

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vývoj nových SSR markerů u mšice broskvoňové
(*Myzus persicae*)**

Diplomová práce

**Bc. Sichingerová Ema
Biotechnologie a šlechtění rostlin**

Ing. Jakub Vašek, Ph.D.

© 2024 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vývoj nových SSR markerů u mšice broskvoňové (*Myzus persicae*)" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 21.4.2024

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Jakubovi Vaškovi, Ph.D., za odborné rady, konzultace a vedení celé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Daniele Čílové a Ing. Petrovi Sedlákovvi, Ph.D. za trpělivost a pomoc v laboratoři.

Vývoj nových SSR markerů u mšice broskvoňové (*Myzus persicae*)

Souhrn

Myzus persicae (Sulzer) čili mšice broskvoňová je polokřídlym hmyzem z čeledi mšicovitých (Aphididae) s kosmopolitním výskytem. Jedná se o drobného škůdce, napadajícího široké spektrum rostlin, včetně rostlin zemědělsky významných. Proto je zásadní studovat, monitorovat a regulovat populace mšic. Za účelem přispět k populačním studiím je cílem této práce vyvinout nové SSR markery u mšice broskvoňové.

Pro vývoj nových markerů bylo v prvním kroku nutné bioinformatickou analýzou najít vhodné mikrosatelitní lokusy. Prostřednictvím softwaru GMATA bylo analýzou genomů mšice broskvoňové, získaných z genomické databáze NCBI, nalezeno 42 266 mikrosatelitních lokusů, jejichž počet byl dále redukován na základě stanovených kvalitativních parametrů jako je délka opakujícího se motivu nebo celkový počet repetic. Ke kandidátním markerům bylo zapotřebí navrhnout vhodné primery, což zúžilo počet markerů na konečných 96. Tyto markery byly dále empiricky testovány v molekulární laboratoři na vzorcích mšic, které byly v roce 2022 získány ze sedmi českých polních lokalit.

Podmínkou pro testování v laboratoři byla kvalitně provedená DNA izolace, v tomto případě prováděná fenol-chloroformovou metodou. Po spektrofotometrickém ověření čistoty a koncentrace izolované DNA byly navržené primery využity na amplifikaci hledaných markerů PCR reakcí. Prostřednictvím agarózové elektroforézy byla ověřena nejen schopnost primerů amplifikovat, ale i velikost amplikonů a jejich případný polymorfismus. Vhodné markery byly dále osekvenovány Sangerovou metodou a podrobeny fragmentační analýze na kapilární elektroforéze. Optimalizací markerů bylo vybráno 17 nových markerů (Myzper-2, -3, -14, -16, -23, -25, -28, -31, -32, -40, -47, -52, -60, -61, -64, -66 a -71), které vykazovaly polymorfismus a poskytovaly jednoznačné a reprodukovatelné výsledky.

Klíčová slova: mšice broskvoňová, *Myzus persicae*, SSR, mikrosatelity

Development of new SSR markers in green peach aphid (*Myzus persicae*)

Summary

Myzus persicae (Sulzer), also known as a peach-potato aphid, is a hemipteran insect belonging to the family Aphididae with a cosmopolitan distribution. It is a small pest attacking a wide range of plants, including agriculturally significant ones. Therefore, it is crucial to study, monitor, and control aphid populations. The aim of this study is to contribute to population studies by developing new SSR markers for the peach-potato aphid.

In the first step of marker development, it was necessary to identify suitable microsatellite loci through bioinformatic analysis. Using the GMATA software, analysis of peach-potato aphid genomes obtained from the NCBI genomic database revealed 42,266 microsatellite loci, which were further reduced based on qualitative parameters such as motif length and number of repeats. Suitable primers needed to be designed for candidate markers, narrowing down the number of markers to a final 96. These markers were empirically tested in a molecular laboratory using aphid samples collected from seven field sites in the Czech Republic in 2022.

A prerequisite for laboratory testing was well-executed DNA isolation, performed in this case using the phenol-chloroform method. After spectrophotometric verification of the purity and concentration of isolated DNA, the designed primers were used to amplify the target markers through PCR reactions. Agarose gel electrophoresis was used to verify not only the primer's ability to amplify but also the size of the amplicons and their potential polymorphism. Suitable markers were further sequenced using the Sanger method and subjected to fragment analysis via capillary electrophoresis. Through marker optimization, 17 new markers (Myzper-2, -3, -14, -16, -23, -25, -28, -31, -32, -40, -47, -52, -60, -61, -64, -66, and -71) were selected, demonstrating polymorphism and providing clear and reproducible results.

Keywords: peach-potato aphid, *Myzus persicae*, SSR, microsatellites

Obsah

1 Úvod	9
2 Vědecká hypotéza a cíle práce	10
2.1 Vědecká hypotéza:	10
2.2 Cíle práce:	10
3 Literární rešerše	11
3.1 <i>Myzus persicae</i> (Sulzer)	11
3.1.1 Popis <i>Myzus persicae</i> (Sulzer).....	11
3.1.2 Genetika <i>Myzus persicae</i> (Sulzer).....	12
3.1.2.1 Karyotyp	12
3.1.2.2 Velikost genomu	12
3.1.3 Životní cyklus mšice	12
3.1.4 Význam	14
3.1.5 Ochrana	15
3.2 Genetické markery	16
3.2.1 Jednonukleotidové polymorfismy SNP	17
3.2.2 Mikrosatelity (SSRs)	17
3.2.3 Původ mikrosatelitů	18
3.2.4 Klasifikace mikrosatelitů	20
3.3 Molekulárně genetické metody	21
3.3.1 Polymerázová řetězová reakce.....	21
3.3.2 Elektroforéza	22
3.3.2.1 Agarózová gelová elektroforéza.....	22
3.3.2.2 Gelová kapilární elektroforéza	23
3.3.3 Sekvence DNA.....	24
3.3.4 Zkreslení a chybovost dat	25
4 Metodika	28
4.1 Bioinformatická analýza dat	28
4.1.1 Návrh mikrosatelitních markerů.....	28
4.2 Materiál	28
4.2.1 Izolace DNA.....	29
4.3 Design testování vybraných lokusů	30
4.3.1 PCR.....	30
4.3.2 Elektroforéza	32
4.3.2.1 Agarózová elektroforéza	32
4.3.2.2 Sekvence.....	32

4.3.2.3 Kapilární gelová elektroforéza	33
4.3 Statistická analýza a zpracování dat	34
5 Výsledky	35
5.1 Výsledky bioinformatické analýzy	35
5.2 Testování navržených markerů v laboratoři	37
5.2.1 Testování navržených markerů na agarózové elektroforéze	37
5.2.2 Sekvence	38
5.2.3 Testování navržených markerů na kapilární elektroforéze	38
6 Diskuze	43
6.1 Bioinformatická analýza	44
6.2 Optimalizace	45
7 Závěr	47
8 Literatura	48
9 Samostatné přílohy	I

1 Úvod

Mšice broskvoňová, vědecky známá jako *Myzus persicae* (Sulzer), je kosmopolitní škůdce způsobující škody na mnoha hospodářsky významných plodinách. Živí se šťávami z listů, výhonů a plodů rostlin, což může vést k oslabení rostlin a snížení jejich výnosů, a zároveň je přenašečem virů a dalších chorob. Proto je zásadní monitorovat a regulovat populace mšic pomocí různých metod, jako je použití přírodních nepřátel, insekticidů nebo mechanických prostředků.

Ke sledování a vyhodnocení proměnlivosti populací a lepšímu porozumění biologie mšic lze využít genetické markery, zejména na úrovni nukleových kyselin. Vhodnými markery jsou mikrosatelity, krátké tandemové repetice hojně zastoupené v celém genomu, vykazující zejména vysoký polymorfismus a mendelistickou dědičnost. Navíc je návrh takových markerů díky zmapovanému genomu mšice broskvoňové značně zjednodušen.

Cílem této práce je optimalizovat navržené markery pomocí metod molekulární biologie, tedy PCR, gelové a kapilární elektroforézy a sekvenace Sangerovou metodou. Výsledné mikrosatelity a jejich navržené primery by měly být reprodukovatelné v dalších laboratořích a měly by přispívat k dalšímu výzkumu tohoto hmyzího škůdce.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

2.1 Vědecká hypotéza:

Mšice je významným škůdcem polních plodin zejména díky přenosu řady viróz. Pro lepší porozumění biologie mšice a studium její genetické variability na úrovni populací jsou využitelné i tzv. molekulárně-genetické markery. Předpokladem je, že nově vyvinuté SSR markery umožní vyhodnotit genetickou variabilitu u populací mšic.

2.2 Cíle práce:

- 1) Vyhledat na základě bioinformatické analýzy genomických dat nové kandidátní lokusy a navrhnout vhodné primery.
- 2) Empiricky testovat a optimalizovat vybrané markery pomocí molekulárně genetických metod.
- 3) Ověřit specifitu markerů sekvenováním.
- 4) Analyzovat nejvhodnější mikrosatelitní markery a vyhodnotit optimalizovaný SSR panel využitelný pro další studie.

3 Literární rešerše

3.1 *Myzus persicae* (Sulzer)

Myzus persicae (Sulzer) čili mšice broskvoňová je drobným polokřídlym hmyzem pravděpodobně pocházejícím z Číny (Saguez et al., 2013). Řadí se do řádu mšicosavých (Sternorrhyncha), čeledi mšicovitých (Aphididae), obsahující mimo jiné rod mšice (*Aphis*, Linnaeus, 1758). Má dva poddruhy, *Myzus persicae nicotianae* a *Myzus persicae persicae* (Schoch et al., 2020). Čeledi Aphididae náleží okolo 5000 druhů, rozšířených kosmopolitně, a přibližně 400 z nich jsou škůdci na zemědělsky využívaných plodinách (Capinera, 2008).

3.1.1 Popis *Myzus persicae* (Sulzer)

Mšice broskvoňová je mšicí vysoce polymorfní, je menší až střední velikosti, s tělem zbarveným od zelené po červenou. Dospělé bezkřídle samičky mají oválná těla s délkou přibližně 1,2 -2,1 mm a zbarveny mohou být do světle zelené, žluté, šedozelené, růžové až po červenou. Poddruh *nicotianae* je ještě rozmanitější a je bohatší o zářivě žlutou a černou barvu. Okřídlení jedinci mají na břiše černou skvrnu. Nedospělé samice jsou často růžové nebo červené a nedospělí samci bývají zpravidla nažloutlí, jak je znázorněno na obrázku č. 1 (Capinera, 2004).

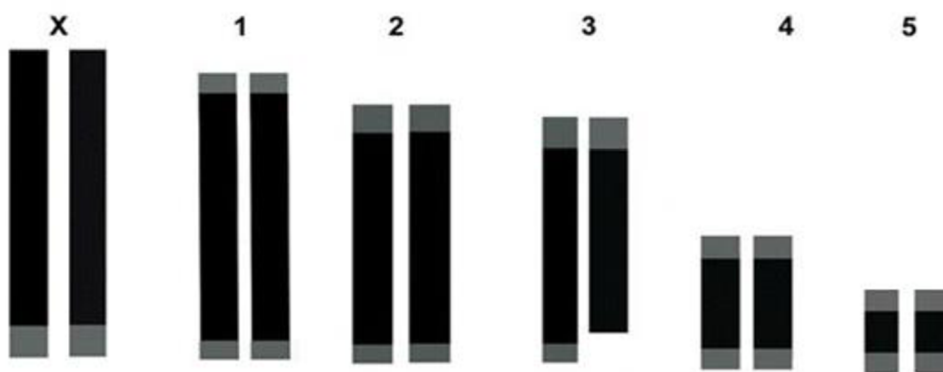


Obrázek č. 1: Různě zbarvení dospělci a nymfy (vlevo) a okřídlený a neokřídlený dospělec *Myzus persicae* (Sulzer) (vpravo). (Převzato a upraveno z Miller, 2019 a Saguez et al., 2013).

3.1.2 Genetika *Myzus persicae* (Sulzer)

3.1.2.1 Karyotyp

V rámci rodu mšice se setkáme s vysokou variabilitou karyotypů, od diploidních jedinců se čtyřmi chromozomy až po diploidní jedince s dvaasedmdesáti chromozomy. Typicky se, *Myzus persicae* včetně, vyskytují v podobě $2n=12$ chromozomů (Blackman, 1980) (Obr. č. 2). Rychlý vývoj nových karyotypů je zřejmě důsledkem holocentrických chromozomů postrádajících lokalizované centromery, bez kterých může docházet k fúzi chromozomů bez větších důsledků. Zároveň asexuální reprodukce podporuje přetrvávání těchto změn do dalších generací (Mathers et al., 2021).



Obrázek č. 2: Karyotyp mšice broskvoňové. Pět párů autozomálních chromozomů (1-5) doplňuje pár pohlavních chromozomů X (převzato a upraveno z Monti et al., 2012).

3.1.2.2 Velikost genomu

Databáze NCBI GenBank uvádí dva složené genomy. Poprvé byl v roce 2016 složen referenční genom asexuální samičky na úrovni scaffoldů (Mathers et al., 2017). Velikostí odpovídá 347 megabázím a obsahuje přes 17 000 genů, kódujících přibližně 15 000 proteinů. Později publikovaný genom z roku 2023 je o 36 megabází obsáhlejší a je již složený na úrovni chromozomů (Feng et al., 2023).

3.1.3 Životní cyklus mšice

U mšic se setkáváme s variací životního cyklu obnášející alternativní metody přezimování (Obr. č. 3). Cyklus holocyklický u mšic představuje partenogenezi v kombinaci se sexuální reprodukcí těsně před nástupem zimy a následné přezimování vajíček nakladených nejčastěji na zástupcích rodu *Prunus*. Vajíčka se líhnou na jaře, kdy se rostlina probouzí z dormance a začne růst, a vylíhlé nymfy se zpočátku živí mladými stonky, listy a květy rostliny. Generační cykly anholocyklické jsou závislé na vhodných podmínkách a vyznačují

se úplnou absencí sexuální reprodukce (Saguez et al., 2013). Samičky se rozmnožují pouze partenogenezí a zároveň viviparií, kdy se rodí již ve stadiu nymfy, přezimují na travách a obilí a v takovém případě vajíčka vůbec nekladou (Zitoudi et al., 2001).

Zástupci mšice broskvoňové jsou převážně bezkřídlí, okřídlení jedinci obou pohlaví se rodí na podzim za účelem přeletu na rostlinu k přezimování, a dále v případě, pokud dostatečně zhoustne populace mšice na jedné rostlině nebo se stav rostliny zhorší (Capinera, 2004).

Životní cyklus mšic sestává ze tří následujících vývojových stádií:

1. Vajíčko

Jak je již zmíněno výše, vajíčka jsou před nástupem zimy nakladena na zástupce rodu *Prunus*. Po naklazení jsou zbarvena bíle až žlutě, ale brzy tmavnou až do černého odstínu. Jsou přibližně 0,6 mm dlouhá a 0,3 mm široká (Capinera, 2004).

