Ortiz-Rivas et al., 2010).

Ve všech výše uvedených pracích byly využívány pro analýzy jen části mitochondriálního genomu. V posledních letech se už i u mšic začínají pro srovnávání používat celé mitogenomy (mitogenomika). Například v roce 2013 vyšla studie porovnávající mitogenomy celkem pěti mšic (*Cavariella salicicola*, *Acyrtosiphon pisum*, *Schizaphis graminum*, *Aphis glycines* a *Pterocomma pilosum*). Byly porovnány pro mšice typické repetitivní oblasti, detekovány přesuny některých sekvencí kódujících tRNA, u *Acyrtosiphon pisum* a *Schizaphis graminum*. U *Cavariella salicicola* a *Acyrtosiphon pisum* byly detekovány tandemové repetice (Wang et al., 2013). V roce 2014 byl stejným autorem publikován kompletní mitochondriální genom *Cervaphis quercus*, bylo porováno celkem 6 mitogenomů (*Cervaphis quercus*, *Drosophila yakuba*, *Cavariella salicicola*, *Diuraphis noxia*, *Schizaphis graminum* a *Acyrtosiphon pisum*). U *Cervaphis quercus* nebyl zjištěn žádný přesun tRNA kódující sekvence ani tandemové repetice, viz obrázek 9 (Wang et al., 2014). Téhož roku byl publikován i kompletní mitogenom *Diuraphis noxia* (Zhang et al., 2014).

1.3.2 Charakteristika mšice *Drepanosiphum platanoidis*

Drepanosiphum platanoidis (stromovnice javorová) se řadí do podčeledi Drepanosiphinae. Reprezentuje mezi svými příbuznými izolovanou skupinu. Jde o druh vázaný na hostitelský druh javor klen (*Acer pseudoplatanus*) a ostatní druhy tohoto rodu. V životním cyklu dochází ke střídání pohlavních a nepohlavních generací, jak je vidět na obrázku 3. Vajíčka jsou kladena na podzim ovipárními samičkami na větve, do trhlin v kůře poškozených částí stromu. Přečkají zimu a na jaře se z nich líhne tzv. fundatrix generace, jejíž potomstvo se množí parthenogeneticky a obsahuje jen okřídlené jedince. Tito jedinci se dále rozmnožují během května a června a dávají vzniknout typickým koloniím na spodních stranách listů napadených stromů. Od července do začátku srpna mohou být pozorováni v typických agregacích, které sestávají z okřídlených dospělých jedinců. Tento jev se nazývá reprodukční diapauza. Po diapauze následuje období, kdy se rozpadá uskupení a jedinci se šíří jednotlivě. Na konci srpna dochází k dalšímu rozmnožování. Od začátku podzimu můžeme najít i parthenogeneticky se rozmnožující jedince. Sexuálně vzniklí potomci se objevují od druhé poloviny podzimu, samice jsou neokřídlené a kladou vajíčka. Jak dochází k opadu listů, značná část těchto jedinců spadne s nimi a populace se proto redukuje, neboť je tímto vyloučena z další reprodukce – nemůže naklásť přezimující vajíčka na kůru stromů. Nicméně velká část populace ovipárních jedinců se z listů přesouvá na větve a kůru, kde samičky hledají vhodné místo k naklazení vajíček. Vajíčka přezimují a cyklus tak pokračuje (Starý, 1970).



Obrázek 3: Životní cyklus aphididae, A: Fundatrix generace, B: potomci fundatrix generace, C: parthenogeneticky vzniklí okřídlení jedinci, D: sexuální generace, E: ovipární nebo pářící se samice F: samec G: vajíčko (Dixon, 1998, upraveno).

Tento organismus byl zvolen na základě toho, že dosud byl zpracován jen z hlediska isozymů v rámci populační genetiky. Práce byla zaměřena na populačně genetickou strukturu v rámci jižní Británie (Wynne et al., 1994). Mezi další práce, v kterých byla zahrnuta podčeleď Drepanosiphinae patří práce O. Rivas et al. (2010), která naznačovala, že skupina je fylogeneticky starší, než Aphidinae. V roce 2013 byla navíc publikována další práce na základě symbionta Buchnera (Nováková et al., 2013), která tento výsledek potvrdila.

2. Cíle práce

- Získání kompletní sekvence mitochondriálního genomu druhu *Drepanosiphum platanoidis*.
- Porovnáním získané sekvence s údaji v adekvátních databázích objasnit její postavení a fylogenetické vztahy s příbuznými druhy v rámci podřádu Sternorrhyncha.

3. Metody

3.1 Materiál

Pro práci byly použity mšice *Drepanosiphum platanoidis*, které byly nasbírány a určeny RNDr. Petrem Starým DrSc. v Českých Budějovicích. Sběr byl proveden ze stromu *Acer pseudoplatanus* v dubnu 2014. Po morfologické determinaci byly až do dalšího zpracování uchovány v absolutním etanolu. Pro komparativní analýzu pak byly použity sekvence příbuzných druhů z databáze Genbank (tabulka 1). Vybrány byly především druhy s kompletním mitogenomem, neúplný je jen u jednoho druhu z čeledi Aphididae (*Pterocomma pilosum*) a také u druhu zvoleného jako „outgroup“ z čeledi Phylloxeridae (*Daktulosphaira vitifoliae*).

Tabulka 1: Druhy vybrané pro komparativní analýzu, jejich referenční číslo v databázi Genbank.

Čeľad'	Tribus/Rod	Druh	Část sekvence	Genbank
Aphididae	Macrosiphini	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	kompletní genom	FJ411411.1
Aphididae	Macrosiphini	<i>Sitobion avenae</i>	kompletní genom	KJ742384.1
Aphididae	Macrosiphini	<i>Diuraphis noxia</i>	kompletní genom	KF636758.1
Aphididae	Macrosiphini	<i>Cavariella salicicola</i>	kompletní genom	KC332935.1
Aphididae	Aphidini	<i>Schizaphis graminum</i>	kompletní genom	AY531391.1
Aphididae	Aphidini	<i>Aphis gossypii</i>	kompletní genom	KJ669654.1
Aphididae	Pterocomma	<i>Pterocomma pilosum</i>	částečný genom	KC840676.1
Greenideidae	Cervaphis	<i>Cervaphis quercus</i>	kompletní genom	KF254841.1
Phylloxeridae	Daktulosphaira	<i>Daktulosphaira vitifoliae</i>	částečný genom	DQ021446.1

Všechny níže uvedené laboratorní metody byly prováděny s použitím aerosolových špiček a sterilních zkumavek, aby se zabránilo možné kontaminaci vzorků cizorodou DNA.

3.2 Izolace DNA

DNA byla izolována pomocí komerčního kitu (GeneJET Genomic DNA Purification Kit) podle návodu výrobce. Vzorky byly uloženy v etanolu a z toho důvodu byly před samotnou extrakcí ponechány na filtračním papíru při pokojové teplotě do doby, než se etanol odpařil. Na extrakci byli použiti vždy 4 jedinci, což odpovídalo minimálnímu množství materiálu uváděného výrobcem kitu. Závěrečná eluce byla proto provedena do objemu 50 µl. Následně bylo provedeno kontrolní PCR pro potvrzení úspěšnosti izolace a to konkrétně primery LCO1490-L a HCO2198-L, jejichž sekvence je uvedena v tabulce 2.

3.3 PCR amplifikace

Pro amplifikaci jednotlivých úseků byly nejdříve použity tzv. univerzální primery převzaté z práce Simons et al. (1994, 2014) a následně i specifické primery navržené z již osekvenovaných úseků *Drepanosiphum platanoidis*, tedy metoda tzv. „primer walking“. Přehled použitých primerů, které vedly k úspěšné amplifikaci, je uveden v tabulce 2. Primery navržené dle Simons et al. (1994) jsou označeny indexem 1, specifické primery označené indexem 2 navrhovala M. Žurovcová a primery označené indexem 3 navrhovala M. Šťacková. Primery, s nimiž amplifikace nebyla úspěšná, jsou uvedeny tabulce 10 (příloha 1).

Tabulka 2: Seznam použitých primerů, jejich sekvence a směr.

Název primeru	Sekvence primeru 5' → 3'	F/R
CB-J11335 ¹	CATATTCAACCAGAATGATA	F
LR-N-12866 ¹	ACATGATCTGAGTTCAAACCGG	R
TK-J-3790 ¹	CATTAGATGACTGAAAGCAAGTA	F
C3-N-5460 ¹	TCAACAAAGTGTCAGTATCA	R
C3-N-4908 ¹	CGAGTTAYATCTCGTCATCATTG	R
C1-J2756 ¹	ACATTCTTTCCTCAACATTT	F
C2-N3665 ¹	CCACAAATTTCTGAACATTG	R
LR-J_13342 ¹	CCTTCGCACAGTCAAATACTGC	F
SR-N-14745b ¹	CCAGCAGYYGCGGTTATAC	R
Dpf 3826 ³	CAGGATTCATGGAATACATG	F
N5-N-7793 ¹	TTAGGTTGRGATGGNYTAGG	R
N4-J-8944 ¹	GGAGCTTCAACATGAGCTTT	F
Dpr 9879 ³	CAGGTTGTATTCCAATTCAAG	R
Dpf 10942 ³	CCTTTACGTAATTGAATATAACC	F
DrSArFor ²	AATAAATAAATCCCCAACACG	F
DrSBfRev ²	TCAATATGAGCGATTTAAGGC	R
Aphid15983 ²	TAATAGGGTATCTAATCCTAG	F
AphidOrig ²	TATCAAAGTAATCCTTTTTTCAGGC	R
LCO1490-L ¹	GGTCWACWAATCATAAAGATATTGG	F
HCO2198-L ¹	TAAACTTCWGGRTGWCCAAARAATCA	R
Dr_realRFor ³	ACGCTCCAAGAAATTGTATGT	F
DrBCRev ³	CGTGGAAATGATATGTCAGG	R
DrBCFor ³	TTAGCAGGTGCTATTACCAT	F
DrJfRev ³	CTAAAAGTTGAGATTATTGAACC	R
SBfFor ³	CTAAGCTAACAATTCAAATACC	F
4fRev ³	CTCCATTAGCATGGAAAGAT	R
JrFor ³	ATGAACAATTCCAAGATTAGCAA	F
DfRev ³	GGCATAGCTAATGTTATTGAGAA	R

Pozn.: 1 univerzální primery (Simons et. al 1994), 2 specifické primery (M. Žurovcová), 3 specifické primery (M. Štacková), F= + řetězec, R= - řetězec.