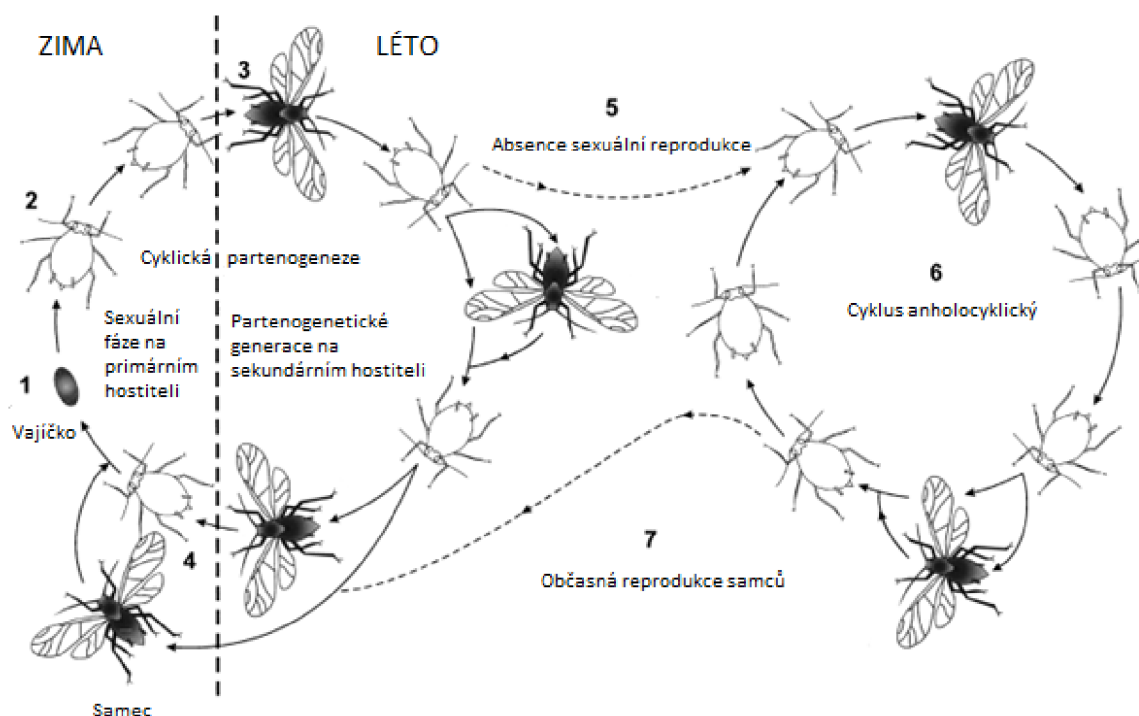
2. Nymfa

Nymfy jsou zprvu zbarveny zeleně, v průběhu dospívání se zbarvují do žluta. Stadium nymfy se skládá ze 4 či 5 instarů, mezi každým svlékáním uplynou v průměru pouze dva dny (Horsfall, 1924; Capinera, 2004). Mšice jsou schopny množit se velmi rapidně, denně připadá na samici v průměru jeden až dva noví potomci (Capinera, 2004).

3. Dospělec

Dospívání trvá přibližně 10-12 dní a za rok se v mírném klimatu můžeme setkat s dvaceti generacemi, při chladnějších podmínkách počet generací klesá (Capinera, 2004).

Dospělé mšice lze podle vzhledu rozlišovat na bezkřídle a okřídlené formy. Po přibližně osmi jarních generacích na jedné rostlině se rodí okřídlení jedinci, kteří kolonizují téměř všechny rostliny v dosahu. Po nasednutí nakladou pár vajíček, ze kterých se rodí bezkřídle mšice, a odlétají na další rostlinu. Okřídlení dospělci měří mezi 1,8 a 2,1 mm v délce, mají černou hlavu a hrudník a žlutavě zelené břicho. Oproti tomu zástupci bezkřídlych měří od 1,7 do 2 mm a tělíčka mají zelená či nažloutlá (Capinera, 2004).



Obrázek č. 3: Životní cyklus mšice broskvoňové. V oblastech s chladnými zimami mšice migrují na dřevnatého primárního hostitele, kde se samice a samci páří a kladou vajíčka k přezimování (1). Kmenová matka (2) vylíhla z vajíčka dává vzniknout čistě partenogenetickým generacím, kdy první okřídlená generace (3) migruje na sekundární hostitele. Okřídlené morfy (4) jsou produkovány na podzim v reakci na klesající fotoperiodu a teplotu a migrují zpět na primární hostitele, aby dokončily holocyklus. V teplých oblastech dochází ke ztrátě sexuální části cyklu (5) a partenogeneze probíhá celý rok (6). Partenogenetické samice mají ovšem stále schopnost produkovat samce (7) pro vyšší genetickou variabilitu mezi populacemi (převzato a upraveno z Field a Blackman, 2003).

3.1.4 Význam

Mšice broskvoňová je významným škůdcem rostlin, který způsobuje mechanické poškození pletiv a přenáší více než sto virových onemocnění. Na rozdíl od ostatních druhů mšic se nespecializuje na úzkou skupinu rostlin, ale napadá přes sto různých druhů v rámci přibližně 40 rostlinných čeledí (Brust et al., 2018). Mezi nejčastěji napadené hospodářské plodiny patří fazole, cukrová řepa a třtina, tabák, citrusy, a v neposlední řadě brambory, pro jež je mšice dokonce nejvýznamnějším škůdcem na světě. Nevyhnou se jí ani rostliny pěstované ve sklenících, což umožňuje mšicím přežít i při nepříznivých podmínkách (Capinera, 2004).

Rostlinám mohou ve větším počtu způsobit vodní stres, vadnutí a snížení rychlosti růstu, a při dlouhodobém výskytu způsobují značné ztráty na výnosu plodin, zejména okopanin. Sáním floému připravují rostliny o živiny a zamezují jim v růstu a vývoji, a zároveň často dochází při sání k transportu chorob z jedné rostliny na druhou (Brust et al., 2018). Choroby přenášené mezi rostlinami stiletými mšic jsou nejčastěji virového původu a jedná se jak o infekce

perzistentní, kdy vir v mšici přetrvává minuty až hodiny a ve vektoru se množí, tak o infekce neperzistentní, tedy přenos virových částic v rámci minut po sání bez možnosti se ve vektoru reprodukovat. Příkladem perzistentních virů bramboru je virová svinutka bramboru (PLRV) a příkladem neperzistentních virů je Y – viróza bramboru (PVY) nebo A – viróza bramboru (PVA) (Pinheiro et al., 2019). Dalšími významnými viry přenášenými mšicemi jsou např. virová mozaika okurky (CMV), virus tabákové mozaiky (TEV) a zástupci rodu Potyvirus (Ali et al., 2023; Gadhave et al., 2020).

3.1.5 Ochrana

Před mšicemi a přenosnými chorobami se lze bránit redukcí populací škůdce (1), ochranou před transmisí virů sáním (2), přirozenou rezistencí proti mšicím (3) a genetickou úpravou rostlin (4):

1. Se zaměřením na redukcí populací mšic se aplikují insekticidy, nicméně se potýkáme s rostoucí rezistencí mšic na některé typy, např. organofosfátové insekticidy, karbamáty a pyrethroidy (Radcliffe a Lagnaoui, 2007). Redukovat populaci lze dále mikrososami z podčeledi Aphidiinae (mšicomarovití) a čeledi Aphelinidae (mšicovníkovití), nebo parasitoidy, kteří kladou vajíčka do těla mšice. Larvy se po vylíhnutí živí tkání hmyzu, čímž jej zabíjí. Ještě vyšší potenciál k přirozené redukcí než mikrososy skýtají predátoři slunéčkovití (Coccinellidae), zlatoočkovití (Chrysopidae), střevlíkovití (Carabidae) a pestřenkovití (Syrphidae) (Symondson et al., 2002).
2. Před transmisí virů mšic chrání rostliny aplikace minerálních olejů. Ačkoliv se považují, zejména u brambor, za neúčinnější zbraň, mechanismus jejich účinku na mšice není zcela znám (Saguez et al., 2013).
3. Někteří rostlinní zástupci vykazují přirozenou odolnost vůči savým škůdcům. Například Gibson (1971) u čeledi lilkovité (Solanaceae) popsal výhody trichomů, kdy tabák z trichomů vylučuje pro mšice toxické alkaloidy, a trichomy u rajčat lepí a zabraňují tak poklidnému kolonizování. Gen Mi rajčat a melounů chrání před motolicemi a mšicemi, snižuje přijímání floému a zvyšuje úmrtnost mšic, gen Vat stejného původu zabraňuje přenosu neperzistentních virů (Rossi et al., 1998; Chen et al., 1997).
4. Byť se naskýtá atraktivní možnost ochrany genetickou úpravou rostlin, obohacující plodiny o geny s odolností proti mšicím, většina takových projektů selhala a žádný z transgenních zástupců se neosvědčil natolik, aby byl komerčně využíván (Saguez et al., 2013).

3. 2 Genetické markery

Genetický marker je obecný termín označující specifickou část DNA, která může být jednoduše identifikována. Marker by měl splňovat několik kritérií; měl by být vysoce polymorfní s častým výskytem v genomu, s preferovaným kodominantním projevem (k jednoduchému rozlišení heterozygotů od homozygotů), se zřetelným alelickým projevem a zastoupen pouze jednou kopií (Chesnokov et al., 2020; Salisu et al., 2018). Testování by mělo být rychlé, levné a jednoduché, s vysokou reprodukovatelností a snadnou výměnou údajů mezi laboratořemi (Rajapakse, 2003).

Jejich detekce a využití se zakládá na různých principech, proto je zpravidla dělíme na tři třídy:

Morfologické markery, typicky vizuální indikátory fenotypových znaků, využívané pro studium kvalitativních a kvantitativních znaků. Jsou nejstarším, ale stále používaným typem markerů i přes značné nevýhody; fenotypový znak by měl být co nejméně ovlivnitelný vnějšími podmínkami a je těžké určit, zda se nejedná o interakci více genů (Chesnokov et al., 2020; Benin et al., 2008). Jejich použití je také omezeno epistatickým i pleiotropním efektem a věkem i pohlavím jedince (Chesnokov et al., 2020; Rajapakse, 2003).

Biochemické markery, které se spolu s DNA markery řadí do markerů molekulárních, a využívají se pro značení variability produktů genů, především u rostlin. Nejčastějšími zástupci jsou izoenzymy, strukturou odlišné enzymy katalyzující stejnou reakci. Výhodou bílkovinných markerů je kodominance znaků, k nevýhodám patří menší množství vhodných proteinů a možnost označení pouze kódujících sekvencí DNA. Aplikaci nacházejí převážně ve studiích genetické diverzity, struktury a v genetice populací obecně (Nadeem et al., 2018).

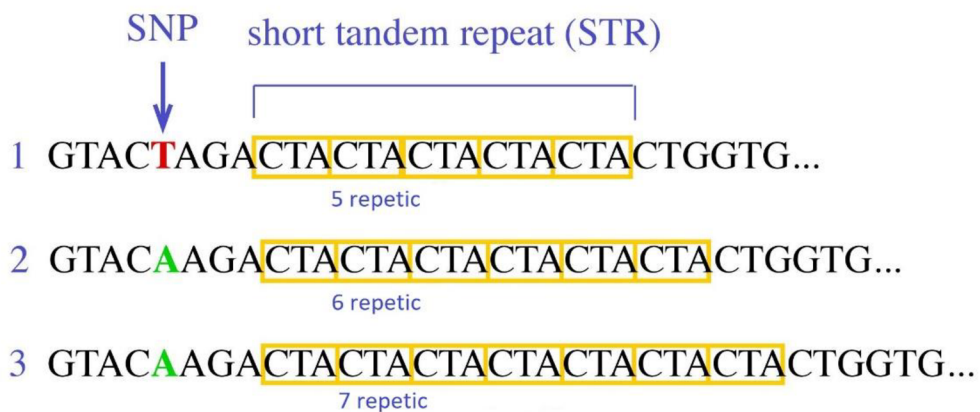
DNA markery, kterými lze určit polymorfismus na úrovni nukleové kyseliny. Ideálně by měl být v blízkosti cílového genu a obvykle se spolu s genem dědí. Výhodami DNA markerů je jejich hojný výskyt napříč celým genomem, s vysokým výskytem v nekódujících sekvencích, kdy je lze považovat za geneticky neutrální (Collard et al., 2005). Navíc specifické místo lokusu, na kterém se marker nachází, může a nemusí být známo, a vliv vnějších podmínek na jejich změnu je minimální až nulový (Amiteye, 2021; Nadeem et al., 2018).

DNA markerem mohou být SNP (single nucleotide polymorphism) nebo mini- a mikrosatelity (Al-Samarai et al., 2015):

3.2.1 Jednonukleotidové polymorfismy SNP

Jednonukleotidové polymorfismy SNP jsou definovány jako rozdíly v jediném nukleotidu s frekvencí zastoupení v populaci nad 1 %, a jsou považovány za nejhojnější zdroj genetických polymorfismů. Vzniknout mohou třemi způsoby, nejčastější tranzicí (záměna purinu s purinem nebo pyrimidinu s pyrimidinem), transverzí (záměna purinové báze za pyrimidinovou nebo pyrimidinové za purinovou) a inzercí či delecí. Byť by jednonukleotidové polymorfismy mohly ve specifickém místě DNA při porovnání u více jedinců obsahovat všechny čtyři varianty nukleotidů, v praxi se obecně setkáváme spíše s bíalelickými variantami (Vignal et al., 2002).

Výhodami SNP je, vedle již zmíněné četnosti, jejich evoluční stabilita s malou mutační rychlostí a možnost jejich vysoce výkonné automatizované analýzy (Duran et al., 2009; Al-Samarai et al., 2015).



Obrázek č. 4: Znárodnění SNP a mikrosatelitů (STR) na třech vláknech (upraveno a převzato dle Richardson, 2017).

3.2.2 Mikrosatelity (SSRs)

Mikrosatelity, označovány také termíny simple sequence repeats (SSRs), short tandem repeats (STRs) nebo simple sequence length polymorphisms (SSLPs), jsou přibližně 1-10 nukleotidů dlouhé tandemové repetice. Spolu s minisatelity (>10 nukleotidů) patří k tandemovým repeticím (Gemayel et al., 2012). Vyskytují se jak u eukaryot, tak prokaryot, zastoupeny jsou hojně napříč celým genomem v kódující a nekódující, jaderné i organelové DNA, s nejčastějším výskytem v euchromatinu eukaryot (Vieira et al., 2016).

Pro své široké uplatnění v populační genetice, šlechtění, forenzní genetice a mnoha dalších biologických oborech jsou mikrosatelity nejpoužívanější markery. Rozsáhlá aplikace je umožněna tím, že jsou kodominantní a multialelické, vysoce reprodukovatelné a založené na polymerázové řetězové reakci (Oliveira et al., 2006). Ta přináší výhody využití malého množství templátové DNA (<100 ng) a usnadnění automatizace spojováním různých mikrosatelitů do multiplex PCR. Nevýhodami je naopak vysoká časová a finanční náročnost metod. Výsledky mohou být navíc zkresleny výskytem nulových alel (popsány v kapitole 3.3.4. Zkreslení a chybovost dat).