3.3.1 Reakční směs

Pro amplifikaci byly používány následující polymerázové systémy: Taq DNA polymeráza UNIS (Top-Bio s. r. o.) + 10x pufr, TaKaRa Ex Taq + 10x pufr (TaKaRa Bio, Inc.), PrimeSTAR GXL DNA polymeráza + 5x pufr (TaKaRa Bio, Inc.), Taq DNA polymeráza byla používána standardně a následující 2 polymerázy byly použity jen na úseky, které se pomocí této polymerázy nepodařilo amplifikovat. Šlo většinou o AT bohaté oblasti. Ex Taq polymeráza má na rozdíl od klasické Taq polymerázy ještě funkci kontrolního čtení a oprav špatně přiřazených bazí (tzv. proof-reading aktivitu) a umožňuje amplifikovat delší úseky. PrimeSTAR GXL umožňuje amplifikovat produkty, které jinými enzymy amplifikovat nelze (např. kvůli sekundárním strukturám, délce úseku nebo velkému rozdílu v ideální teplotě anealingu použitých primerů), minimalizuje optimalizační nároky a svým složením zlepšuje specifitu a citlivost PCR (popis výrobce, upraveno). Reakční směs na jednu reakci měla vždy objem 12,5 μ l a byla míchána na ledu do 200 μ l zkumavek. Složení reakční směsi pro jednotlivé polymerázy je uvedeno v tabulce 3.

Tabulka 3: Poměr reakčních směsí pro jednotlivé polymerázy (množství na jeden vzorek).

Polymeráza	ddH₂O [μ l]	Pufr [μ l]	dNTPs [μ l]	Primer F/R [μ l]	Templátová DNA [μ l]	Polymeráz a [μ l]
Taq DNA polymeráza UNIS (5 U/ μ l)	7,25	1,25	1	0,75	1	0,1
TaKaRa Ex Taq (5 U/ μ l)	7,25	1,25	1	0,75	1	0,1
GXL (1.25 U/ μ l)	6,25	2,5	1	0,75	1	0,5

3.3.2 PCR profily pro amplifikaci jednotlivých fragmentů

Amplifikace probíhaly na přístroji BIOER termocycler (GenePro), v případě použití teplotního gradientu potom na přístroji Mastertermocycler (Eppendorf). Standardní PCR profil obsahoval následující kroky: predenaturace 94°C, 1 min, 35 cyklů (denaturace 94°C, 30s, anealing 49°C – 57°C, 45s – 1min, elongace 68°C, 45s – 2min), reakci ukončila postelongace 72°C, 2 min. Následně bylo nastaveno chlazení na 4°C až do vypnutí termocykléru a dalšího zpracování, aby se zamezilo znehodnocení vzorků v případě, že by nebyly okamžitě po ukončení amplifikace vyjmuty.

Teplota elongace byla standardně nastavena na 68°C, což vycházelo z práce na mitochondriálním genomu *Diuraphis noxia* (Chundelová, 2012), ve které byly rovněž použity univerzální primery dle Simons et al. (1994, 2006). Důvodem je velmi vysoký obsah AT bazí, v takovém případě snížená teplota zvyšuje pravděpodobnost úspěšné amplifikace.

V případě, že se nedařila amplifikace úseků při elongaci o teplotě 68°C, byla teplota elongace v cyklicky se opakujících krocích snížena na 60°C. PCR profily, při nichž proběhla amplifikace úspěšně, jsou uvedeny v tabulce 4.

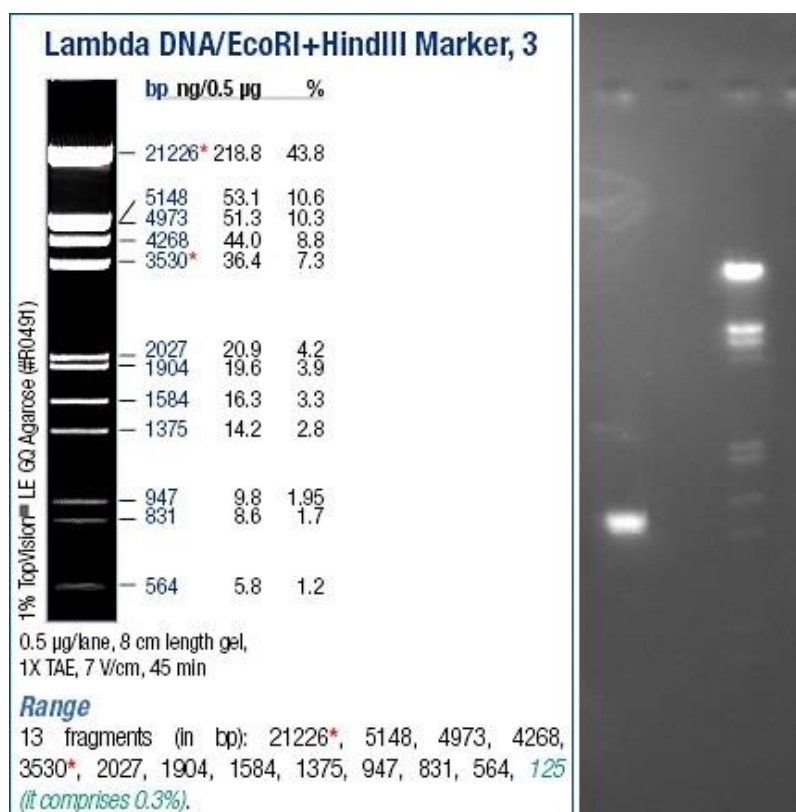
Tabulka 4: Přehled profilů při nichž byla amplifikace úspěšná.

Úsek	Primery	Annealing		Elongace		Polymeráza
		teplota [°C]	čas [s]	teplota [°C]	čas [s]	
C	CB-J11335	50	60	60	120	UNIS
	LR-N-12866					
D	TK-J-3790	50	60	60	120	UNIS
	C3-N-5460					
Dpf	TK-J-3790	57	60	60	120	Ex taq
	C3-N-4908					
J	C1-J2756	49	60	60	120	UNIS
	C2-N3665					
L	LR-J-13342	55	60	60	120	UNIS
	SR-N-14745b					
SA	Dpf 3826	51	60	68	120	Ex taq
	N5-N-7793					
SB	N4-J-8944	53	60	68	120	GXL
	Dpr 9879					
SC	Dpf 10942	49	60	68	120	UNIS
	SR-N-14745b					
3	DrSArFor	53	60	68	120	UNIS
	DrSBfRev					
4	Aphid15983	49	60	68	120	UNIS
	AphidOrig					
BC	LCO1490-L	55	45	72	45	UNIS
	HCO2198-L					
6	Dr_realRFor	55,8	60	68	120	UNIS
	DrBCRev					
7	DrBCFor	53	60	68	120	UNIS
	DrJfRev					
8	SBfFor	53,6	60	68	120	UNIS
	4fRev					
9	JrFor	53,6	60	68	120	UNIS
	DfRev					

3.4 Gelová elektroforéza

Po dokončené PCR byla její úspěšnost ověřena pomocí elektroforetické separace produktů. 1,5% gel byl připraven rozpuštěním 3g agarózy v 200ml 1xTAE pufru (zásobní roztok 50x TAE pufr se skládá z: 121g TRIS; 28,55 ml kyseliny octové; 50 ml EDTA, pH 8,0; 421,45ml H₂O) a rozpuštěním v mikrovlnné troubě. Takto připravený gel byl zchlazen na teplotu cca 50°C. Připravený gel byl následně nalit do formy s hřebínky a ponechán při pokojové teplotě přibližně 20 minut, dokud neztlhl.

Elektroforéza probíhala na tomto gelu při napětí 120V a pokojové teplotě 45 minut. Pro určení množství a velikosti produktu byl na gel nanesen velikostní marker Lambda DNA/EcoRI + Hind III (FERMENTAS). Rozdělený PCR produkt byl vizualizován na UVP transiluminátoru a výsledek byl zdokumentován digitální UVP kamerou (obrázek 4).



Obrázek 4: Ukázka výsledku gelu po agarózové elektroforéze. Vlevo je vidět Lambda DNA/EcoRI + Hind III, vpravo je fotografie gelu s úspěšně amplifikovaným úsekem "C" (cca 1400 bp), negativním kontrolním vzorkem a tímto velikostním markerem.

3.5 Přečišťování PCR produktu

Produkt byl po ověření úspěšné amplifikace pomocí elektroforézy enzymaticky přečištěn, čímž došlo k odstranění přesahujících jednořetězců DNA a volných nukleotidů.

Ke vzorku bylo přidáno 1 μl Fast AP (Alkaline Phosphatase, 1U/ μl , Thermo Scientific) a 0,5 μl Exo I (Exonuclease I, 20U/ μl Thermo Scientific). Takto namíchaná reakce byla vložena do termocykléru na následující profil: 37°C, 30 min, 80°C, 15 minut.

3.6 Sekvenační reakce

Po přečištění byly vzorky odeslány na sekvenaci do firmy Seqme, s. r. o. Směs pro sekvenační reakci byla namíchána na ledu do 600 μl zkumavek podle návodu Seqme a to v závislosti na množství získaného produktu a jeho velikosti, jak je uvedeno v tabulce 5.

Tabulka 5: Příprava produktu k sekvenování (Seqme.cz).

Templát		Primer	Celkový objem
PCR produkt < 500 bp	50 ng	5 μl 5 μM roztoku primeru	10 μl
PCR produkt 500-1000	100ng		
PCR produkt > 1000 bp	200ng		

3.7 Vyhodnocení a zpracování sekvencí

Získané sekvence byly otevírány v programu BioEdit Sequence Alignment editor (verze 7.2.5). Následně byly zkontrolovány nástrojem BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), čímž byla vyloučena amplifikace jiného genetického materiálu a potvrzena příslušnost k mitochondriálnímu genomu Aphididae.

Takto ověřené sekvence byly dále spojeny do kontinuální sekvence v programu SeqManII (programový balík DNASTAR ver. 4.0; DNASTAR, Inc.), pro určení pozice byl zpočátku k alignmentu používán genom příbuzné mšice *Cervaphis quercus* (Genbank referenční číslo KF254841.1).

Kompletní sekvence byla dále předběžně anotována pomocí programu Mitos (<http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/>), následně byly pozice detekovaných genů kódujících

proteiny ještě ověřeny porovnáním s příslušnými částmi mitogenomů příbuzných druhů, viz tabulka 1.

Pozice tRNA byly ověřeny nástrojem tRNA SCAN (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) a to s následujícím nastavením: Search mode: tRNAscan only, source: Mito/Chloroplast, Cove score cutoff: 5, eufindtRNA search parameters: default. Kruhová molekula mitogenomu byla vizualizována pomocí nástroje GenomeVx (<http://wolfe.ucd.ie/GenomeVx/>).

Dále byly prováděny analýzy v programu Mega 6 (Tamura et al., 2013). Konkrétně šlo o seřazení a porovnání PCG, vytvoření fylogenetického stromu, a porovnání obsahu jednotlivých nukleotidů napříč druhy vybranými pro srovnání. Pro fylogenetické analýzy byly využity metody Neighbor–Joining a Maximum Likelihood na základě nejvhodnějších evolučních modelů. Nastavení bylo následující: Neighbor–Joining: Tamura–Nei, Gamma Distributed, Bootstrap 1000x, Maximum Likelihood: GTR+G+I, Bootstrap 1000x. Nekódující sekvence „control region“ byla zpracována v internetové („online“) aplikaci Tandem repeats finder (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>).

4. Výsledky

V této práci bylo osekvenováno celkem 14 888 bazí mitochondriálního genomu *Drepanosiphum platanoidis*. Následné analýzy byly prováděny ve srovnání s mitogenomy zástupců podřádu Sternorrhyncha dostupnými v databázi Genbank. Šlo celkem o 9 jedinců z čeledí Aphididae, Greenideidae a Phylloxeridae, uvedených v tabulce 1.

Byly prováděny analýzy na kódujících sekvencích i na celém dosud osekvenovaném genomu. Analýzy měly pomoci objasnit fylogenetické vztahy a také složení genomu, které mohlo vysvětlit určité problémy, nastalé během laboratorní části práce.

4.1 Mitochondriální genom *Drepanosiphum platanoidis*

Pro osekvenování byla použita PCR amplifikace a následně metoda „primer walking“.

Pomocí primerů uvedených v tabulce 2 byly amplifikovány úseky o velikosti 500–2400 bp, které byly osekvenovány. Podmínky amplifikace jednotlivých úseků jsou uvedeny v tabulce 4. Produkty větších délek byly sekvenovány v obou směrech, tzn. ve směru 5'–3' i ve směru 3'–5', aby došlo k prosekvenování celého úseku. V programu SeqManII (programový balík DNASTAR ver. 4.0; DNASTAR, Inc.) byla vytvořena celková kontinuální sekvence.

4.1.1 Charakteristika mitochondriálního genomu *Drepanosiphum platanoidis*

Velikost osekvenované části mitochondriálního genomu je 14 888 bp, předpokládaná velikost úseku, který se nepodařilo amplifikovat je přibližně 300 bp (obrázek 5), celková velikost mitogenomu je tedy odhadována přibližně na 15,2 kbp.

4.1.2 Geny kódující proteiny

Bylo osekvenováno celkem 10 genů kódujících proteiny (PCG). Ačkoliv při anotaci programu MitoS (<http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de>) bylo detekováno všech 13 genů kódujících proteiny, při následném seřazení podle čtecího rámce a porovnáním s příbuznými druhy bylo zjištěno, že oblast *nad5* byla detekována na nesprávném místě a sekvence je dobře čitelná jen zčásti – zhruba jedna polovina. Z oblasti *nad4L* byla taktéž správně detekována přibližně poloviční délka sekvence než u ostatních srovnávaných sekvencí.

Porovnání pozic detekovaných programem MitoS se skutečnými pozicemi na základě srovnání s referenčními sekvencemi příbuzných druhů je uvedeno v tabulce 6. U úseků označených * šlo o hůře čitelnou sekvenci, kdy po překladu do proteinů byly některé části nečitelné, u *nad4* šlo konkrétně o úsek mezi pozicemi 8349–8910. U zbylých dvou úseků byly po překladu jasně čitelné jen úseky 9269–9368 (*nad4L*) a 7675–9082 (*nad5*).

Tabulka 6: Geny kódující proteiny, srovnání detekce pozic z programu MitoS a skutečných pozic na základě srovnání s příbuznými druhy.

PCG	Začátek (MitoS)	Konec (MitoS)	Řetězec	Začátek (srovnání)	Konec (srovnání)
<i>nad2</i>	288	1160	+	267	1244
<i>cox1</i>	1457	2968	+	1445	2991
<i>cox2</i>	3067	3714	+	3055	3726
<i>atp8</i>	3874	4008	+	3883	4034
<i>atp6</i>	4022	4666	+	4016	4668
<i>cox3</i>	4702	5457	+	4675	5460
<i>nad3</i>	5529	5870	+	5523	5876
<i>nad5</i> *	6565	7575	-	7675	**
<i>nad4</i> *	7766	8938	-	7758	9082
<i>nad4l</i> *	9088	9243	-	9269**	**
<i>nad6</i>	9511	9987	+	9508	9998
<i>cob</i>	10020	11078	+	9999	11114
<i>nad1</i>	11212	12114	-	11197	12129

Pozn.: * geny, jejichž pozici se srovnáním nepodařilo ověřit, ** nebylo možno přesně detekovat pozici