3.2.3 Původ mikrosatelitů

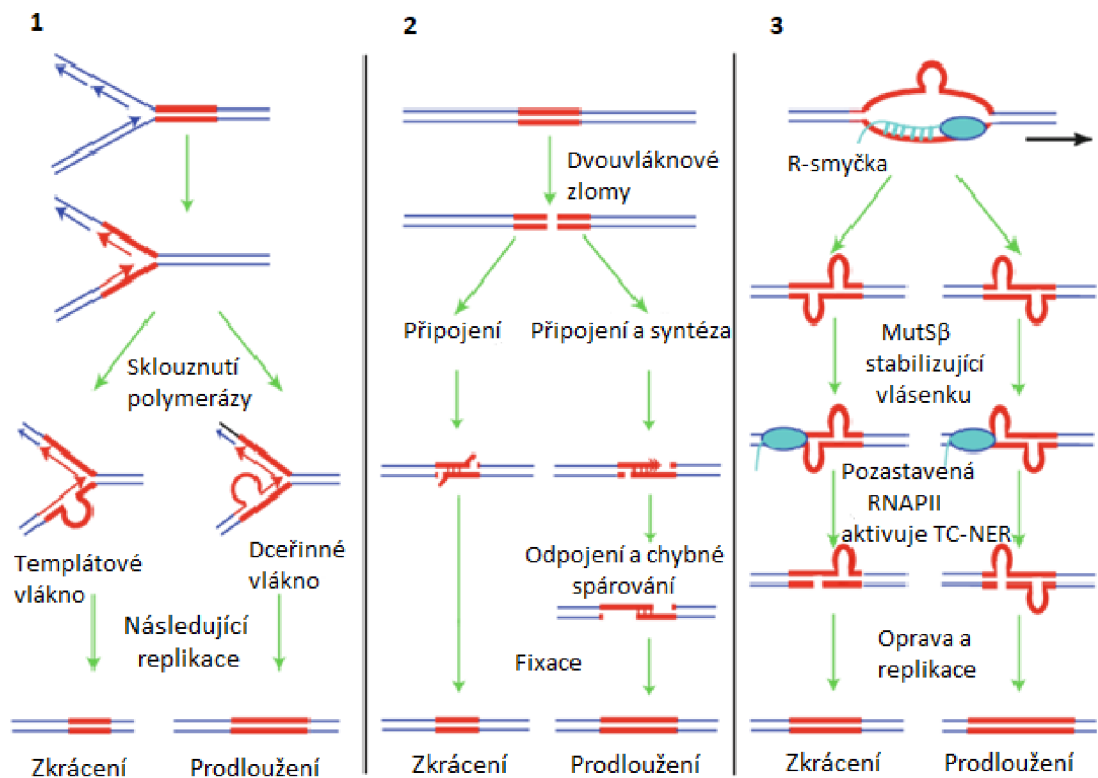
Mikrosatelity vykazují vysokou variabilitu. Jejich mutační rychlost je vyšší než jiných částí genomu, typicky v rozsahu od 10^{-2} do 10^{-6} nukleotidů na lokus za generaci (Sia et al., 2000). Známý jsou zatím tři mechanismy vzniku mikrosatelitů, zapříčiněné sklouznutím polymerázy při replikaci (1), dvouvláknovými zlomy (2) a opakovanou transkripcí (3) (obr. č. 5):

1. Sklouznutí polymerázy (Replication slippage). Během replikace se může nově syntetizovaný řetězec chybně spárovat a vytvořit smyčku opakujících se jednotek buď na dceřiném nebo na templátovém vlákně. Při následné replikaci smyčky na templátovém řetězci vzniká zkrácené vlákno, zatímco replikace smyčky na dceřiném řetězci podmíní expanzi mikrosatelitu (Chatterjee et al., 2013).

2. Dvouvláknové zlomy (DSBs double-strand breaks). V prvním případě mohou dvouvláknové zlomy vést k chybnému spárování konců jednovláknové DNA (single strand annealing, SSA), následnou opravou párování vzniká kratší úsek repetice. V druhém případě se jedno ze spárovaných vláken prodlouží DNA syntézou podle templátového vlákna, může však dojít k odpojení a novému chybnému spárování, při němž vzniká prodloužení vlákna (Pâques a Haber, 1999).

3. Opakovaná transkripce (transcription through a repeat). Formace R-smyčky (R-loop), trinukleotidového hybridu DNA a RNA za transkribující RNA polymerázou podporuje vznik smyčky i v nepřepisujícím se vlákně (Hegazy et al., 2020). Jakmile enzym RNáza H R-smyčku rozvolní, opětovné spárování netranskribovaného řetězce nesoucího vzniklou smyčku by

znamenal vytvoření kompenzační smyčky v templátovém řetězci. CAG a CTG smyčky stabilizuje MutS β , protein rozpoznávajícího neshody, a blokuje nejen mismatch repair systém, ale i RNA polymerázu na obou řetězcích (Pearson et al., 1997; Tian et al., 2009). Pozastavená polymeráza je hlavní signál pro iniciaci TC-NER (transcription-coupled nucleotide excision repair), nukleotidové excizní opravy spřažené s transkripcí, a oprava opětovně může vyústit v prodloužení nebo zkrácení vláken (Chatterjee et al., 2013).



Obrázek č. 5: Znárodnění mechanismů vzniku mikrosatelitů. Převzato a upraveno z Chatterjee et al., 2013.

3.2.4 Klasifikace mikrosatelitů

Mikrosatelity jsou velmi variabilní a mezi autory se setkáme s nejednotnou definicí i klasifikací mikrosatelitů, přesto se lze nejčastěji v literatuře setkat s klasifikací dle výskytu, typu repetitivní sekvence a délce motivu (Obr. č. 6).

1. Výskyt a zdroje mikrosatelitů

Podle Al-Samarai et al. (2015) jsou mikrosatelity klasifikovány dle výskytu na genomické (gSSRs), tedy mikrosatelity zastoupeny v jaderném genomu, a mikrosatelity organelové, nacházející se v mitochondriálním či chloroplastovém genomu.

2. Typ repetitivní sekvence

Repetitivní sekvence nejsou definovány jednotně a napříč literaturou se definují jako úseky dlouhé 1-10 (Gemayel et al., 2012), 1-6 (Chen et al., 2006) či 2-6 nukleotidů (Zhang et al., 2014). Takto krátké opakující se sekvence označujeme jako motivy a v souvislosti s jejich uspořádáním se dělí na:

a. jednoduché (simple) repetice

- jednoduchá dokonalá repetitivní sekvence je kontinuální a není přerušena žádnou bází nepatřící do motivu (např. TATATATATATATATA)
- jednoduchá nedokonalá repetice (simple imperfect) - řada je tvořena nestejně dlouhými repeticemi (např. TATATATACTATATA) (Al-Samarai et al., 2015)

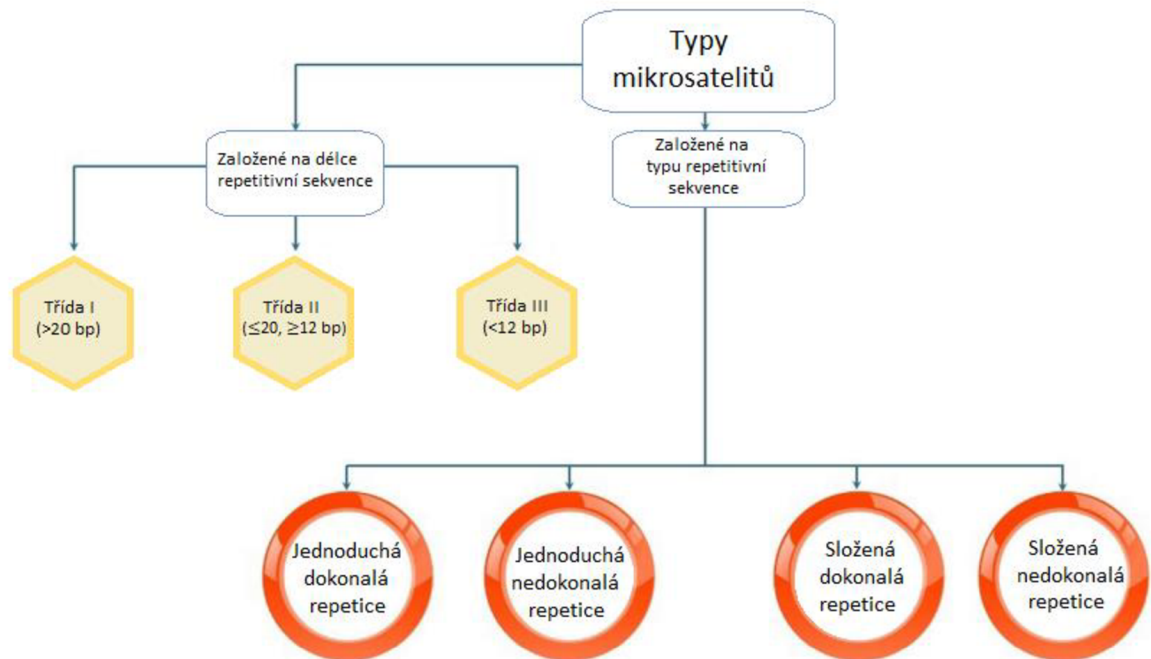
b. složené (compound) repetice

- složené dokonalé repetice jsou složeny z dvou a více repetitivních motivů stejné délky (např. AGAGAGAGCGTGAGAGAGAG)
- složené nedokonalé repetice jsou přerušeny jednou nebo více repeticemi různé délky (např. AGAGAGAGAGTCTCTCTC) (Oliveira et al., 2006, Al-Samarai et al., 2015)

3. Délka mikrosatelitu

Samotný mikrosatelit bez ohledu na délku repetice lze posuzovat dle jeho celkové délky a třídit do jednotlivých tříd:

- I. třída mikrosatelitů - repetice delší než 20 párů bází
- II. třída mikrosatelitů - repetice delší nebo rovných 12 párů bází a kratších nebo rovných 20 párů bází
- III. třída mikrosatelitů - repetice kratší než 12 párů bází (Srivastava et al., 2019)



Obrázek č. 6: Klasifikace mikrosatelitů (převzato a upraveno ze Srivastava et al., 2019).

3.3 Molekulárně genetické metody

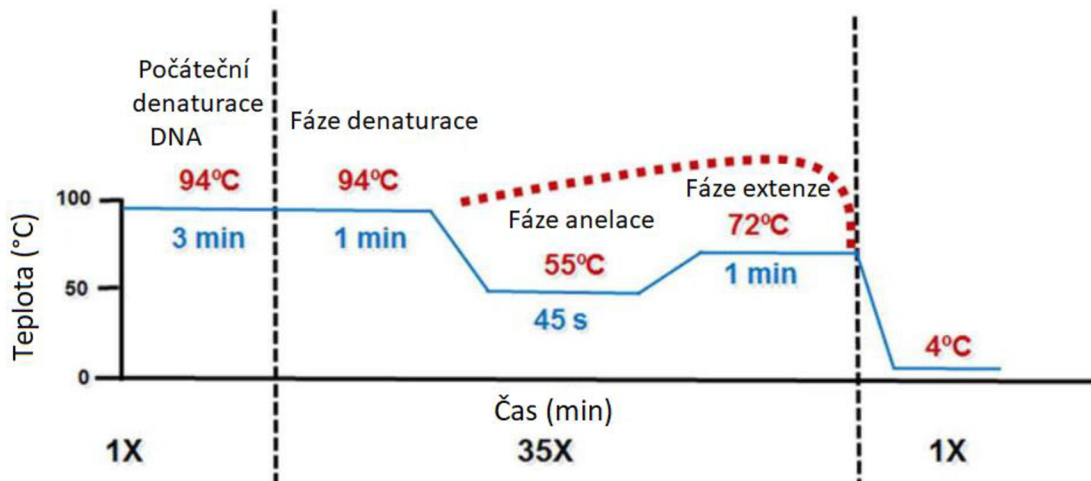
3.3.1 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (PCR, z anglického polymerase chain reaction) je molekulárně genetická metoda používaná pro zmnožení úseků DNA. Objev metody je připisován od roku 1985 americkému chemikovi a držiteli Nobelovy ceny za chemii (1993) Karymu Banksovi Mullisovi (Kaunitz, 2015).

Princip PCR reakce je založen na několikanásobném opakování přirozeného procesu replikace. Vyžaduje přítomnost směsi dNTP (deoxyribonukleosidtrifosfát) nukleotidů, templátové DNA vzorku, synteticky připravených DNA primerů a DNA polymerázy, nejčastěji termostabilní DNA polymerázy z bakterie *Thermus aquaticus*, označované také jako *Taq* polymeráza (Joshi et al., 2011; Garibyan et al., 2013).

Průběh metody v termocykleru má tři fáze (Obr. č. 7). První fází je denaturace, kdy se zahřátím nad 90 °C rozvolní dvouvláknová DNA na dvě samostatná vlákna. Rozvolnění umožní při ochlazování na přibližně 50 °C nasednutí primerů, krátkých definovaných úseků DNA komplementárních k templátu, jež určují, jaké úseky DNA se budou amplifikovat, a proto

druhou fází nazýváme nasedání primerů či annealing. Při třetí, elongační fázi, termocykler zvýší teplotu na 72 °C a DNA polymeráza prodlužuje primery přidáváním komplementárních nukleotidů (Garibyan et al., 2013). Cykly amplifikace se dále podle nastaveného programu opakují 15 - 30krát pro vyšší počet amplikonů, přičemž se při každém cyklu počet specifických částí molekul DNA vzorku zdvojnásobí (Saiki, 1989).



Obrázek č. 7: Teplotní profil PCR reakce (převzato a upraveno ze Shahzad et al., 2020).

3.3.2 Elektroforéza

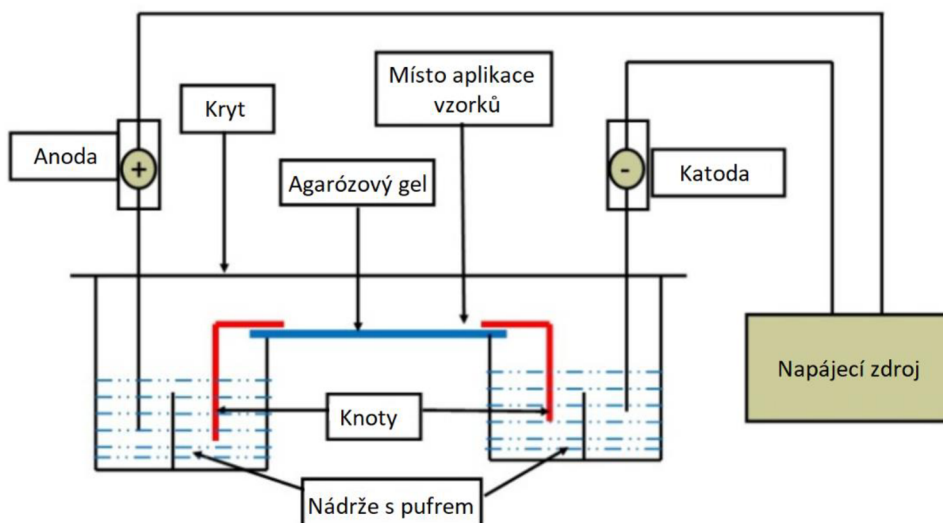
Elektroforéza je laboratorní metoda sloužící k separaci DNA, RNA nebo proteinů, založená na principu separace podle velikosti molekul a velikosti elektrického náboje. Využívá schopnosti nabitých částic pohybovat se v elektrickém poli, které je vytvořeno konstantním stejnosměrným napětím mezi dvěma elektrodami (Anderson, 1989).

3.3.2.1 Agarózová gelová elektroforéza

Agarózová gelová elektroforéza je jednoduchá a efektivní metoda pro separaci, identifikaci a čištění DNA fragmentů o velikosti 0,5 - 25 kilobází. Vzorky DNA se nanášejí do jamek v gelu a po aplikaci proudu DNA fragmenty migrují přitahováním negativně nabitých fosfátů k pozitivně nabitě anodě (Obr. č. 8). Protože DNA molekuly mají stálý poměr velikosti molekuly a velikosti náboje, molekuly se separují na základě velikosti (Lee et al., 2012).

Agaróza je polysacharid tvořený střídajícími se podjednotkami galaktózy a 3,6-anhydrogalaktózy, izolovaný z mořských řas rodů *Gelidium* a *Gracilaria* (Gustavsson, 2003).