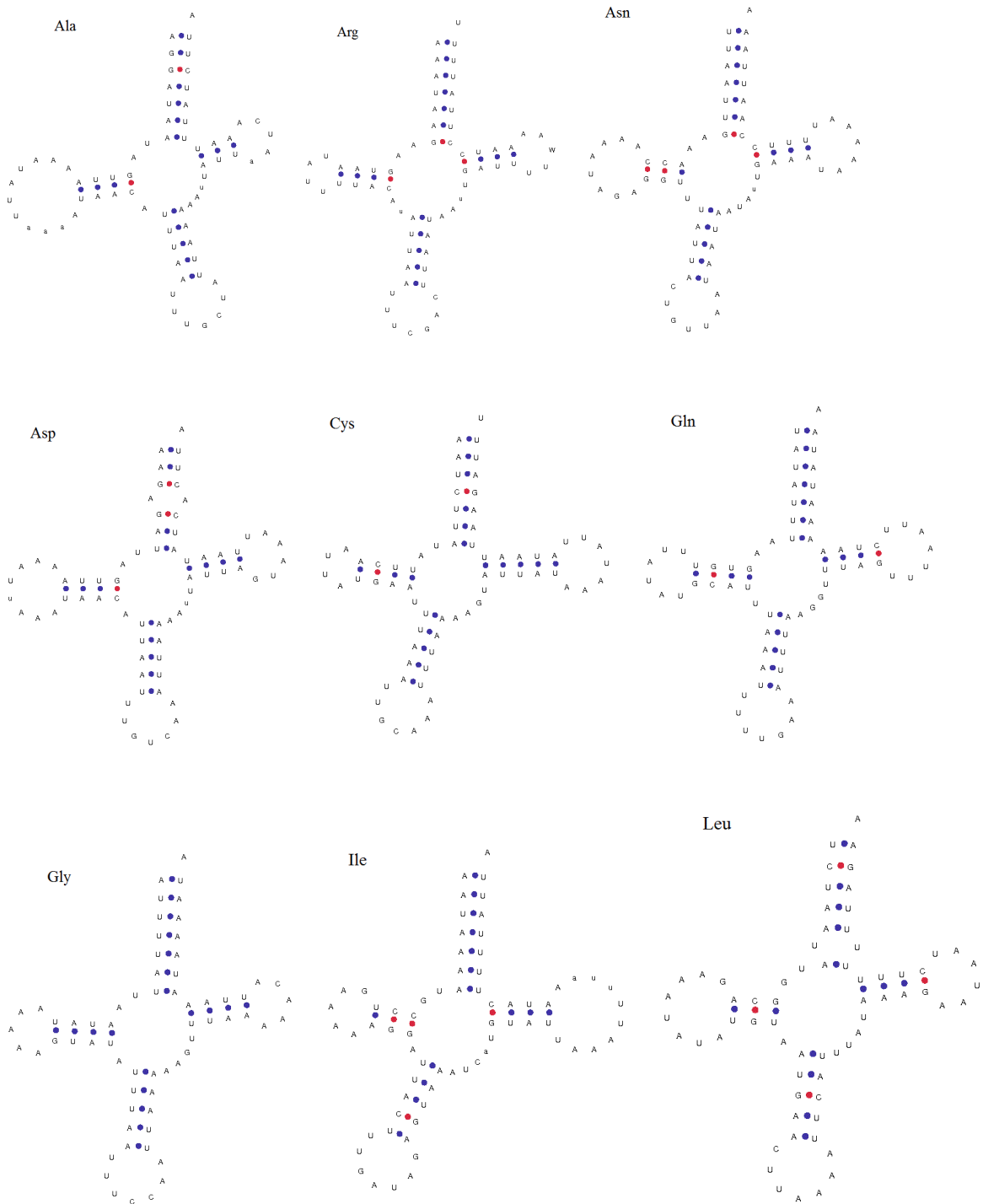
4.1.3 tRNA

Získaná sekvence byla analyzována pomocí nástroje MitoS (<http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de>), kde byly detekovány sekvence celkem 19 tRNA (tabulka 7). Nebyly detekovány sekvence pro 3 tRNA (*Glu*, *Phe*, *His*). Následně byla tato analýza ještě ověřena „online“ nástrojem tRNA-SCAN, kde byla také vizualizována typická trojlístková struktura jednotlivých tRNA (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>).

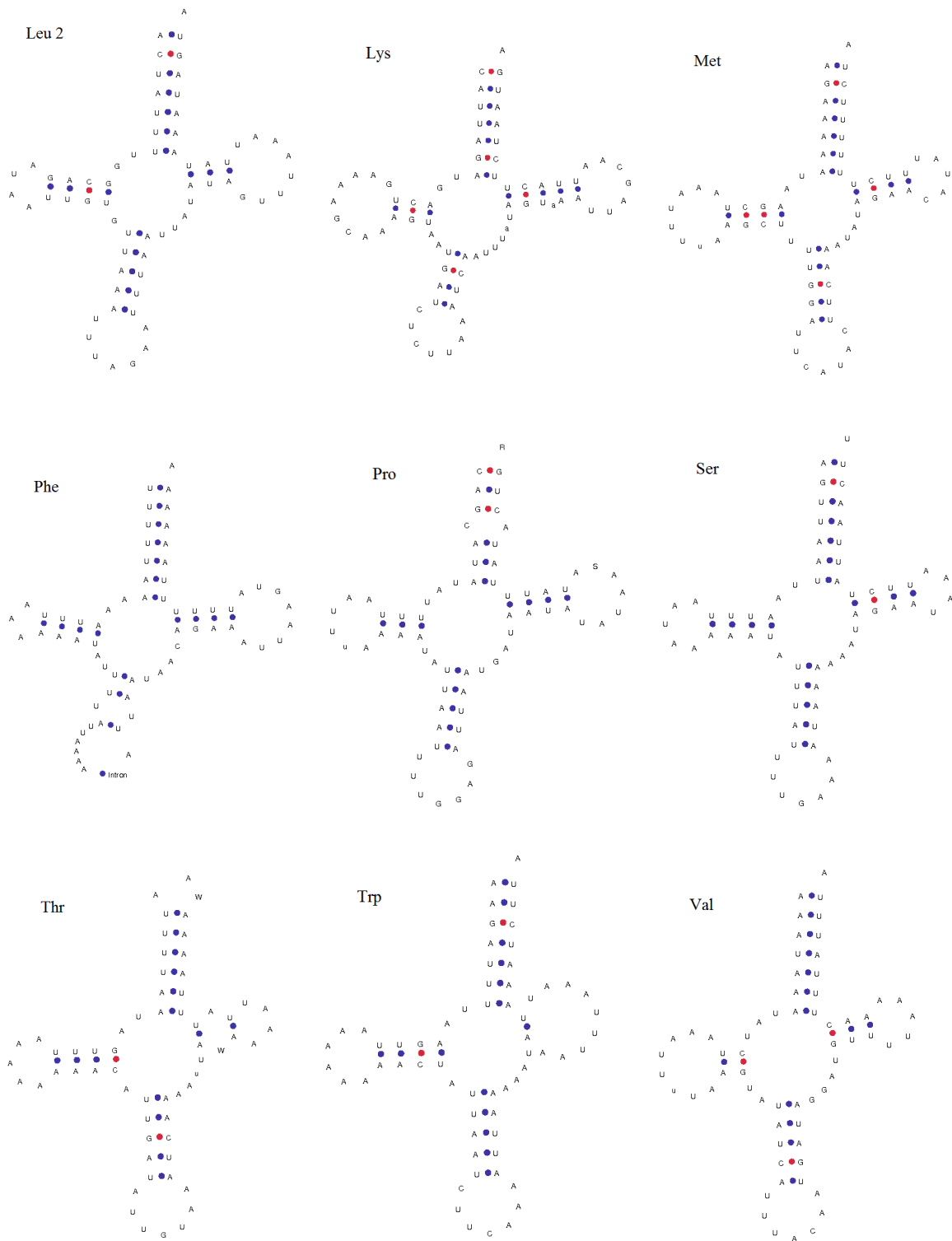
V této analýze se potvrdila nepřítomnost předchozích 3 sekvencí, navíc zde ale nebyla detekována oblast kódující tRNA (*Ser2*), proto byla tato sekvence následně porovnána s odpovídajícím úsekem u příbuzných druhů. Potvrdilo se, že sekvence skutečně neodpovídá.

Tabulka 7: Přehled pozic jednotlivých sekvencí kódujících tRNA.

tRNA	Antikodon	Začátek	Konec	Řetězec	Délka úseku
<i>tRNA (Ile)</i>	GAT	1	69	+	69
<i>tRNA (Gln)</i>	TTG	71	138	-	68
<i>tRNA (Met)</i>	CAT	196	263	+	68
<i>tRNA (Trp)</i>	TCA	1247	1310	+	64
<i>tRNA (Cys)</i>	GCA	1303	1370	-	68
<i>tRNA (Tyr)</i>	GTA	1381	1446	-	66
<i>tRNA (Leu1)</i>	TAA	2988	3054	+	67
<i>tRNA (Lys)</i>	CTT	3731	3803	+	73
<i>tRNA (Asp)</i>	GTC	3805	3873	+	69
<i>tRNA (Gly)</i>	TCC	5461	5525	+	65
<i>tRNA (Ala)</i>	TGC	5879	5947	+	69
<i>tRNA (Arg)</i>	TCG	5956	6020	+	65
<i>tRNA (Asn)</i>	GTT	6020	6088	+	69
<i>tRNA (Thr)</i>	TGT	9370	9431	+	62
<i>tRNA (Pro)</i>	TGG	9439	9506	-	68
<i>tRNA (Ser2)</i>	TGA	11119	11182	+	64
<i>tRNA (Leu2)</i>	TAG	12136	12200	-	65
<i>tRNA (Val)</i>	TAC	13488	13551	-	64



Obrázek 7a: „Trojlístková“ struktura tRNA vytvořená v programu tRNAscan-SE (Lowe et al., 1997).



Obrázek 7b: „Trojlístková“ struktura tRNA vytvořená v programu tRNAscan-SE (Lowe et al., 1997).

4.1.4 rRNA a nekódující oblasti (AT-control region, repeats region)

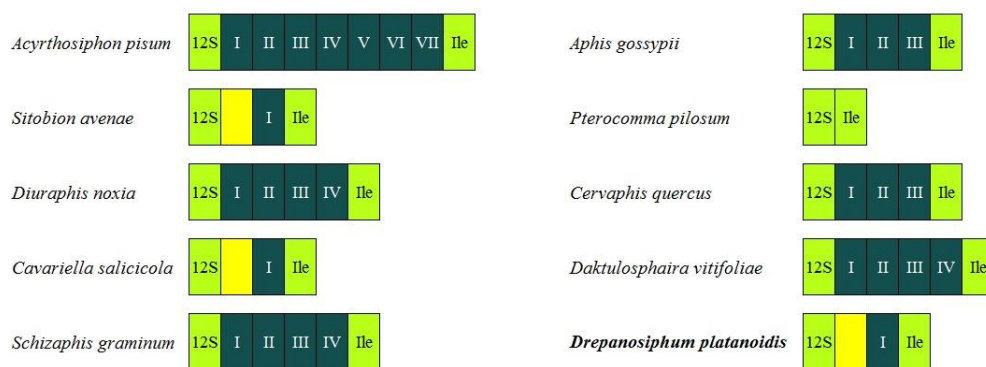
V sekvenci se vyskytují dvě rRNA na – řetězci a to v pořadí *rrnL* (16S) v délce 638 nukleotidů a *rrnS* (12S) v délce 758 nukleotidů. Pozice těchto dvou úseků je znázorněna na obrázcích 6 a 7a, b.