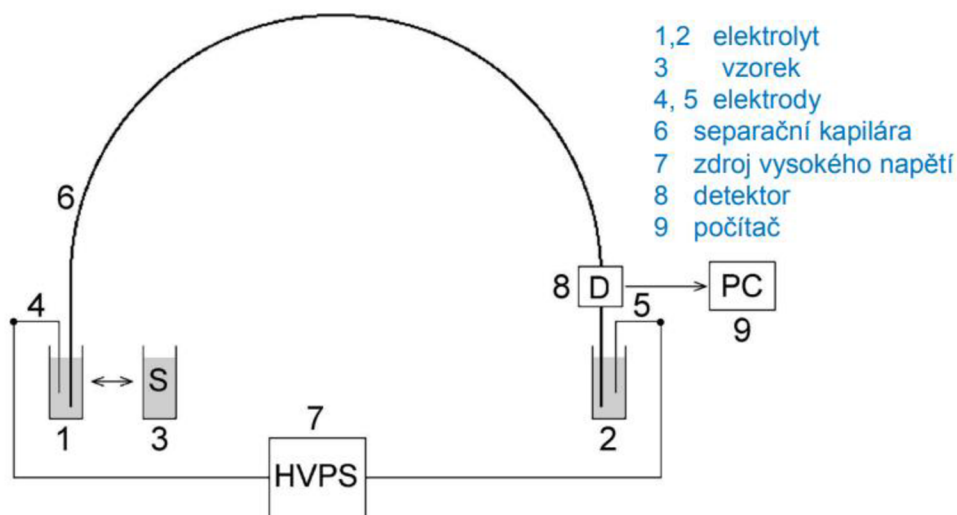
Během tuhnutí gelu mají polymery agarózy schopnost nekovalentně se vázat a vytvářet síť s póry, jejichž velikost určuje propustnost gelu (Lee et al., 2012). Čím větší podíl agarózy je v gelu, tím je síť hustější a fragmenty migrují pomaleji (Magdeldin, 2012).



Obrázek č. 8: Schéma gelové elektroforézy na agarózovém gelu (převzato a upraveno ze Sonagra a Dholariya, 2024).

3.3.2.2 Gelová kapilární elektroforéza

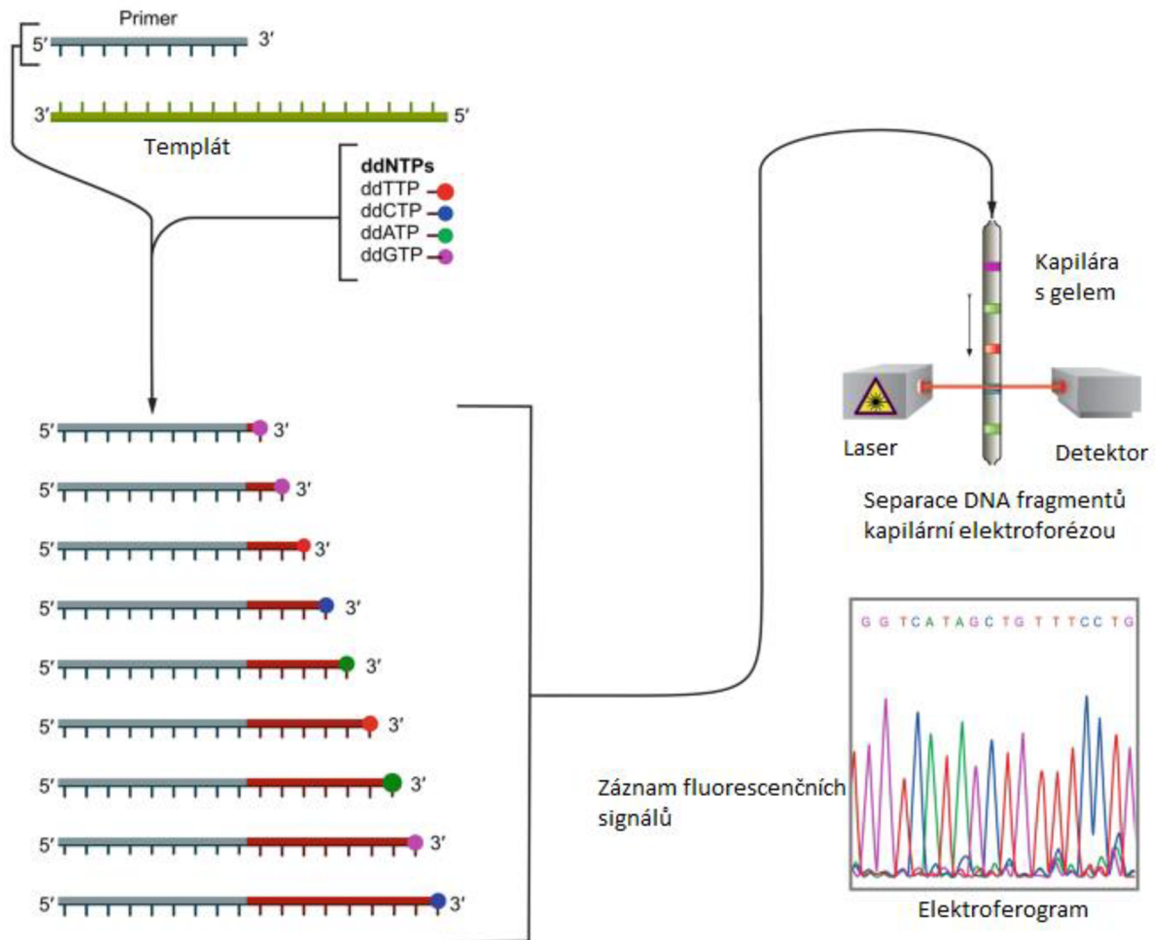
Obdobně jako již zmíněné principy metod je gelová kapilární elektroforéza založena na rozdílné pohyblivosti biomolekul v elektrickém poli. K migraci gelem, často také polyakrylamidovým či agarózovým, ovšem dochází v křemenné kapiláře s délkou mezi 25 a 60 cm a průměrem 25 až 100 μm (Schaeper, 2002). Vnější vrstva kapiláry je potažena ochrannou vrstvou polyimidu, která končí v místě, kde je na kapiláru napojen detektor. Detektor snímá fluorescenční značky navázané na DNA v čase podle velikosti náboje a velikosti fragmentů, menší fragmenty s přesností na jednu bázi projedou kapilárou rychleji a snímány jsou dříve (Freitag, 2000). Kapiláru a detektor doplňuje zdroj vysokého napětí s platinovými elektrodami, nádoba se základním elektrolytem a nádoba se vzorkem (Obr. č. 9) (Schaeper, 2002).



Obrázek č. 9: Schéma přístroje pro kapilární elektroforézu. Převzato z Pyell 2006.

3.3.3 Sekvence DNA

Sangerovo sekvenování, často označováno jako dideoxy sekvenace, je metoda využívající oligonukleotidové primery k vyhledání konkrétního úseku DNA. Po denuraci nukleových kyselin hybridizují navržené primery na jednovláknovou DNA a prodlužují se pomocí směsi deoxynukleotidtrifosfátů (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) a dideoxynukleotidtrifosfátů (ddATP, ddCTP, ddGTP a ddTTP). U dideoxynukleotidtrifosfátů chybí oproti nukleotidtrifosfátům hydroxylová skupina na 3' uhlíku, která při syntéze DNA slouží k vytvoření fosfodiesterové vazby s dalším nukleotidem, a syntéza vlákna v tomto kroku končí (Sanger et al., 1977). Dříve se Sangerova metoda sekvenování prováděla odděleně ve čtyřech vzorcích a využívala různé délky syntetizovaných fragmentů, v dnešní době se pro snadnou detekci každý dideoxynukleotid liší fluorescenční značkou. Detekce ampliconů probíhá v kapilární elektroforéze pomocí laseru a CCD detektoru napojeného na počítač, který snímá fluorescenci ddNTP navázaných na jednotlivé fragmenty a stanovuje pořadí nukleotidů (Obr. č. 10) (Karger a Guttman, 2009).



Obrázek č. 10: Schéma Sangerovy metody s využitím kapilární gelové elektroforézy s výsledným elektroferogramem (převzato a upraveno dle Pasquarelli, 2021).

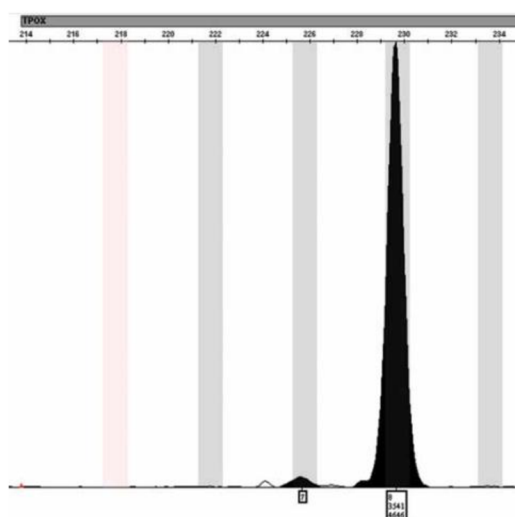
3.3.4 Zkreslení a chybovost dat

PCR je jedna z nejpoužívanějších metod molekulární biologie, přesto není bezchybná a v rámci vyhodnocování vzniklých produktů jsou častými úkazy výskyt nulových alel (1), koktavých produktů (2) či netemplátových adeninů přidaných na konce ampliconů (3).

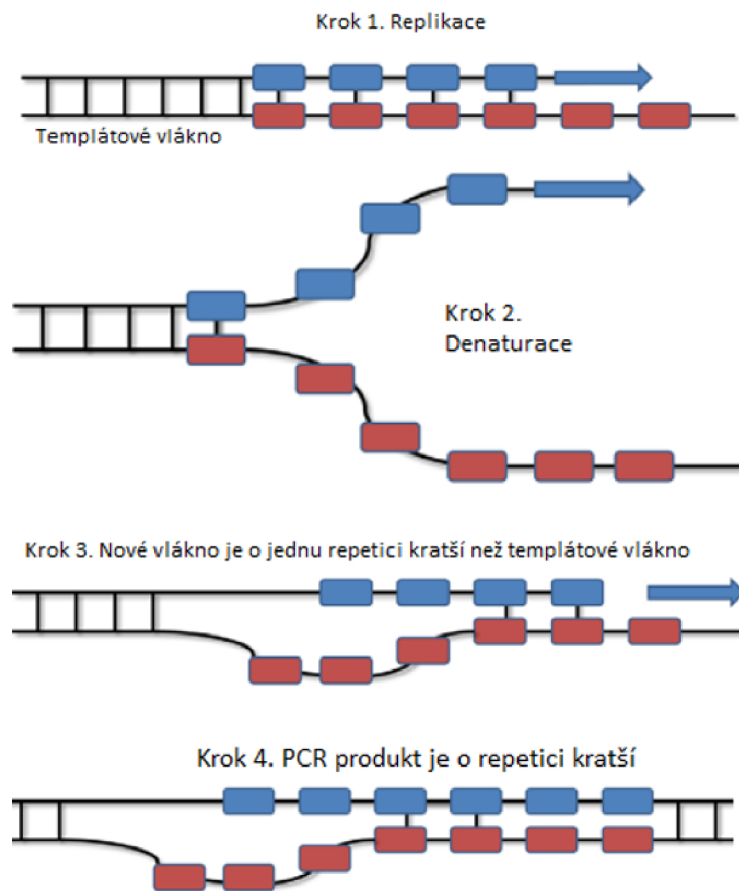
- 1) Nulová alela je termín obecně používaný pro alelu přítomnou ve vzorku, ale neamplifikující při PCR reakci. Konkrétně u mikrosatelitů termín odkazuje nejen na neamplifikující alelu, ale i na alelu málo amplifikující. Příčinou selhání amplifikace je v řadě případů mutace lokalizována v místě, na které nasedá jeden z navržených primerů, vedoucí k syntéze produktu pouze jednoho (či dokonce žádného) vlákna. Protože produkt buď vůbec nevznikl, nebo ho vzniklo malé množství, alela se na následující agaróзовé elektroforéze neprojeví a heterozygoti mohou být mylně

považováni za homozygoty (Yang et al., 2013). Nulové alely mohou dále vznikat rozdíly ve velikostí alelových amplikonů (Wattier et al., 1998). Kvůli kompetitivní povaze PCR se kratší alely často amplifikují efektivněji a více než větší, takže u heterozygotního jedince může být detekována pouze menší ze dvou alel. Takové alely se někdy nazývají „částečné nulové alely“, protože je lze často zviditelnit větším množstvím vzorku (Dakin a Avise, 2004). Třetím zdrojem tohoto jevu může být nekvalitní DNA nebo její malé množství. V některých případech se jedna či více alel neamplifikuje, zatímco u jiných lokusů se mohou amplifikovat relativně snadno ze stejného vzorku. Takové vzorky jsou často také mylně značené jako homozygotní (Gagneux et al., 1997).

- 2) Na elektroferogramu kapilární gelové elektroforézy lze detekovat menší píky v těsné blízkosti požadované cílové alely. Takové píky se označují jako koktavé produkty (Obr. č. 11). Vysoká frekvence chybného párování a mutací SSR úseků nastává při replikaci DNA jak *in vivo*, tak v laboratorních podmínkách. U mikrosatelitů běžně dochází k inzerci či delecii repetice a vznikají kratší či delší nově vzniklé řetězce (Obr. č. 12). Čím větší počet opakování repetice a čím menší velikost opakujících se motivů, tím častěji se koktavé produkty projeví (Shinde et al., 2003).



Obrázek č. 11: Koktavý pik znázorněný na elektroferogramu (Sailus et al., 2012).



Obrázek č. 12: Znárodnění vzniku koktavého píku při PCR reakci (Sailus et al., 2012).

- 3) Častým úkazem je také výskyt přidáných netemplátových nukleotidů. Nejčastěji využívaná a komerčně dostupná *Taq* polymeráza má nežádoucí vlastnost syntézy netemplátového nukleotidu na 3' konci amplikonu, nejčastěji adeninu. Velikost takto postihnutých amplikonů se v dalších metodách projeví o nukleotid delší, než jak byly pomocí primerů navrhnuty (Farrell, 2017).

4 Metodika

4.1 Bioinformatická analýza dat

4.1.1 Návrh mikrosatelitních markerů

Z genomové databáze GenBank Národního centra pro biotechnologické informace (NCBI) byla vyhledána a stažena data referenčního genomu *Myzus persicae* (GCA_001856785.1), sestaveného na úrovni scaffoldů. Ze získaných dat byly vyhledány programem Genome-wide Microsatellite Analyzing Toward Application (GMATA) (Wang, 2016) mikrosatelity dle nastavených parametrů, tedy mikrosatelity sestávající pouze z čistých repetitív o velikosti motivů od tri po hexanukleotidové a s opakováním repetitív v tandemu 7 až 20krát (včetně).

Pro vybrání kvalitnějších potenciálních markerů byl využit program Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Zhang et al., 2000), sloužící k porovnání a vybrání vhodných sekvencí, které nemají podobnost s dalšími místy v genomu. Z dat bylo BLAST programem vybráno přes pět set vhodných potenciálních markerů, které byly v dalším kroku podrobeny výběru programem Primer3 (Untergasser et al., 2007). Tento software slouží k navržení primerů pro PCR. Primery byly selektovány na základě vhodné délky, poměru zastoupení párů guaninu a cytosinu oproti párům adeninu a thymínu, náchylnosti k vytvoření dimerů či vlásenek a hodnoty anelační teploty. Pro testování v laboratoři bylo vybráno 96 lokusů.

4.2 Materiál

Jedinci *Myzus persicae* byli získáni ze sběrů ze sedmi českých polních lokalit z roku 2022. Pro testování bylo vybráno 9 testovacích vzorků z Plzně, Litohlav, Kladna, Valečova, Zábřehu, Brna a Litoměřic. V prvním kole agarózové elektroforézy byly využity vzorky P11, P13 a P14. 2. kolo proběhlo s devíti vzorky, V3, V5, V7, K11, K16, Z3, Z5, P13 a P14.

4.2.1 Izolace DNA

Izolace DNA mšic byla provedena dle protokolu „DNA Protocols for Plants“ (Doyle 1991) po jedné dospělé mšici na zkumavku následujícím postupem:

- 1) Mražený jedinec byl ve zkumavce s 200 μ l CTAB pufru a 2 μ l RNázy rozmělněn skleněnou tyčinkou.
- 2) Do zkumavky bylo přidáno po 2 μ l proteinázy a 2 μ l merkaptoethanolu a směs byla po promíchání inkubována 1 hodinu při 65 °C.
- 3) Po inkubaci bylo přidáno 200 μ l směsi chloroformu a isoamylalkoholu v poměru 24:1 a vzorky byly centrifugovány 10 minut při 12 000 x g. Po centrifugaci byl z každého vzorku odlit supernatant.
- 4) V dalším kroku bylo do každé zkumavky přidáno 200 μ l izopropanolu, následované centrifugací 10 minut při 12 000 x g a odlití horní fáze.
- 5) Poté bylo do zkumavek napipetováno 225 μ l 70% etanolu a 25 μ l octanu. Po 10 minutách centrifugace byl opět odlit supernatant.
- 6) Posledním promývacím krokem bylo přidání 96% etanolu, vzorky byly naposledy centrifugovány a zbaveny supernatantu.
- 7) Nakonec bylo přidáno do zkumavek 20 μ l TE pufru.

Izolovaná DNA byla podrobena kvantifikaci UV spektrofotometrem S-111107 NanoPhotometer (Implen) pro zjištění koncentrace, čistoty a kvality. Měřený roztok byl spektrofotometricky vyhodnocen při vlnových délkách 260 nm a 280 nm, které odpovídají maximální absorpenci pro DNA a proteiny. Z naměřených hodnot byla s využitím Lambert – Beerovým zákona odvozena koncentrace DNA, která byla pro další účely u každého vzorku naředěna na 0,25 ng/ μ l.

4.3 Design testování vybraných lokusů

Lokusy byly testovány po jednotlivých vzorcích ve třech krocích. V prvním kroku byly amplikony tří vzorků mšic testovány gelovou elektroforézou ve 2% agarózovém gelu pro ověření amplifikace. Vyřazeny tak byly neamplifikující markery nebo markery s nespecifickými amplikony a dimery. Zároveň byla ověřena předpokládaná velikost ampliconů (od 104 bp do 310 bp), která byla odvozena od hmotnostního standardu GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA).

Druhým krokem byly potenciální markery selektovány na 4% agarózovém gelu na devíti jedincích. Byla tak ověřena schopnost amplifikace na dalších devíti vzorcích a zároveň vybrány markery vykazující polymorfismy. Markery byly dále sekvenovány Sangerovou dideoxyterminační metodou firmou Eurofins Genomics. Pouze kvalitně osekvenované vzorky byly v posledním kroku podrobeny kapilární elektroforéze, pro něž byly zakoupeny fluorescenčně značené primery (Generi-Biotech, ČR).

4.3.1 PCR

Polymerázová řetězová reakce byla provedena po jednotlivých lokusech ve dvou provedeních v závislosti na cílové aplikaci:

1. Amplifikace mikrosatelitů pro následné ověření na gelové elektroforéze s reakční směsí o objemu 10 μ l s následujícím složením: 0,25 ng DNA, 0,2 μ M forward primeru, 0,2 μ M reverse primeru, 3 μ l ddH₂O a 1x Multiplex PCR Plus Kit (Qiagen). Polymerázová řetězová reakce probíhala v termocykleru C-1000 (Bio-Rad) (obrázek č. 12) a podmínky amplifikace jsou uvedeny v tabulce č. 1.
2. Amplifikace markerů pro ověření na kapilární elektroforéze s reakční směsí o objemu 10 μ l s následujícím složením: 0,25 ng DNA, 0,2 μ M fluorescenčně značeného forward primeru, 0,2 μ M reverse primeru, 3 μ l ddH₂O a 1x Multiplex PCR Plus Kit (Qiagen). Polymerázová řetězová reakce probíhala též v termocykleru C-1000 (Bio-Rad) a podmínky amplifikace, uvedeny v tabulce č. 2, se oproti prvnímu kroku liší nižším počtem cyklů a přidanou elongační fází po posledním cyklu. Jelikož *Taq* polymeráza přidává náhodně netemplátový nukleotid na konec některých ampliconů, elongační fáze rovněž slouží k rovnoměrnému navázání adeninů na poslední nukleotid všech fragmentů.

Fáze	Teplota (°C)	Čas (min)	Počet cyklů
Predenaturace	95	5	1
Denaturace	94	0,5	34
Anelace	60	1,5	34
Elongace	72	1	34
Postelongace	72	10	1

Tabulka č. 1: Podmínky amplifikace markerů pro ověření na gelové elektroforéze

Fáze	Teplota (°C)	Čas (min)	Počet cyklů
Predenaturace	95	5	1
Denaturace	94	0,5	29
Anelace	60	1,5	29
Elongace	72	1	29
Postelongace	60	80	1

Tabulka č. 2: Podmínky amplifikace markerů pro ověření na kapilární elektroforéze

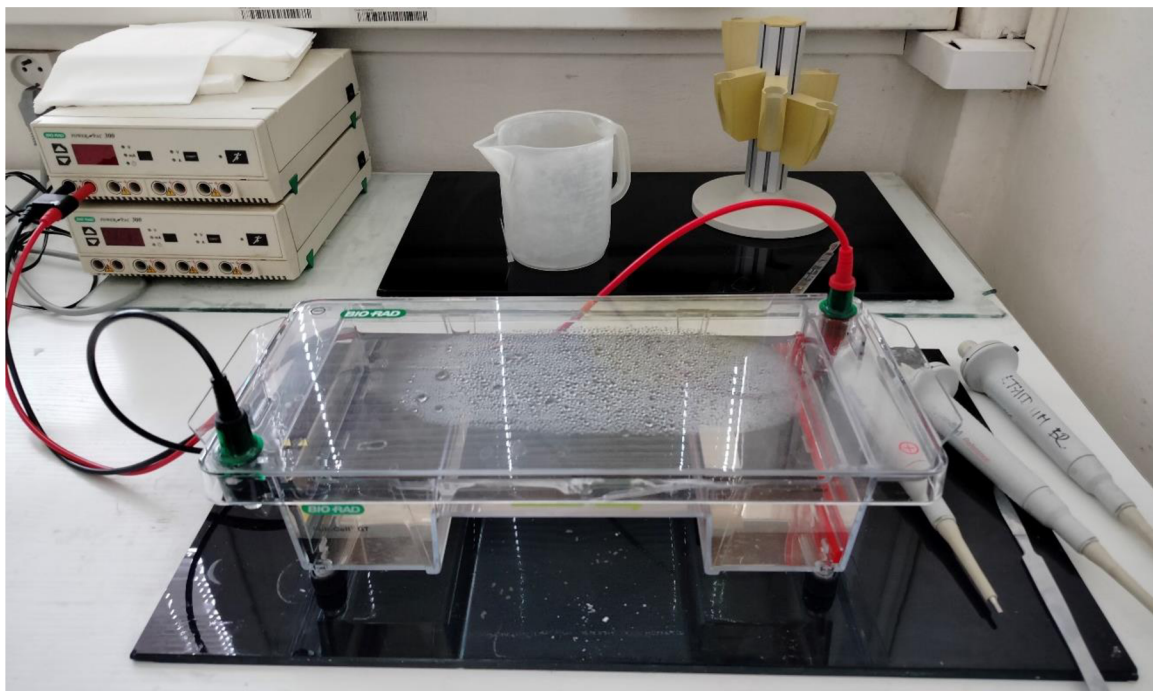


Obrázek č. 13: Termocycler C1000 (Bio-Rad).

4.3.2 Elektroforéza

4.3.2.1 Agarózová elektroforéza

Agarózová elektroforéza byla využita pro ověření amplifikace navržených markerů. Separace ampliconů probíhala v prvním kroku v 2% agarózovém gelu a v druhém kroku, pro větší přesnost, ve 4% agarózovém gelu. Vzorky byly obarveny ethidium bromidem a následně separovány v gelu ponořeném v 1x TBE pufru v cele SubCell GT (Bio-Rad) při napětí 5 V/cm (Obr. č. 14). Pro relativní porovnání velikostí byly vzorky doplněny hmotnostním standardem, naředěným ve směsi: 1 μ l hmotnostní standard GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA), 6 μ l ddH₂O a 3 μ l barvy (20% sacharóza, 0,05% bromenolová modř, 0,05% xylencyanolová modř). Separované vzorky byly vizualizovány UV transiluminátorem a snímky pořízeny digitální kamerou přístroje GelDoc XR (Bio-Rad). Fotografie byly dále zpracovány programem Quantity One ver. 4.6.2 (Bio-Rad, USA).



Obrázek č. 14: Cella SubCell GT pro agarózovou elektroforézu.

4.3.2.2 Sekvence

Vybrané lokusy byly naamplifikovány ve dvou až tří kopiích na vzorek a následně rozděleny na agarózové elektroforéze v 1% agarózovém gelu. Markery byly vyřezány pomocí skalpelu a následně vyčištěny pomocí GeneJET Gel Extraction kitu (Thermo Fisher Scientific, USA) dle manuálu.

4.3.2.3 Kapilární gelová elektroforéza

Pro kapilární gelovou elektroforézu byly testovány lokusy, které se projevily na agarozové elektroforéze jako polymorfní a které byly kvalitně osekvenovány Sangerovou metodou. Sekvence byla potřebná pro ověření, zda skutečně amplifikují námi vybrané lokusy, nebo jiné místo v genomu. Pro fragmentační analýzu bylo po amplifikaci (viz tabulka č. 2) do každé zkumavky připraveno 1 μ l amplifikovaného vzorku, 12 μ l formamidu a 0,25 μ l hmotnostního standardu GeneScan™ 600 LIZ™ dye Size Standard ver. 2.0 (Thermo Fisher Scientific, USA). Připravené vzorky byly denaturovány v termocykleru C-1000 (Bio-Rad) na pět minut při 95 °C a následně zchlazeny na 4°C. Formamid zde slouží ke stabilizaci jednovláknové DNA a hmotnostní standard umožňuje porovnání velikostí fragmentů.

Fragmentační analýza byla provedena v analyzátoru ABI PRISM 310 (Life Technologies, USA) znázorněném na obrázku č. 15. Vzorky byly separovány kapilárou o rozměrech 47 cm x 50 μ m z křemičitého skla. Podmínky separace byly nastaveny pomocí programu Datacollection software ver. 310. Nástřik byl nastaven na pět sekund s napětím 10kV. Napětí při separaci bylo zvýšeno na 15kV při teplotě 60 °C po dobu 1680 s.



Obrázek č. 15: Genetický analyzátor ABI PRISM 310 pro kapilární elektroforézu.

4.3 Statistická analýza a zpracování dat

Výsledky bioinformatické analýzy a jejich interpretace v jednotlivých krocích byly zpracovávány v programech Microsoft Excel Microsoft 365 a Libre Office 2024. Výsledky sekvenace byly zpracovávány programy BioEdit ver. 7.2 a Ugene ver. 50.0 (Okonechnikov et al. 2012). V posledním kroku byly výsledky fragmentační analýzy zpracovány programem GeneMapper ver. 4.1.

5 Výsledky

5.1 Výsledky bioinformatické analýzy

Bioinformatickou analýzou byly vyhledány mikrosatelity z celého referenčního genomu mšice o velikosti 347,3 Mb. Programem GMATA bylo v prvním kroku nalezeno celkem 42 266 mikrosatelitů. Vybrané mikrosatelity obsahující tri až hexanukleotidové motivy měly největší zastoupení trinukleotidových (94,8 %) a tetranukleotidových (4,1 %) motivů. Pentanukleotidové zastupovaly necelé procento (0,9 %) a hexanukleotidových motivů bylo nejméně (0,2 %), viz tabulka č. 3.

Délka motivu (nt)	3	4	5	6
Počet lokusů	40054	1726	398	88

Tabulka č.3: – Délky motivů potenciálních markerů v nukleotidech vybraných programem GMATA.

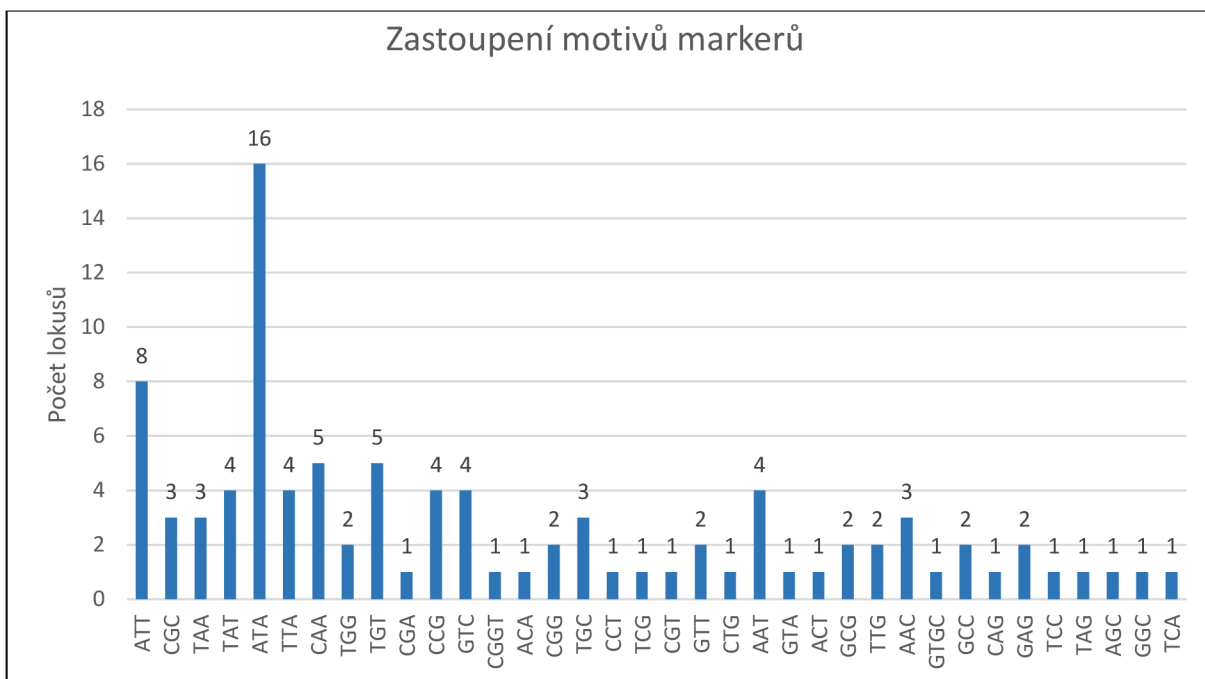
Z těchto dat bylo dále na základě srovnání podobnosti sekvencí v genomu vybráno programem BLAST 548 jedinečných markerů, z toho 539 (98 %) s trinukleotidovým motivem, 7 s tetranukleotidovým a pouze 2 s pentanukleotidovým, znázorněných v tabulce č. 4:

Počet repetice	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	19	20
Tri	191	152	77	52	28	15	7	4	5	2	4	1	1
Tetra	6	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Penta	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabulka č.4: Zastoupení dle počtu repetice potenciálních markerů vybraných programem GMATA.