Nekódující „repeats“ oblast se bohužel nepodařilo lokalizovat. Oblast „control region“ je velmi AT bohatá, procentuální zastoupení bazí A a T je 85%, konkrétní zastoupení jednotlivých bazí je uvedeno v tabulce 8.

Tabulka 8: Procentuální zastoupení jednotlivých nukleotidů v sekvenci control region.

Nukleotid	T (U)	C	A	G
Zastoupení	41%	9%	44%	5%

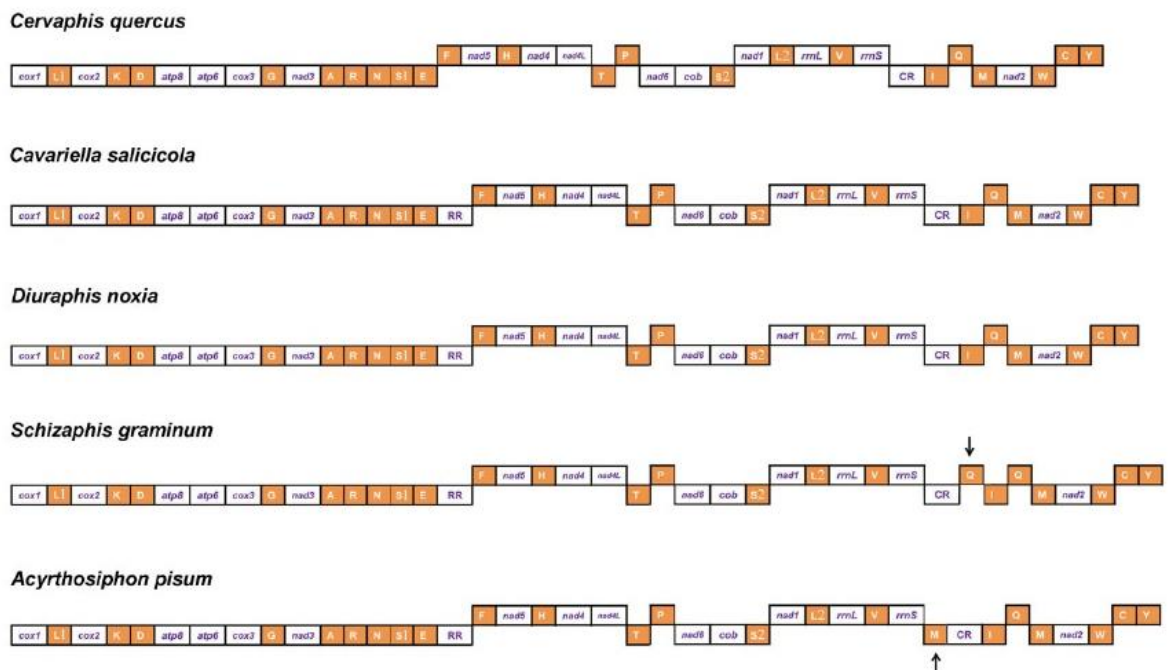
Úsek zahrnující „control region“ se nachází mezi *rrnS* a *tRNA(Ile)*, jeho délka je 581 bp. Celková sekvence této oblasti je uvedena v příloze 3. Programem Tandem Repeats Finder (<http://tandem.bu.edu/trf/trf.html>) se v tomto úseku podařilo lokalizovat jednu repetici o délce 19 bp, která se v sekvenci opakuje celkem třikrát, jak je vyznačeno v příloze 3. Následně byla v tomto programu analyzována stejná oblast u příbuzných druhů (tabulka 1). Srovnání počtu repetic v této oblasti u jednotlivých druhů je vizualizováno na obrázku 8.



Obrázek 8: Repetice v oblasti control region u porovnávaných druhů Sternorrhyncha, římské číslice značí jednotlivé repetice, žluté pole značí sekvenci před repeticemi, zeleně jsou označeny okolní části sekvence (12S = rRNA kódující malou podjednotku ribozomů, *Ile* = tRNA (*Ile*))

4.2 Mezi druhové srovnání mitochondriálních genomů vybraných druhů

Pořadí jednotlivých sekvencí se neliší od klasického uspořádání. Nedošlo k žádnému posunu, jak tomu bylo např. u *A. pisum* nebo *S. graminum* v práci Wang et al. (2014), viz obrázek 9. Nicméně podle velikosti úseku, který se nepodařilo amplifikovat (cca 300 bp), lze usuzovat, že u *D. platanoidis* bude chybět repetitivní oblast před *tRNA (Phe)*, stejně jako tomu bylo u *C. quercus* (obrázek 9, Wang et. al. 2014).



Obrázek 9: Porovnání struktury 5 mšičích genomů, šipkami vyznačené přesuny tRNA (podle Zhang et al., 2014).

4.2.1 Srovnání velikosti mitogenomů a jejich nukleotidového složení

Velikost mitogenomů vybraných zástupců Sternorrhyncha se pohybuje od 15 180 bp do 16 969 bp. Nejmenší mitogenom má *S. avenae*, největší *A. pisum*.

Mitogenom *D. platanoidis* svou velikostí pravděpodobně bude nejvíce přibližovat *C. salicicola*, viz tabulka 9.

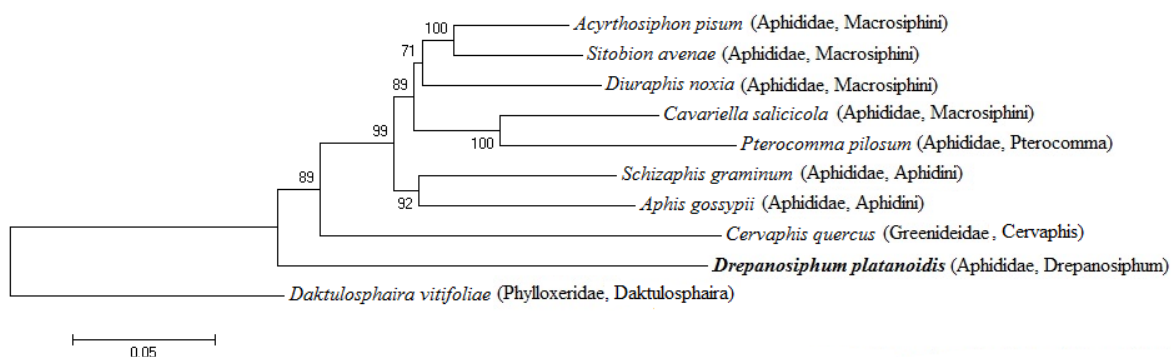
Tabulka 9: Podíl jednotlivých bazí v mitogenomech jedinců podřádu Sternorrhyncha a celková velikost mitogenomů. Mitogenom, kterým se zabývá tato práce, je vyznačen tučně.

Zástupce	Zastoupení jednotlivých bazí (%)				velikost mitogenomu (bp)
	T(U)	C	A	G	
<i>D. platanoidis</i>	38,7	10,4	44,9	6,0	dosud získáno 14 888
<i>Aphis gossypii</i>	38,3	10,4	45,4	5,9	15 869
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	38,3	9,8	46,4	5,5	16 969
<i>Cervaphis quercus</i>	38,9	9,3	45,9	5,9	15 272
<i>Cavariella salicicola</i>	38,5	10,4	45,4	5,7	16 317
<i>Diuraphis noxia</i>	39,0	9,6	45,7	5,7	15 784
<i>Daktulosphaira vitifoliae</i>	40,0	9,8	44,0	6,2	dosud publikováno 12 349
<i>Pterocomma pilosum</i>	39,0	11,4	43,3	6,3	dosud publikováno 12 529
<i>Sitobion avenae</i>	38,5	10,0	45,8	5,8	15 180
<i>Schizaphis graminum</i>	39,2	10,1	44,8	6,0	15 721

Všechny porovnávané mitogenomy jsou AT bohaté. Průměr obsahu A a T bazí dosahuje 84%.

4.2.2 Fylogenetická rekonstrukce

Fylogenetický strom byl vytvořen v programu Mega 6 (Tamura et al., 2013) na základě 9 genů kódujících proteiny. Nebylo možné použít všech 13 PCG a to z důvodu, že se nepodařilo plně osekvenovat oblasti *nad5*, *nad4* a *nad4L*. Dále nebyla použita sekvence kódující *cox3*, jež chyběla u *Daktulosphaira vitifoliae*, která byla použita jako „outgroup“. Rekonstrukce byly provedena metodami: Neighbor–Joining a Maximum Likelihood, výsledné dendrogramy jsou na obrázcích 10 a 11 (příloha 2).



Obrázek 10: Fylogenetická rekonstrukce vybraných druhů *Sternorrhyncha* (Neighbor–joining: Tamura–Nei, Gamma Distributed, Bootstrap 1000x, „outgroup“ *Daktulosphaira vitifoliae*).

Obě fylogenetické rekonstrukce se shodují. *Drepanosiphum platanoidis* byla dle očekávání zařazena mimo skupinu Aphidinae.

5. Diskuze

Mitogenomy hmyzu jsou velice bohaté na nukleotidy A a T (Zhang et al. 1997). Tímto jevem byly ovlivněny všechny pracovní postupy, včetně PCR amplifikace a následné sekvenační reakce.

5.1 PCR amplifikace

Během práce v laboratoři byly vyzkoušeny celkem 3 různé typy polymeráz. Pro první reakci daného úseku byla vždy použita Taq DNA polymeráza UNIS. Jedná se o standardně používanou polymerázu, která nemá tzv. proof-reading aktivitu. Pokud se úsek nedařilo amplifikovat polymerázou Taq DNA UNIS, byly testovány ještě následující polymerázy:

1. Ex Taq polymeráza, která má navíc „proof-reading“ aktivitu a umožnila proto amplifikovat úseky, které polymeráza Taq DNA UNIS nedokázala amplifikovat vůbec, nebo jen slabě.
2. PrimeSTAR GXL DNA, která minimalizuje optimalizační nároky reakce a je schopná lépe překonat sekundární struktury nebo zde typicky polyA úseky. Konkrétně napomohla amplifikovat sekvenci za problematickou AT bohatou částí genomu zvýrazněnou na obrázku 6.

V počátcích byly v rámci optimalizace PCR testovány reakce s přidáním BSA (Bovine Serum Albumin) pro stabilizaci reakce. Neukázalo se však, že by BSA mělo zásadní vliv na zlepšení průběhu PCR amplifikace, proto již nebylo dále využíváno.

Primery pro PCR reakci byly používány nejdříve tzv. univerzální – převzaté z prací Simon et al. (1994, 2006). Těmito univerzálními primery se podařilo naamplifikovat přibližně polovinu ze všech celkově amplifikovaných úseků. Ne všechny mnou vybrané primery bylo možné použít, z důvodu výrazně se lišících vypočítaných teplot anealingu mezi těmito páry. Proto byly z již získaných osekvenovaných úseků navrženy specifické primery. Tyto primery byly navrhovány tak, aby mohly být využity po jednotlivých dvojicích. V případě, že 2 amplifikované úseky byly od sebe natolik vzdálené, že nebylo možné navrhnout 2 specifické primery tak, aby délka úseku nepřesáhla 2kbp, byl použit jeden primer univerzální a druhý specifický. Úspěšnost specifických primerů při amplifikaci byla téměř 100%.

5.2 Sekvenační reakce

Ačkoli byla sekvenační reakce vždy namíchána podle návodu výrobce, ne vždy byla získána dobře čitelná sekvence, neboť AT bohaté úseky jsou problematické i co se týče sekvenování. Sekvence obsahující hodně stejných bazí na jednom místě (zde typicky A) může způsobit sklouzávání sekvenázy a také nepřesnosti ve čtené sekvenci. Dokonce může dojít i k úplnému přerušení sekvenování.

5.3 Charakteristika mitochondriálního genomu *Drepanosiphum platanoidis*

V této práci se podařilo osekvenovat celkem 14 888 bp, z předpokládaných cca 15 200 bp mitochondriálního genomu *Drepanosiphum platanoidis*, mšice podřádu Sternorrhyncha. Práce si kladla za cíl osekvenovat celý tento genom a porovnáním získané sekvence s údaji v adekvátních databázích objasnit postavení a fylogenetické vztahy příbuzných čeledí v rámci tohoto podřádu. Pro analýzy byly vybrány čeledi Greenideidae, Phylloxeridae a Aphididae (podčeledi Macrosiphini, Aphidiny a Pterocomma), dostupných v databázi Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Ačkoli v databázi MetAmiga (<http://amiga.cbmeg.unicamp.br/>) je publikováno celkem 12 kompletních mitogenomů podřádu Sternorrhyncha, jde převážně o škůdce hospodářských rostlin a ostatní druhy jsou zde opomíjeny, byť jsou často fylogeneticky starší. Kompletní mitogenom podčeledi Drepanosiphinae zde také chybí.

Přesto, že byly testovány celkem 3 polymerázy, se bohužel nepodařilo uspokojivě osekvenovat část úseku, kde podle srovnávacích jedinců předpokládáme oblast bohatou na nukleotidy A a T a jejich případné repetice. Jde o typický problém způsobený vysokým obsahem A a T bazí v mšičích mitogomech, jak dokládají i další neúplné sekvence publikované v databázi Genbank (*Pterocomma pilosum*, *Daktulosphaira vitifoliae*).

5.4 Geny kódující proteiny

Většina genů odpovídá svým pořadím i překladem do proteinů příbuzným druhům. Pouze pozice sekvencí *nad5*, *nad4*, *nad4L* se podařilo detekovat programem MitoS, nikoliv však ověřit při srovnání se sekvencemi vybraných druhů. Překlad do proteinů byl však nejasný,

s vybranými druhy souhlasila jen část sekvence. Geny pro *nad4* a *nad5* by bylo nutné rozdělit na několik částí, které by se navzájem částečně překrývaly. Proto bude nutné tuto oblast znovu amplifikovat a sekvenovat, abychom získali čitelnější sekvence.

5.5 tRNA

Nepodařilo se detekovat sekvence celkem 4 tRNA (*Glu, Phe, Ser, His*). Při první analýze byla tato chybějící tRNA (*Ser*) programem MitoS určena na předpokládaném místě (viz obrázek 7a, b). Bohužel jde o část genomu, u kterého nemáme 100% čitelnou sekvenci a srovnáním s ostatními druhy proto nemohla být tato pozice potvrzena. Taktéž tRNA, které nebyly detekovány vůbec, by se měly, podle srovnání s ostatními mitogenomy, vyskytovat v této oblasti. Typická trojlístková struktura odpovídá ostatním druhům, nebyly nalezeny žádné anomálie, proto nepředpokládáme výskyt mutací.

5.6 rRNA a nekódující oblasti (AT–control region, repeats region)

Obě jednotky rRNA se vyskytují na předpokládaném místě, viz obrázek 5. Velká podjednotka (16S rRNA) se nachází za tRNA kódující leucin, následuje část kódující valin a poté malá podjednotka rRNA (12S).

Nekódující „repeats“ oblast se bohužel nepodařilo lokalizovat, s největší pravděpodobností u tohoto druhu úplně chybí – jako tomu je u *C. quercus*, viz obrázek 4. Teoreticky by se mohla vyskytovat v oblasti, kterou se nepodařilo amplifikovat, případně v části sekvence, která není 100% čitelná.

Vzhledem k nejasnostem souvisejícím se špatně čitelnou a chybějící částí sekvence, nelze s jistotou říci, zda se v genomu nachází nekódující (repetitivní) oblast, či nikoli. Teoreticky by se mohla nacházet v oblasti, kterou se nepodařilo amplifikovat, případně v části sekvence, která není 100% čitelná. Nicméně dle velikosti genomu a srovnání s nejbližším příbuzným na základě fylogenetické analýzy v této práci – *C. quercus* je odhadováno, že repetitivní oblast zde zcela chybí. Stejně jako u již zmiňovaného *C. quercus*. Bude potřeba vyzkoušet další metody, jako například zaklonování jednoho z úseků, který se podařilo amplifikovat jen slabě. Tato metoda již jednou vyzkoušena byla, ovšem s negativním výsledkem. Bohužel již nebylo možné z časových důvodů klonování zopakovat.

Délka úseku zahrnujícího „control region“ je 581 bp, což se nejvíce blíží *C. quercus*, u něhož je tato oblast velká 657 bp, podobnou velikost má i *D. noxia*. Naopak *C. salicicola* (1 137 bp) a *A. pisum* (1 336 bp) mají velikost tohoto úseku přibližně dvojnásobnou (Wang et al., 2014).

Ze srovnání s vybranými druhy vyplynulo, že počtem repetitiv odpovídá *D. platanoidis* druhům *C. salicicola* a *S. Avenae*, nikoliv však vzorem těchto úseků. *C. salicicola* má vzor o velikosti 109 bp, *S. avenae* jen 21 bp, *D. platanoidis* 19 bp. Toto srovnání je vizualizováno na obrázku 8.

5.7 Srovnání mitochondriálních genomů vybraných druhů

Ze srovnání s ostatními druhy vyplynulo, že mitogenomy všech jedinců jsou velmi bohaté na A a T báze. To je také důvodem, proč byla amplifikace části genomu neúspěšná. Ačkoli v osekvenované části genomu *Drepanosiphum platanoidis* pravděpodobně chybí druhá oblast repetitiv, stejně jako u *Cervaphis quercus* (Wang et al. 2014), je procentuální obsah A a T srovnatelný s ostatními mitogenomy. Vzhledem k tomu, že část genomu chybí a část je nejasná, jak je již zmíněno výše, není zatím možné s jistotou říci, zda nedošlo k posunům některých sekvencí. S velkou pravděpodobností bude ale pořadí jednotlivých genů odpovídat *Cervaphis quercus*, jak vyplývá i z fylogenetického srovnání, kdy jsou si tyto dva druhy poměrně blízké.