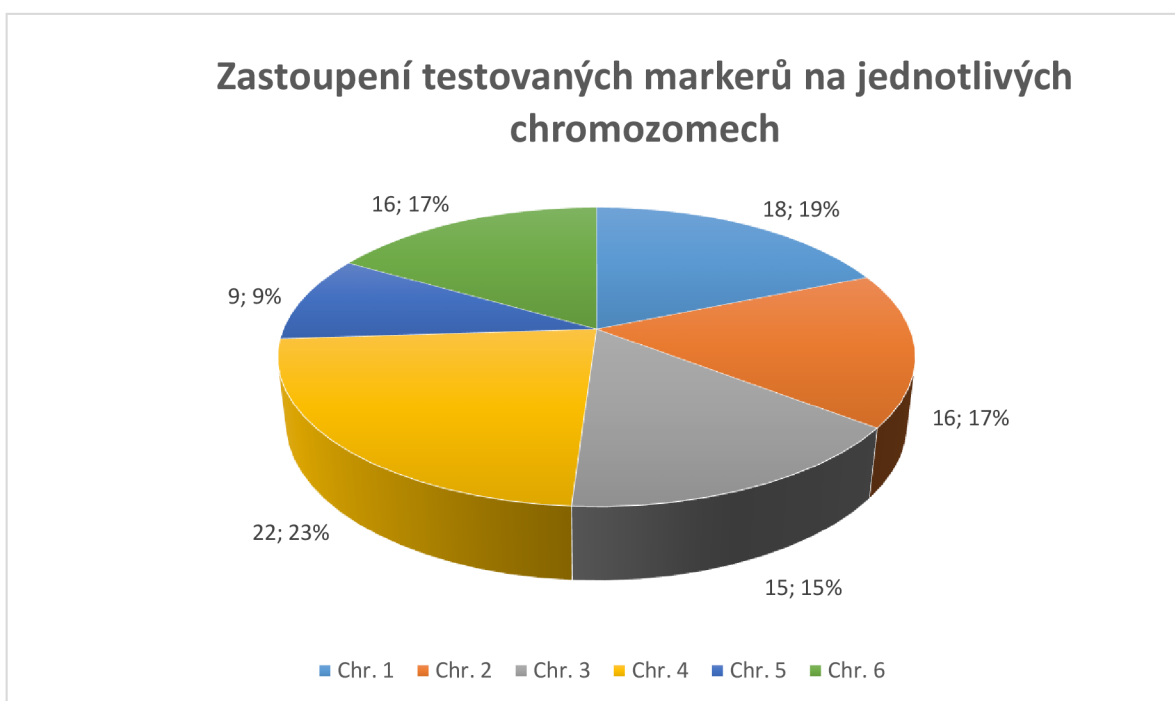
(Tri = trinukleotidové, Tetra = tetranukleotidové, Penta = pentanukleotidové)

V posledním kroku byly s pomocí programu Primer3 navrženy primery pro 96 vybraných lokusů, které se dále testovaly v laboratoři. Z hlediska délky motivu měly převažující zastoupení trinukleotidové mikrosatelity (98 %) a pouze dva mikrosatelity obsahovaly tetranukleotidový motiv (2 %), jak je znázorněno na grafu č. 1.



Graf č. 1: Zastoupení jednotlivých motivů u vybraných 96 markerů.

Vybrané potenciální markery se nachází na všech chromozomech včetně největšího a zároveň pohlavního chromozomu X. Nejvíce markerů náleží čtvrtému chromozomu a nejméně jich je součástí pátého chromozomu (Graf č. 2).

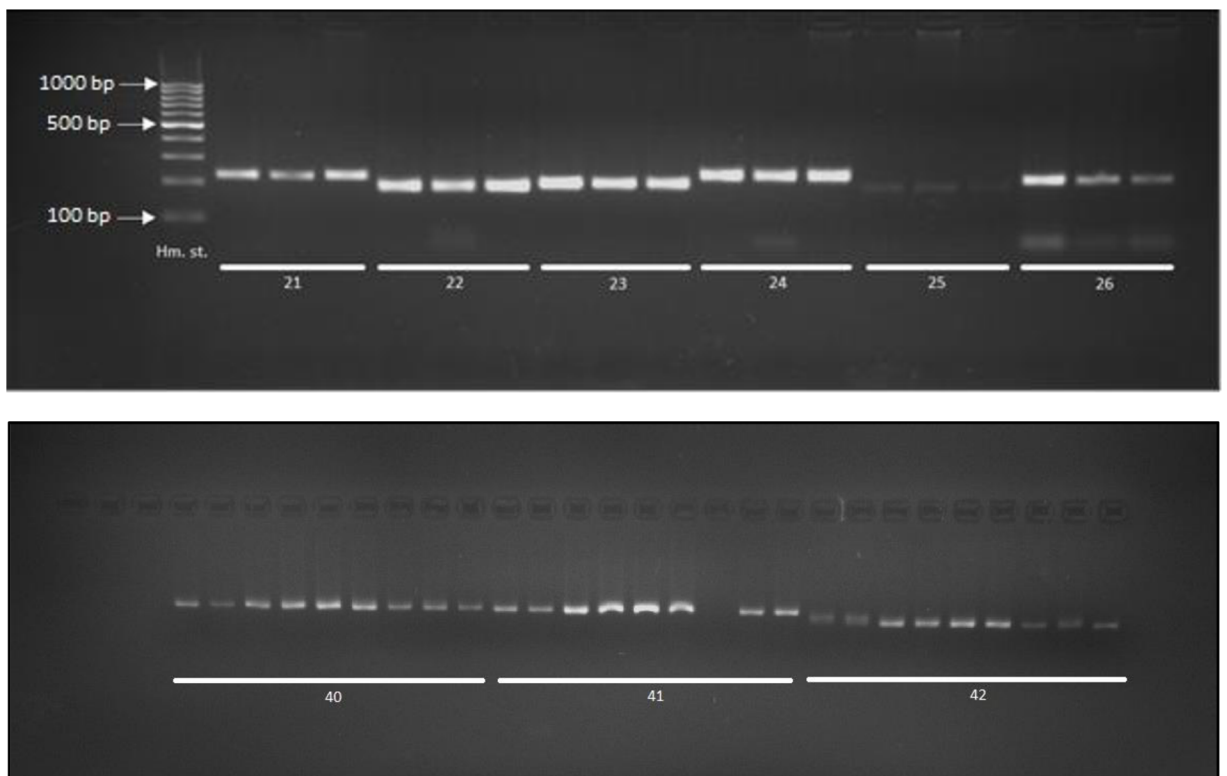


Graf č. 2: Umístění 96 testovaných markerů v genomu.

5.2 Testování navržených markerů v laboratoři

5.2.1 Testování navržených markerů na agarózové elektroforéze

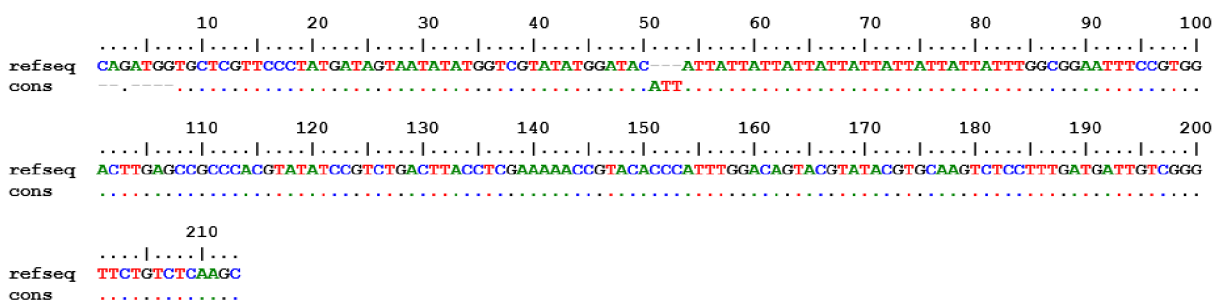
Testování agarózovou elektroforézou bylo provedeno ve dvou krocích. V prvním byly vzorky tří jedinců testovány na 2% agarózovém gelu, kdy z 96 počátečních lokusů amplifikovalo 78, tedy 81,3 % (Obr. č. 16). Tyto lokusy byly dále testovány na 4% agarózovém gelu na devíti jedincích a ze 78 lokusů se ukázalo polymorfních a amplifikujících 33, což odpovídá 34,4 % z celkového množství markerů.



Obrázek č. 16: Ukázka 1. a 2. kola testování na agarózovém gelu. 1. kolo proběhlo na 2% agarózovém gelu s hmotnostním standardem GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Hm. st.) pro ověření velikosti a schopnosti amplifikace na jedincích P11, P13 a P14. 2. kolo proběhlo na devíti jedincích, V3, V5, V7, K11, K16, Z3, Z5, P13 a P14 bez nutnosti ověřovat si velikost mikrosatelitů a tedy bez hmotnostního standardu.

5.2.2 Sekvence

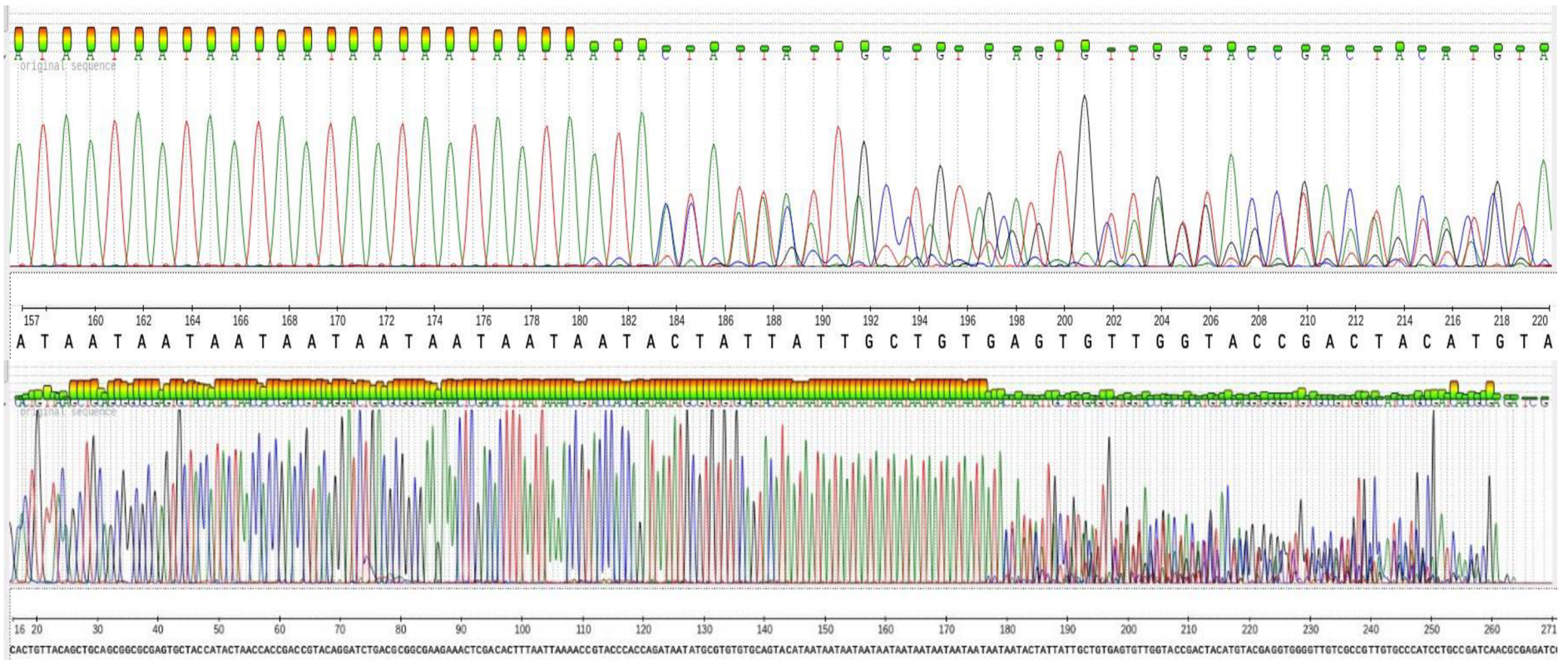
V dalším kroku bylo vybraných 33 lokusů sekvenováno firmou Eurofins Genomics, a pouze 20 z nich, tedy 20,8 % z celkového počtu markerů, bylo kvalitně osekvenováno pro následnou selekci na kapilární elektroforéze. Výsledky všech sekvenací jsou znázorněny v příloze v tabulkách č. 6-13. Níže (Obrázek č. 17) je ukázka výsledku sekvenování, který znázorňuje kvalitně osekvenovaný marker. Z celkového počtu 20 markerů bylo 13 markerů vyřazeno, jelikož nebyly osekvenovány v dostatečné kvalitě. Takový příklad, zpracovaný v programu Ugene (Okonechnikov et al., 2012), je znázorněn na obrázku č. 18.



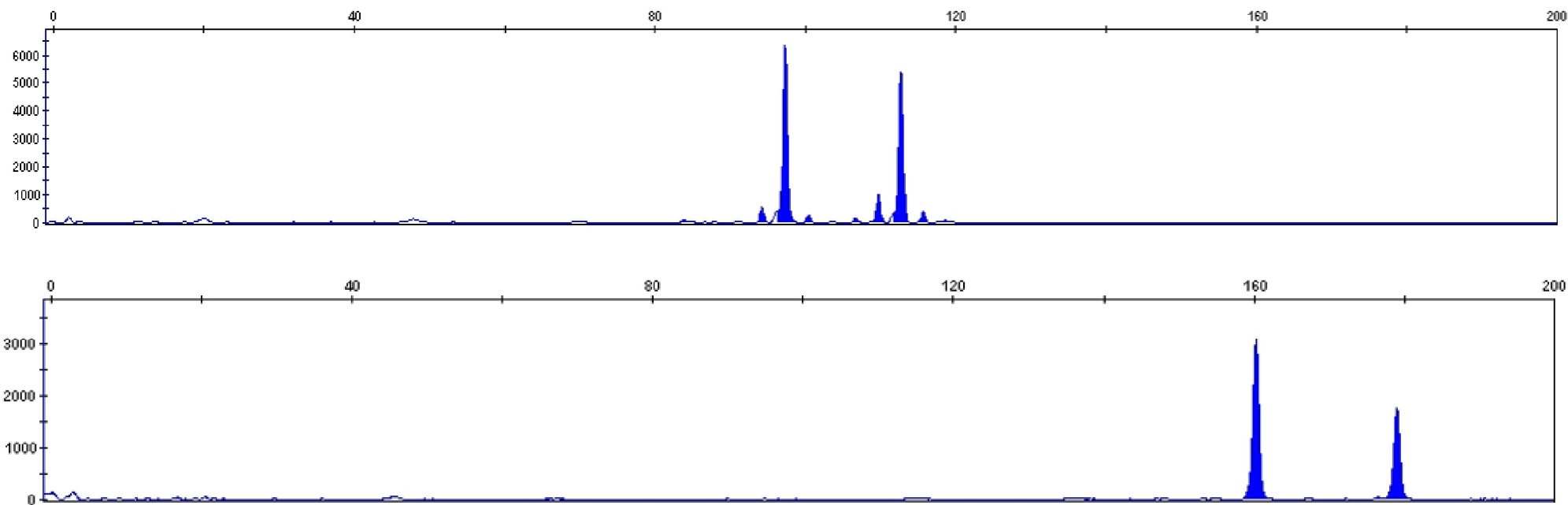
Obrázek č.17: Osekvenovaný marker Myzper-64. Referenční sekvence (refseq) markeru Myzper-64 byla srovnána s výslednou (cons = consensus) sekvencí u vybraného jedince (cons). Tečky v druhém řádku znamenají shodu s referenční sekvencí, změny v sekvenci se značí písmenkem odpovídajícím bázi nukleotidu. Mikrosatelit referenční sekvence je o trojici nukleotidů ATT kratší.

5.2.3 Testování navržených markerů na kapilární elektroforéze

V posledním kroku bylo 20 osekvenovaných markerů testováno pomocí fragmentační analýzy na kapilární elektroforéze, a závěrem z nich bylo vybráno 17 markerů (17,7 % z celkového počtu) odpovídající kvality, vykazujících polymorfismus s možností reprodukovatelnosti v dalších laboratořích. Pouze jediný z markerů (Myzper-61) sestává z tetranukleotidového motivu (5,6 %) a u 16 zbývajících markerů (94,4 %) se vyskytují různé trinukleotidové motivy. Výsledky fragmentační analýzy jsou znázorněny na obrázku č. 19. Umístění markerů v genomu, jejich velikosti a navržené primery jsou shrnuty na následujících stranách v tabulce č. 5 a grafu č. 3. Výsledky fragmentační analýzy jsou uvedeny v příloze v obr. č. 20-23.