5.8 Fylogenetická rekonstrukce

Z fylogenetické rekonstrukce vyplynulo, že *Drepanosiphum platanoidis* je fylogeneticky starší, než ostatní aphididae vybrané pro srovnání. To odpovídá zařazení Drepanosiphinae v práci Ortiz–Rivas et al. (2010) i fylogenetické rekonstrukci na základě symbionta Buchnera (Nováková et al., 2013). Naopak je v rozporu s původní fylogenetickou teorií na základě morfologických znaků (Heie, cit. dle Ortiz–Rivas et al., 2004).

6. Závěr

Podařilo se osekvenovat převážně celý mitochondriální genom mšice *Drepanosiphum platanoidis*. Bylo identifikováno 13 genů kódujících proteiny, z toho 10 úplných a 3 částečné, 2 geny kódující malou a velkou podjednotku rRNA a 18 tRNA. Pořadí genů, které se podařilo lokalizovat, se shoduje se zjištěným pořadím genů příbuzných druhů *Cervaphis quercus*, *Cavariella salicicola*, *Diuraphis noxia*, *Sitobion avenae*, *Aphis gossypii*, *Pterocomma pilosum* a *Daktulosphaira vitifoliae*. Fylogenetickou analýzou bylo určeno, že *Drepanosiphum platanoidis* je fylogeneticky starší než podčeleď Aphidini.

7. Seznam použitých zdrojů

ALBERTS, Bruce. 2001. *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. Přeložil Arnošt Kotyk. Ústí nad Labem: Espero Publishing, xxvi, 630 s., 18, 62, 30 s. příl. ISBN 8090290604.

AVISE, J. C., J. ARNOLD, R. M. BALL, E. BERMINGHAM, T. LAMB, J. E. NEIGEL, C. A. REEB a N. C. SAUNDERS. 1987. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* [online]. Palo Alto, California: Annual Reviews, **18**(1): 489-522 [cit. 2015-12-07]. DOI: 10.1146/annurev.es.18.110187.002421. ISSN 0066-4162. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.es.18.110187.002421>

BOORE, J. 2006. The use of genome-level characters for phylogenetic reconstruction. *Trends in Ecology* [online]. **21**(8): 439-446 [cit. 2015-11-06]. DOI: 10.1016/j.tree.2006.05.009. ISSN 01695347. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169534706001625>

CAMERON, Stephen L. 2014. Insect Mitochondrial Genomics: Implications for Evolution and Phylogeny. *Annual Review of Entomology* [online]. **59**(1): 95-117 [cit. 2015-11-24]. DOI: 10.1146/annurev-ento-011613-162007. ISSN 0066-4170. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-ento-011613-162007>

CARAPELLI, A, P CONVEY, F NARDI a F FRATI. 2014. The mitochondrial genome of the antarctic springtail *Folsomotoma octooculata* (Hexapoda; Collembola), and an update on the phylogeny of collembolan lineages based on mitogenomic data. *Entomologia 2014* [online]. 2015-11-20, (190): 46-56 [cit. 2015-11-20]. Dostupné z: <http://sei.pagepress.org/index.php/entomologia/article/view/190>

CARAPELLI, Antonio, Pietro LIÒ, Francesco NARDI, Elizabeth VAN DER WATH a Francesco FRATI. Phylogenetic analysis of mitochondrial protein coding genes confirms the reciprocal paraphyly of Hexapoda and Crustacea. *BMC Evolutionary Biology* [online]. **7**(Suppl 2): S8- [cit. 2015-11-24]. DOI: 10.1186/1471-2148-7-S2-S8. ISSN 14712148. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/7/S2/S8>

CASTELLANA, S., S. VICARIO a C. SACCONI. 2011. Evolutionary Patterns of the Mitochondrial Genome in Metazoa: Exploring the Role of Mutation and Selection in Mitochondrial Protein-Coding Genes. *Genome Biology and Evolution* [online]. **3**: 1067-1079 [cit. 2015-11-12]. DOI: 10.1093/gbe/evr040. ISSN 1759-6653. Dostupné z: <http://gbe.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/gbe/evr040>

COOK, C. E, Q. YUE a M. AKAM. 2005. Mitochondrial genomes suggest that hexapods and crustaceans are mutually paraphyletic. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* [online]. **272**(1569): 1295-1304 [cit. 2015-11-24]. DOI: 10.1098/rspb.2004.3042. ISSN 0962-8452. Dostupné z: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspb.2004.3042>

DIXON, Anthony Frederick George. 1998. *Aphid ecology: an optimization approach*. 2nd ed. London: Chapman and Hall, 300 s. ISBN 0412741806.

CHUNDELOVÁ, Daniela. 2012. *Molekulární analýza mitochondriálního genomu *Diuraphis noxia* (Aphididae)*. České Budějovice. Diplomová práce. JČU. Vedoucí práce PaedDr. M. Žurovcová, Ph.D.

KOCHER, T. D., W. K. THOMAS, A. MEYER, S. V. EDWARDS, S. PAABO, F. X. VILLABLANCA a A. C. WILSON. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. WASHINGTON, DC 20418: NATL ACAD SCIENCES, **86**(16): 6196-6200 [cit. 2015-12-07]. DOI: 10.1073/pnas.86.16.6196. ISSN 0027-8424. Dostupné z: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.86.16.6196>

LANG, B. Franz, Dennis V. LAVROV a Gertraud BURGER. 2004. Mitochondrial Genome, Evolution. *Encyclopedia of Biological Chemistry* [online]. Elsevier, : 703 [cit. 2015-10-24]. DOI: 10.1016/B0-12-443710-9/00717-1. ISBN 9780124437104. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0124437109007171>

MACEY, J. Robert, Theodore J. PAPENFUSS, Jennifer V. KUEHL, H. Mathew FOURCADE a Jeffrey L. BOORE. 2004. Phylogenetic relationships among amphisbaenian reptiles based on complete mitochondrial genomic sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* [online]. SAN DIEGO, CA 92101-4495 USA: ACADEMIC PRESS INC ELSEVIER SCIENCE, 27 April 2004, **33**(1): 22-31 [cit. 2015-11-06]. DOI: 10.1016/j.ympev.2004.05.003. ISSN 10557903. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1055790304001496>

MAKIUCHI, Takashi a Tomoyoshi NOZAKI. 2014. Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. *Biochimie* [online]. 2015-11-20, **100**: 3-17 [cit. 2015-11-20]. DOI: 10.1016/j.biochi.2013.11.018. ISSN 03009084. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908413004276>

MINKS, A a P HARREWIJN. 1989. *Aphids: their biology, natural enemies, and control*. New York: Elsevier, World crop pests, 2A, etc. ISBN 04-444-2630-2.

NOVÁKOVÁ, Eva, Václav HYPŠA, Joanne KLEIN, Robert G. FOOTIT, Carol D. VON DOHLEN a Nancy A. MORAN. 2013. Reconstructing the phylogeny of aphids (Hemiptera: Aphididae) using DNA of the obligate symbiont *Buchnera aphidicola*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* [online]. 2013, **68**(1): 42-54 [cit. 2015-11-24]. DOI: 10.1016/j.ympev.2013.03.016. ISSN 10557903. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1055790313001176>

ORTIZ-RIVAS, Benjamín a David MARTÍNEZ-TORRES. 2010. Combination of molecular data support the existence of three main lineages in the phylogeny of aphids (Hemiptera: Aphididae) and the basal position of the subfamily Lachninae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* [online]. **55**(1): 305-317 [cit. 2015-12-07]. DOI: 10.1016/j.ympev.2009.12.005. ISSN 10557903. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1055790309005119>

ORTIZ-RIVAS, Benjamín, Andrés MOYA a David MARTÍNEZ-TORRES. 2004. Molecular systematics of aphids (Homoptera: Aphididae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* [online]. **30**(1): 24-37 [cit. 2015-11-22]. DOI: 10.1016/S1055-7903(03)00155-6. ISSN 10557903. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1055790303001556>

RAIMOND, Roland, Isabelle MARCADÉ, Didier BOUCHON, Thierry RIGAUD, Jean-Pierre BOSSY a Catherine SOUTY-GROSSET. 1999. Organization of the Large Mitochondrial Genome in the Isopod *Armadillidium vulgare* [online]. [cit. 2015-10-24]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9872960>

SIMON, Chris, Thomas R. BUCKLEY, Francesco FRATI, James B. STEWART a Andrew T. BECKENBACH. 2006. Incorporating Molecular Evolution into Phylogenetic Analysis, and a New Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers for Animal Mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* [online]. PALO ALTO, CA 94303-0139 USA: ANNUAL REVIEWS, 2006, 37(1): 545-579 [cit. 2015-11-08]. DOI: 10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110018. ISSN 1543-592x. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.ecolsys.37.091305.110018>

SIMON, Chris, Francesco FRATI, Andrew BECKENBACH, Bernie CRESPI, Hong LIU a Paul FLOOK. 1994. Evolution, Weightning, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* [online]. 2015-11-20, 87(6): 651-701 [cit. 2015-11-10]. Dostupné z: http://hydrodictyon.eeb.uconn.edu/projects/cicada/resources/reprints/Simon_ea_1994.pdf

STARÝ, Petr. 1970. Host life-cycle and adaptation of parasites of syncamore aphid, *Drepanosiphum platanoidis* (SCHRK) in central Europe. *Acta entomologica Bohemoslovaca*. 67(6): 351-359.

TEACHER, Amber GF, Carl ANDRÉ, Juha MERILÄ a Christopher W WHEAT. 2012. Whole mitochondrial genome scan for population structure and selection in the Atlantic herring. *BMC Evolutionary Biology* [online]. 12(1): 248- [cit. 2015-11-12]. DOI: 10.1186/1471-2148-12-248. ISSN 1471-2148. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/12/248>

VON DOHLEN, C. 2000. Molecular data support a rapid radiation of aphids in the Cretaceous and multiple origins of host alternation. *Biological Journal of the Linnean Society* [online]. 2015-11-15, 71(4): 689-717 [cit. 2015-11-15]. DOI: 10.1006/bjpl.2000.0470. ISSN 00244066. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002440660090470X>

WANG, Yuan, Xiao-Lei HUANG a Ge-Xia QIAO. 2014. The complete mitochondrial genome of *Cervaphis quercus* (Insecta: Hemiptera). *Insect Science* [online]. 21(3): 278-290 [cit. 2015-11-11]. DOI: 10.1111/1744-7917.12112. ISSN 16729609. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/1744-7917.12112>

WANG, Yuan, Xiao-Lei HUANG, Ge-Xia QIAO a Bernd SCHIERWATER. 2013. Comparative Analysis of Mitochondrial Genomes of Five Aphid Species (Hemiptera: Aphididae) and Phylogenetic Implications. *PLoS ONE* [online]. 8(10): e77511- [cit. 2015-11-11]. DOI: 10.1371/journal.pone.0077511. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0077511>

WYNNE, I. R., J. J. HOWARD, H. D. LOXDALE a C. P. BROOKES. 1994. Population genetic structure during aestivation in the sycamore aphid *Drepanosiphum platanoides* (Hemiptera: Drepanosiphidae). *European Journal of Entomology* [online]. 2014-12-01, 91: 375-383 [cit. 2015-11-24]. Dostupné z: <http://www.eje.cz/pdfs/eje/1994/04/05.pdf>

ZHANG, Bo, Chuan MA, Owain EDWARDS, Susan FULLER a Le KANG. 2014. The mitochondrial genome of the Russian wheat aphid *Diuraphis noxia*: Large repetitive sequences between trnE and trnF in aphids. *Gene* [online]. 533(1): 253-260 [cit. 2015-11-27]. DOI: 10.1016/j.gene.2013.09.064. ISSN 03781119. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378111913012699>

ZHANG, De-Xing a Godfrey M. HEWITT. 1997. Insect mitochondrial control region: A review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochemical Systematics and Ecology* [online]. 2015-11-25, 25(2): 99-120 [cit. 2015-11-25]. DOI: 10.1016/S0305-1978(96)00042-7. ISSN 03051978. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305197896000427>

Internetové zdroje:

<http://eshop.biogen.cz/lambda-dnaecori-hindiii-marker>

<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>

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

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

8. Seznam tabulek

Tabulka 1: Druhy vybrané pro komparativní analýzu, jejich referenční číslo v databázi Genbank.....	10
Tabulka 2: Seznam použitých primerů, jejich sekvence a směr.	12
Tabulka 3: Poměr reakčních směsí pro jednotlivé polymerázy (množství na jeden vzorek).	13
Tabulka 4: Přehled profilů při nichž byla amplifikace úspěšná.	15
Tabulka 5: Příprava produktu k sekvenování (Seqme.cz).....	17
Tabulka 6: Geny kódující proteiny, srovnání detekce pozic z programu MitoS a skutečných pozic na základě srovnání s příbuznými druhy.	21
Tabulka 7: Přehled pozic jednotlivých sekvencí kódujících tRNA.	22
Tabulka 8: Procentuální zastoupení jednotlivých nukleotidů v sekvenci control region.....	25
Tabulka 9: Podíl jednotlivých bazí v mitogenomech jedinců podřádu Sternorrhyncha a celková velikost mitogenomů. Mitogenom, kterým se zabývá tato práce, je vyznačen tučně.	27
Tabulka 10: Primery s nimiž se nedařila amplifikace. F= + řetězec, R= - řetězec.	40

9. Seznam použitých zkratek

1. mitogenom – mitochondriální genom
2. mtDNA – mitochondriální DNA
3. PCG – protein coding genes (geny kódující proteiny)
4. PCR – polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
5. rRNA – ribozomální RNA
6. tRNA – transferová RNA
7. *nad* – podjednotka NADH dehydrogenázy
8. *atp* – podjednotka ATP syntázy
9. *cytB* –cytochrom B
10. *rrn* – geny kódující ribozomální podjednotku

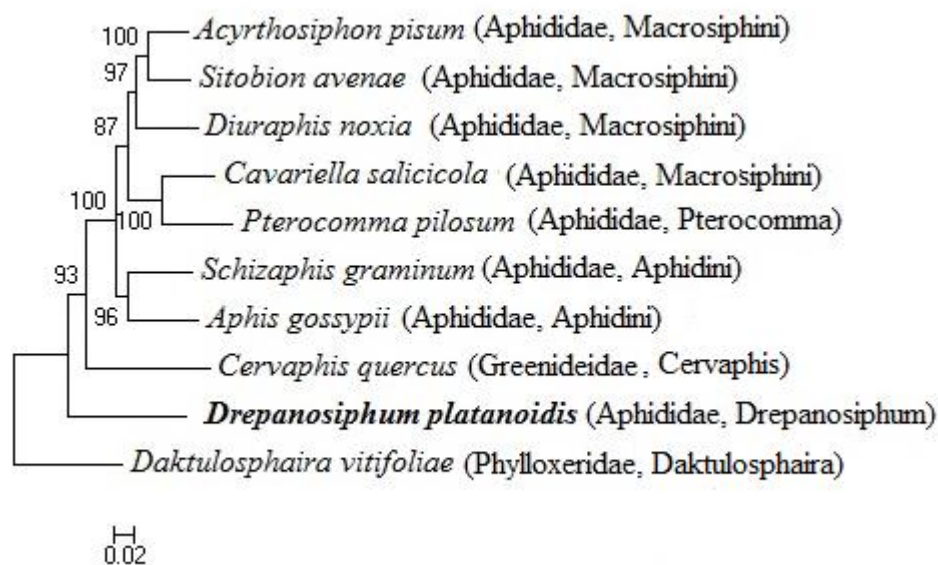
10. Přílohy

Příloha 1:

Tabulka 10: Primery s nimiž se nedařila amplifikace. F= + řetězec, R= - řetězec.

Název primeru	Sekvence primeru 5' → 3'	F/R
C3-J-5014	TTATTTATTGCATCAGAAGT	F
N5-J-7077	TTAAATCCTTWGARTAAAAYCC	F
CB-N-10920	TCCTCAAAATGATATTTGTCCTCA	R
N1-J-12585b	CCCTTACGAATTTGAATATATCC	R
SR-N-14275b	AAGGTGGATTTGGTAGTAA	R
11841-for	ATCATAACGAAACCGAGGTAATGTACC	F
N1-N12595	GTAGCATTTTTAACTTTATTAGAACG	R
N4-N8487	TATCAGCTAATATAGCAGCTCC	R
TL2-J3033	TCTAATATGGCAGATTAGTGCA	F
N5-J-6579	TTCTGACCAACCTTGATC	F
TM-J-210b	AAGCTACTGGGTTTCATACCC	F
MtD-12 (3014)	TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA	F
1460rev	GGCTGAAGTTTAGGGCGATAAATTGTA	R
A8-N4061	GAGATTAAGTTTGTTATCATTTTCA	R
mtD-9 (2191)	CCCGGTAAAAATAAAATATAAACTTC	R
SR-N-14220	ATATGYACAYATCGCCCGTC	R
Dpr 1355	GTTGAGATTATTGAACCAATTG	R
CB-J-10933	TATGTACTACCATGAGGACAAATATC	F
DrSArRev	TACAATTATGTCATTATGTGG	R
Dpf 3826	CAGGATTCATGGAATACATG	F

Příloha 2:



Obrázek 11: Fylogenetická rekonstrukce vybraných druhů *Sternorrhyncha* (Maximum Likelihood: GTR+G+I, Bootsrap 1000x, outgroup *Daktulosphaira vitifoliae*).

Příloha 3:

Repetice *D. platanoidis*: **TATACTAATATTATTAACC** (v sekvenci podtrženo).

Sekvence oblasti control region *D. platanoidis* (červeně vyznačeny nukleotidy AT).

**TTACATATATAAAAATTAAAGATTGGTTTTAAATTTATAATATTTAAAAATCATA
AATAACAATTTTTAACCTTAAAATTTTAAAATTTAATCCCTATTATATATATATCT
ATAACAATTAATAAATAATTAGATATCTATAAGGATTTTATATATAAATATACTA
TTATTAATACTAAATGTATAAATTAGATATATTAATAATATTTATATATAAATAA
GTAATAACAATTATAATACATAATAATAATGTATACTAATATTACTATTAACCTA
ATACTATATTATTAATGTATACTAATATTATTAACCTATTACAATAGATTATACTAA
TATATAAATACTTATATATATAGATATACCTATACAGGAAGTATGATATATCTATA
CTCTATTACATATTAATAAGACTCATATATTCTTTTTATTCTTTTTTTTAATAATAG
AGGGCCCCCTACGATTTATCATCATAAAAGTTAAGTAACGCTCCAAGAAATTGT
AGTACTTTGTGATTTAAAAAACTTTAGTTAAATAAATAATTTTAAACCACTAAA
CATTTTTTTAATTAATAAATTTTTTTTTT**