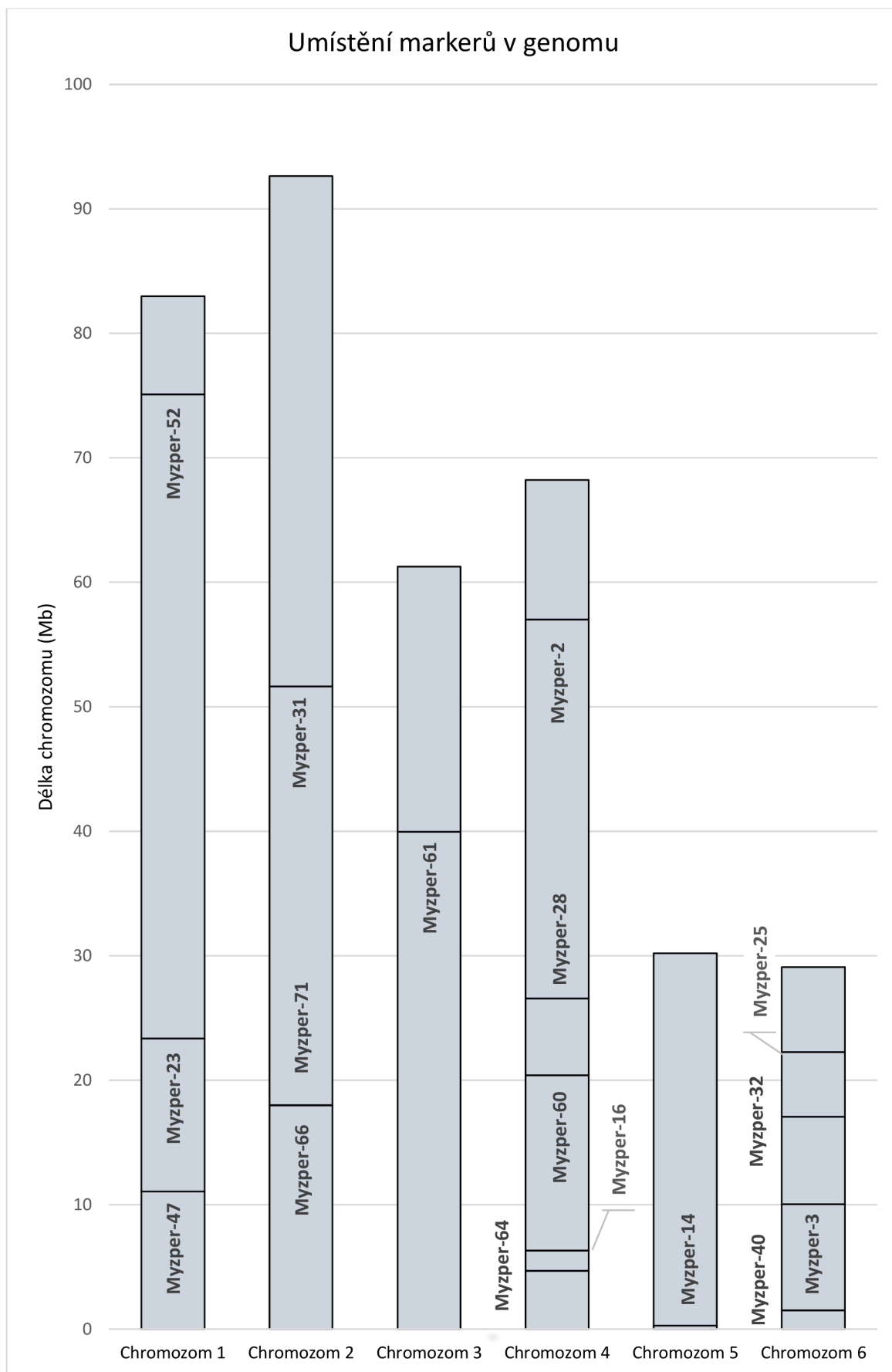
Obrázek č.18: Nekvalitně osekvenovaný marker Myzper-11. První obrázek znázorňuje přibližný úsek opakujícího se motivu ATA, následovaný nerozpoznatelnou sekvencí. Druhý obrázek znázorňuje celý osekvenovaný marker.



Obrázek č. 19: Fragmentační analýza markerů Myzper-3 a Myzper-52. Vyšší píky znázorňují alely, menší píky na prvním obrázku koflavé produkty.

Marker	Motiv	Počet repetice	Umístění	Velikost markeru (bp)	F primer (5' – 3')	R primer (5' – 3')
Myzper-2	CGC	7	chromozom 4	138	GGTCCTCTATTAGCCTCCGC	ATAGAGCAACAGCAGCACCG
Myzper-3	TAA	17	chromozom 6	119	GTATACCTGCGCACCGAGTT	AGTCATGGTCAGCACAGTCG
Myzper-14	ATT	8	chromozom 5	146	TCCGAGGGTAGGTAGGTATATCC	CCTGCTCCACTTCCCCTA
Myzper-16	GTC	8	chromozom 4	147	CATTTTGCAGACAGACGCC	AGGTATATAATGTCCGCTGAGAAGA
Myzper-23	TAT	12	chromozom 1	220	ACTAATTGCCGAATGTGCG	GGTCGTCCAGTTCATTCTTACT
Myzper-25	CAA	7	chromozom 6	181	GTCCAACCCTAACCGCTACT	GGGTGTTGTATGCTGGGAAC
Myzper-28	TGC	12	chromozom 4	189	CACTCACGTTTAGTTGCGGG	TGCTTCTTTGCTTGCTGGAA
Myzper-31	TCG	8	chromozom 2	236	ATGCAGCGACCTCCAAATG	TTATTGTTCTGCTCGCACGG
Myzper-32	CGT	7	chromozom 6	209	ATCCACCCACGCAACAAC	CAGAAAACGAAAGGGGACG
Myzper-40	CTG	11	chromozom 6	196	GGATGTGGGTGTGTACGAGTA	CCGGGATAGAGTAAGGCAAAG
Myzper-47	ATA	10	chromozom 1	230	TGACCCACACACGGAATTTAT	CATACACCTTTGGCGGAATC
Myzper-52	GCG	9	chromozom 1	187	GCAGCGATCAACATCAAACG	CCACTGTCCCGAATTGTAGC
Myzper-60	ATT	8	chromozom 4	224	AGTACCCTCCTTTTCGGTAC	GATGTCGCTCGCTCACAAG
Myzper-61	GTGC	7	chromozom 3	228	GCAGCCAAAGTTTCGTTTACC	ACGCCTTGGGTTGATTTACA
Myzper-64	ATT	10	chromozom 4	210	CAGATGGTGCTCGTTCCTA	GCTTGAGACAGAACCCGACA
Myzper-66	AAT	10	chromozom 2	213	CGGCTTTGATGTCGTTAATGAG	CATGTTACACGCACGCTGG
Myzper-71	TCC	8	chromozom 2	276	GAAACCACTAGCACTCGACG	TGCTTTGGTGGTGTCTCTCA

Tabulka č. 5: Charakteristika 17 vybraných markerů spolu s navrženými primery.



Graf č. 3 – Pozice 17 markerů v genomu (Mb = megabáze).

6 Diskuze

Mikrosatelitní markery jsou významným nástrojem genetického výzkumu se širokou škálou uplatnění. Napříč všemi říšemi umožňují studium genetické rozmanitosti a struktury populací. Mohou být použity k určení příbuzenských vztahů mezi jedinci a k vytvoření genealogických stromů, ve forenzní vědě jsou využívány k identifikaci jednotlivců. Používají se pro monitoring dědičnosti genetických onemocnění a v chovu zvířat ke sledování genetického původu a výběru rodičů s požadovanými vlastnostmi.

Jelikož je mšice broskvoňová významným škůdcem zemědělských rostlin s kosmopolitním výskytem, těší se pozornosti vědeckých týmů z více zemí světa. Databáze Scopus uvádí na téma mikrosatelitních markerů mšice broskvoňové 27 publikovaných článků. Studie se zaměřují zejména na populační analýzy a rezistenci na insekticidy, orientované na ochranu zemědělských plodin. Další studie se věnují díky determinovému typu XO pohlaví u mšice mechanismu segregace chromozomů při buněčném dělení a přenosu pohlavních chromozomů. Mšice je navíc schopna reagovat na specifické podněty prostředí a měnit tak vývoj svého potomstva, vše pomocí epigenetických modifikací chromatinu, a pro studie epigenetiky a polyfenismu¹ se v poslední době stává modelovým organismem. Lze proto předpokládat široké využití navržených SSR markerů ve více biologických odvětvích.

Z 27 vyhledaných článků se ani jeden nezabývá návrhem mikrosatelitních markerů mšice *de novo* a v rámci této práce není možné provést srovnání výsledků s jinými studii na stejné téma. Studie zabývající se analýzou mikrosatelitních markerů mšic často srovnávají markery jiného druhu, nebo odkazují na nepublikované zdroje (např. (Sloane et al., 2001; Margaritopoulos et al., 2007)).

Výsledky lze nicméně srovnat se studii zaměřenými na jiné druhy. Například Bazsalovicsová a kolektiv (2018), navrhuující mikrosatelitní markery tasemnici *Dibothriocephalus latus*, vybrali z 6020 kandidátních mikrosatelitů 122 pro testování v laboratoři. 78 markerů vyhodnotili jako optimální (63 %). Jelikož je tasemnice hermafrodit a je schopná samooplození, pouze 6 (5 %) z testovaných lokusů vykazovalo polymorfismus. Studie zabývající se rostlinou *Aconitum carmichaelii* z čeledi pryskyřníkovitých uvádí 55 lokusů získaných bioinformatickou analýzou pro testování v laboratoři, ze kterých získali 14

¹ Polyfenismus je vzhledová odlišnost různých generací jednoho druhu, nazývaná také sezónní polymorfismus.

(25 %) vhodných lokusů s vysokým polymorfismem a vysokým počtem průměrného počtu alel na lokus (4,85), u rostlin běžných (Yang et al., 2017). Lze proto konstatovat, že návrh a optimalizace nových markerů jsou velmi variabilními procesy a liší se v závislosti na vybraném druhu a říši.

6.1 Bioinformatická analýza

S pomocí bioinformatické analýzy a zejména s využitím nedávno složeného genomu mšice broskvoňové na chromozomální úrovni lze konstatovat, že vyhledání mikrosatelitů a návrh jejich primerů umožňují využití softwarů rychle a jednoduše. Ze 42 266 nalezených mikrosatelitů bylo díky přísným kvalitativním parametrům vybráno „pouze“ 96 potenciálních markerů, jejichž primery nasedaly, ve většině případů, bezproblémově a při PCR reakci docházelo k požadované amplifikaci lokusů. Využití programy lze proto požadovat za efektivní a potvrzují to studie na podobné téma, které používají stejné či obdobné softwary ve stejném sledu i složení (Losada et al., 2023; Taheri et al. 2018). Setkat se lze s různými variacemi, např. s doplněním o program “CLC Genomics Workbench”, který podle referenčních genomů odstraní mitochondriální a ribozomální sekvence (Ariede et al., 2018). Některé studie ovšem používají mitochondriální mikrosatelitní markery, neboť mají haploidní charakter, jsou děděny maternálně a vykazují vysokou variabilitu (Behura, 2006). U hmyzu lze navíc aplikovat univerzální primery díky vysoce konzervovaným mitochondriálním sekvencím (Roehrdanz, 1993). Naopak chromozomální mikrosatelitní markery jsou často druhově specifické a oproti mitochondriálním zpravidla nejsou aplikovatelné mezi různými taxony (Senan et al., 2014).

Jelikož analýza markerů v této práci byla založena na osekvenovaných chromozomech, potenciální komplikace s mitochondriálním genomem byly jednoduše vyřešeny jeho odstraněním z analyzovaných sekvenčních dat. Problémové by se ovšem mohlo zdát umístění markerů na pohlavním chromozomu X, na kterém se nachází tři vybrané markery (Myzper-31, Myzper-66 a Myzper-71). Dědičnost pohlavních chromozomů neodpovídá mendelistickým pravidlům dědičnosti, a svým umístěním tak neodpovídají vlastnostem, které by měly pro markery všeobecně platit. Nicméně v rámci studií zabývajících se dědičností pohlavního chromozomu X a segregace chromozomů při buněčném dělení byly použity právě mikrosatelitní markery ležící na chromozomu X (Wilson et al., 2014), a proto by měly být zařazeny do výsledných markerů.

6.2 Optimalizace

Izolace DNA mšic byla provedena dle protokolu „DNA Protocols for Plants“ (Doyle 1991). Jedná o osvědčenou metodu a izolace proběhla bez komplikací, nicméně problémovou částí se ukázalo měření UV spektrofotometrem S-111107 NanoPhotometer (Implen), který sloužil k naměření koncentrace a čistoty nukleových kyselin. Byť by podle naměřené koncentrace měly všechny vzorky po odvozeném zředění odpovídat stejné koncentraci, v průběhu optimalizace některé vzorky předpokladu neodpovídaly. Koncentrace v průběhu většiny metod nezkreslila výsledky, komplikace se ukázala až na fragmentační analýze, kdy se při vysoké koncentraci DNA vyskytly vzorky s tzv. „offscale píky“, tedy vzorky s příliš intenzivním signálem, který komplikuje zejména u multiplexových analýz vyhodnocení dat. U takových vzorků bylo nutné fragmentační analýzu na kapilární elektroforéze zopakovat.

Izolovaná DNA byla amplifikována a primery navržené programem Primer3 se ukázaly být navrženy efektivně, neboť ve většině případů lokusy při PCR reakci úspěšně amplifikovaly (81,25 %). U amplikonů, u kterých k amplifikaci nedošlo, lze diskutovat o výskytu nulových alel (zmíněných v podkapitole 3.3.4. Zkreslení a chybovost dat). Přestože lze jev ověřit, metody jsou časově náročné a v rámci této práce nebyly využity. Úspěšnost PCR reakcí proto mohla být potenciálně vyšší, než uvádí výsledky publikované v této práci.

Následná vizualizace a separace amplikonů gelovou elektroforézou lze také považovat za velmi efektivní. Některé studie využívají dražší alternativu, separaci na akrylamidovém gelu, pro lepší rozlišení (Anderson et al., 2002; Malloch et al., 2006).

Dalším krokem optimalizace byla sekvenace DNA, sloužící k ověření specifiity amplifikace. Výsledky sekvenace mimo jiné potvrdily, že v rámci repetitivního genomu se nejčastěji mezi populacemi setkáme s rozdílem délky v repetitivních úsecích o tři nukleotidy. Délka motivu je nejspíš založená na zachování čtecího rámce před kódující sekvencí.

Co se posledního kroku optimalizace týče, konvenčně bývá polymorfismus mikrosatelitů analyzován pomocí fragmentační analýzy prováděnou kapilární gelovou elektroforézou. Nehledě na to, že je to časově a finančně náročná metoda, nedokáže ukázat plný polymorfismus lokusů, protože neurčuje pořadí bází daného fragmentu, ale pouze rozdíly ve velikosti produktů. Jako řešení se nabízí sekvenování nové generace (NGS), schopné vysokokapacitní sekvenace. V takovém případě by bylo nutné připravit knihovnu pro aplikaci primerů se speciálně navrženými adaptory. Sekvenování pomocí NGS místo použití sekvenování Sangerovou

metodou následovanou fragmentační analýzou na kapilární elektroforéze by proto bylo ještě finančně náročnější. NGS navíc zatím není na optimální úrovni a potýká se s jednonukleotidovými polymorfismy a složenými repeticemi, což je v práci s mikrosatelity zásadní překážka (Dashnow et al., 2015).

Kromě možnosti aplikace NGS pro urychlení navrhnutí a optimalizace markerů lze také usnadnit a urychlit jejich použití vytvořením multiplex PCR. Termín multiplex označuje metodu PCR, která umožňuje amplifikaci více cílových sekvencí současně v jedné reakci. S výsledky z fragmentační analýzy na kapilární elektroforéze lze takové multiplexy navrhnout. V principu je zapotřebí do jednoho multiplexu navrhnout více markerů podle jejich konkrétních primerů, např. podle podobné T_m (teploty tání) primerů, a zároveň tak, aby nemohlo docházet k dimerizaci. Výsledky práce jsou pro tento návrh optimální, z časových důvodů se jej nicméně nepodařilo navrhnout.

Další kroky by se kromě multiplexu mohly zabývat také rozšířením množství vzorků, neboť přístupné vzorky byly pouze ze sedmi lokalit české republiky. Mšice je nicméně kosmopolitní a markery by měly být rozšířeny o více polymorfních zástupců.

7 Závěr

Na závěr lze konstatovat, že všechny stanovené cíle byly v rámci diplomové práce splněny. Jejich stručný přehled je shrnut v následujících bodech:

- Byly vyhledány nové kandidátní lokusy prostřednictvím genomových databází a prostřednictvím bioinformatické analýzy byly vybrány markery pro testování v laboratoři.
- Vybraným markerům byly navrženy odpovídající primery a pomocí molekulárně genetických metod empiricky hodnoceny.
- Markery odpovídající parametrům byly osekvenovány.
- Byly vybrány nejvhodnější mikrosatelitní markery pro SSR panel, využitelný pro další studie.

Markery se v praktické části práce ukázaly jako polymorfní, proto lze říci, že splňují předpoklad pro vyhodnocení genetické variability u populací mšic. Hypotézu proto lze považovat za potvrzenou.

8 Literatura

- „Myzus Persicae Genome Assembly MPER_G0061.0". b.r. NCBI. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/assembly/GCF_001856785.1/.
- Ali, Jamin, Ahmet Bayram, Mohammad Mukarram, Fanrui Zhou, Muhammad Fazal Karim, Mogeda Mohammed Abdel Hafez, Mohammad Mahamood, et al. 2023. „Peach–Potato Aphid Myzus Persicae: Current Management Strategies, Challenges, and Proposed Solutions". *Sustainability* 15 (14): 11150. <https://doi.org/10.3390/su151411150>.
- Al-Samarai, Firas, a Abdulkareem A. A. Al-Kzaz. 2015. „Molecular Markers: an Introduction and Applications", leden. <https://doi.org/10.13187/ejmb.2015.9.118>.
- Amiteye, Samuel. 2021. „Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding". *Heliyon* 7 (10): e08093. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08093>.
- Anderson, J L. 1989. „Colloid Transport by Interfacial Forces". *Annual Review of Fluid Mechanics* 21 (1): 61–99. <https://doi.org/10.1146/annurev.fl.21.010189.000425>.
- Anderson, Jennifer M., James E. Lai, Ellen M. Dotson, Celia cordon-rosales, Carlos ponce, Douglas E. Norris a C. Ben beard, 2002. Identification and characterization of microsatellite markers in the Chagas disease vector *Triatoma dimidiata*. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 1(3), 243–248. ISSN 1567-1348.
- Ariede, Raquel B., Milena V. Freitas, Milene E. Hata, Vito A. Matrochirico-Filho, Ricardo Utsunomia, Fernando F. Mendonça, Fausto Foresti, Fábio Porto-Foresti, a Diogo T. Hashimoto. 2018. „Development of Microsatellite Markers Using Next-Generation Sequencing for the Fish *Colossoma Macropomum*". *Molecular Biology Reports* 45 (1): 9–18. <https://doi.org/10.1007/s11033-017-4134-z>.
- Ayyanath, M. 2013. „Effect of Sublethal Concentrations of Imidacloprid and Precocene on Green Peach Aphid, *Myzus Persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae): A Study of Hormesis at the Gene, Individual and Population Level". In . <https://www.semanticscholar.org/paper/Effect-of-Sublethal-Concentrations-of-Imidacloprid-Ayyanath/8020f849191e7c283b2b969d62f49d695073f42d>.
- Bazsalovicsová, Eva, Alžbeta Koleničová, Ivica Králová-Hromadová, Gabriel Minárik, Katarína Šoltys, Roman KUČHTA a Jan Štefka, 2018. Development of microsatellite loci in zoonotic tapeworm *Dibothriocephalus latus* (Linnaeus, 1758), Lühe, 1899 (syn. *Diphyllobothrium latum*) using microsatellite library screening. *Molecular and Biochemical Parasitology* [online]. 225, 1–3. ISSN 01666851. Dostupné z: [doi:10.1016/j.molbiopara.2018.08.003](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2018.08.003)
- Behura, Susanta K., 2006. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular Ecology* [online]. 15(11), 3087–3113. ISSN 1365-294X. Dostupné z: [doi:10.1111/j.1365-294X.2006.03014.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.03014.x)
- Benin, Giovani, Fernando Irajá Félix De Carvalho, Antonio Costa De Oliveira, Volmir Sérgio Marchioro, Eduardo Alano Vieira, Ivandro Bertan, Igor Pires Valério, José Abramo Marchese, a Gilvani Matei. 2008. „Morphological and AFLP Markers for Describing Genetic

- Relationships among White-Oat Genotypes". *Bragantia* 67 (3): 563–68. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052008000300002>.
- Bhattacharya, T.K., 2020. Application of genomics tools in meat quality evaluation. In: *Meat Quality Analysis* [online]. B.m.: Elsevier, s. 369–389 [vid. 2023-12-03]. ISBN 978-0-12-819233-7. Dostupné z: [doi:10.1016/B978-0-12-819233-7.00020-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819233-7.00020-3)
- Bhattacharya, T.K., 2020. Application of genomics tools in meat quality evaluation. In: *Meat Quality Analysis* [online]. B.m.: Elsevier, s. 369–389 [vid. 2023-12-03]. ISBN 978-0-12-819233-7. Dostupné z: [doi:10.1016/B978-0-12-819233-7.00020-3](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819233-7.00020-3)
- Blackman, R. L. 1980. „Chromosome Numbers in the Aphididae and Their Taxonomic Significance". *Systematic Entomology* 5 (1): 7–25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.1980.tb00393.x>.
- Brust, Gerald, Waqas Wakil, a Mirza Qayyum. 2018. „Minor Pests". In *Sustainable Management of Arthropod Pests of Tomato*, 183–214. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802441-6.00008-5>.
- Capinera, John L. *Encyclopedia of Entomology*. B.m.: Springer Science & Business Media, 2008. ISBN 978-1-4020-6242-1.
- Capinera, John L., 2004. Green Peach Aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Insecta: Hemiptera: Aphididae): EENY222/IN379, rev. 7/2004. EDIS [online]. 2004(6) [vid. 2023-08-21]. ISSN 2576-0009. Dostupné z: [doi:10.32473/edis-in379-2004](https://doi.org/10.32473/edis-in379-2004)
- Collard, B. C. Y., M. Z. Z. Jahufer, J. B. Brouwer, a E. C. K. Pang. 2005. „An Introduction to Markers, Quantitative Trait Loci (QTL) Mapping and Marker-Assisted Selection for Crop Improvement: The Basic Concepts". *Euphytica* 142 (1): 169–96. <https://doi.org/10.1007/s10681-005-1681-5>.
- D'Angelo, Olivia, Amber C. W. Vandepoele, Jonathan adelman a Michael A. Marciano, 2022. Assessing non-LUS stutter in DNA sequence data. *Forensic Science International: Genetics* [online]. 59, 102706. ISSN 1872-4973. Dostupné z: [doi:10.1016/j.fsigen.2022.102706](https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2022.102706)
- Dakin, E. E. a J. C. Avise, 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* [online]. 93(5), 504–509. ISSN 1365-2540. Dostupné z: [doi:10.1038/sj.hdy.6800545](https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800545)
- Dashnow, Harriet, Susan Tan, Debjani Das, Simon Eastal, a Alicia Oshlack. 2015. „Genotyping Microsatellites in Next-Generation Sequencing Data". *BMC Bioinformatics* 16 (2): A5. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-16-S2-A5>.
- Doyle, Jeffrey. 1991. „DNA Protocols for Plants". In *Molecular Techniques in Taxonomy*, editoval Godfrey M. Hewitt, Andrew W. B. Johnston, a J. Peter W. Young, 283–93. NATO ASI Series. Berlin, Heidelberg: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-642-83962-7_18.
- Duran, Chris, Nikki Appleby, David Edwards, a Jacqueline Batley. 2009. „Molecular Genetic Markers: Discovery, Applications, Data Storage and Visualisation". *Current Bioinformatics* 4 (1): 16–27. <https://doi.org/10.2174/157489309787158198>.

- Feng, Honglin, Wenbo Chen, Sonia Hussain, Sara Shakir, Vered Tzin, Femi Adegbayi, Todd Ugine, Zhangjun Fei, a Georg Jander. 2023. „Horizontally transferred genes as RNA interference targets for aphid and whitefly control". *Plant Biotechnology Journal* 21 (4): 754–68. <https://doi.org/10.1111/pbi.13992>.
- Freitag, R., 2000. Electrophoresis | Capillary Gel Electrophoresis. In: *Encyclopedia of Separation Science* [online]. B.m.: Elsevier, s. 1201–1208 [vid. 2023-12-03]. ISBN 978-0-12-226770-3. Dostupné z: [doi:10.1016/B0-12-226770-2/03681-4](https://doi.org/10.1016/B0-12-226770-2/03681-4)
- Gadhve, Kiran R., Saurabh Gautam, David A. Rasmussen, a Rajagopalbabu Srinivasan. 2020. „Aphid Transmission of Potyvirus: The Largest Plant-Infecting RNA Virus Genus". *Viruses* 12 (7): 773. <https://doi.org/10.3390/v12070773>.
- Gagneux, P., C. Boesch a D. S. Woodruff, 1997. Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Molecular Ecology* [online]. 6(9), 861–868. ISSN 0962-1083. Dostupné z: [doi:10.1111/j.1365-294x.1997.tb00140.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.1997.tb00140.x)
- Gariyban, Lilit, a Nidhi Avashia. 2013. „Polymerase Chain Reaction". *Journal of Investigative Dermatology* 133 (3): 1–4. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>.
- Gemayel, Rita, Janice Cho, Steven Boeynaems, a Kevin J. Verstrepen. 2012. „Beyond Junk-Variable Tandem Repeats as Facilitators of Rapid Evolution of Regulatory and Coding Sequences". *Genes* 3 (3): 461–80. <https://doi.org/10.3390/genes3030461>.
- Gibson, R. W., 1971. Glandular hairs providing resistance to aphids in certain wild potato species. *Annals of Applied Biology* [online]. 68(2), 113–119. ISSN 0003-4746, 1744-7348. Dostupné z: [doi:10.1111/j.1744-7348.1971.tb06448.x](https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1971.tb06448.x)
- Green, Michael R. a Joseph Sambrook, 2020. Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2020(12), pdb.prot100412. ISSN 1940-3402, 1559-6095. Dostupné z: [doi:10.1101/pdb.prot100412](https://doi.org/10.1101/pdb.prot100412)
- Gustavsson, Per-Erik, a Per-OlofLars Son. 2003. „Chapter 6 - Monolithic Polysaccharide Materials". In *Journal of Chromatography Library*, editoval František Švec, Tatiana B. Tennikova, a Zdeněk Deyl, 67:121–41. *Monolithic Materials*. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0301-4770\(03\)80022-2](https://doi.org/10.1016/S0301-4770(03)80022-2).
- Hegazy, Youssef A., Chrisan M. Fernando a Elizabeth J. Tran, 2020. The balancing act of R-loop biology: The good, the bad, and the ugly. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 295(4), 905–913. ISSN 0021-9258. Dostupné z: [doi:10.1074/jbc.REV119.011353](https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.011353)
- Horsfall, John Louis. 1924. *Life History Studies of Myzus Persicae Sulzer*. Bulletin (Pennsylvania State College. Agricultural Experiment Station). State College: Pennsylvania State College Agricultural Experiment Station. <http://books.google.com/books?id=3j8nAQAAMAAJ>.
- Chatterjee, Nimrat, Beatriz Santillan, a John Wilson. 2013. „Microsatellite Repeats:w Canaries in the Coalmine". In *Stress-Induced Mutagenesis*, 119–50. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6280-4_7.

- Chen, Jian-Qun, Begonia Martin, Yvan Rahbé, a Alberto Fereres. 1997. „Early Intracellular Punctures by Two Aphid Species on Near-Isogenic Melon Lines with and without the Virus Aphid Transmission (Vat) Resistance Gene". *European Journal of Plant Pathology* 103 (6): 521–36. <https://doi.org/10.1023/A:1008610812437>.
- Chen, M., Tan, Z., Jiang, J., Li, M., Chen, H., Shen, G. and Yu, R. (2009) Similar distribution of simple sequence repeats in diverse completed human immunodeficiency virus type 1 genomes. *FEBS Lett.* 583, 2959–2963.
- Chesnokov, Yu. V., V. M. Kosolapov, a I. V. Savchenko. 2020. „Morphological Genetic Markers in Plants". *Russian Journal of Genetics* 56 (12): 1406–15. <https://doi.org/10.1134/S1022795420120042>.
- Joshi, Mohini, a J. D. Deshpande. 2011. „polymerase chain reaction: methods, principles and application". *International Journal of Biomedical Research* 2 (1): 81–97. <https://doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>.
- Karger, Barry L. a Andras guttman, 2009. *DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis*. *Electrophoresis* [online]. 30(Suppl 1), S196–S202. ISSN 0173-0835. Dostupné z: [doi:10.1002/elps.200900218](https://doi.org/10.1002/elps.200900218)
- Kaunitz, Jonathan D. 2015. „The Discovery of PCR: ProCuRement of Divine Power". *Digestive diseases and sciences* 60 (8): 2230–31. <https://doi.org/10.1007/s10620-015-3747-0>.
- Koressaar, T.; Remm, M. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 2007, 23, 1289–1291.
- Lee, Pei Yun, John Costumbrado, Chih-Yuan Hsu, a Yong Hoon Kim. 2012. „Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments". *Journal of Visualized Experiments*, č. 62 (duben): 3923. <https://doi.org/10.3791/3923>.
- Losada, Luiza Chaves De Miranda Leonhardt, Ruan Campos Monteiro, Jamile Ambrósio De Carvalho, Ferry Hagen, Matthew C. Fisher, Bram Spruijtenburg, Jacques F. Meis, Theun De Groot, Sarah Santos Gonçalves, Ricardo Negroni, Rui Kano, Alexandro Bonifaz, Zoilo Pires De Camargo A Anderson Messias Rodrigues, 2023. High-Throughput Microsatellite Markers Development for Genetic Characterization of Emerging *Sporothrix* Species. *Journal of Fungi* [online]. 9(3), 354. ISSN 2309-608X. Dostupné z: [doi:10.3390/jof9030354](https://doi.org/10.3390/jof9030354)
- Magdeldin, Sameh, 2012. *Gel Electrophoresis: Principles and Basics*. B.m.: BoD – Books on Demand. ISBN 978-953-51-0458-2.
- Malloch, G., F. Hight, L. Kasprowicz, J. Pickup, R. Neilson a B. Fenton, 2006. Microsatellite marker analysis of peach–potato aphids (*Myzus persicae* , Homoptera: Aphididae) from Scottish suction traps. *Bulletin of Entomological Research* [online]. 96(6), 573–582. ISSN 0007-4853, 1475-2670. Dostupné z: [doi:10.1079/BER2006459](https://doi.org/10.1079/BER2006459)
- Margaritopoulos, John T., Gavin malarky, John A. Tsitsipis a Roger L. Blackman, 2007. Microsatellite DNA and behavioural studies provide evidence of host-mediated speciation in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae): host-mediated speciation in *myzus persicae*.

Biological Journal of the Linnean Society [online]. 91(4), 687–702. ISSN 00244066, 10958312. Dostupné z: doi:10.1111/j.1095-8312.2007.00828.x

Mathers, Thomas C, Roland H M Wouters, Sam T Mugford, David Swarbreck, Cock van Oosterhout, a Saskia A Hogenhout. 2021. „Chromosome-Scale Genome Assemblies of Aphids Reveal Extensively Rearranged Autosomes and Long-Term Conservation of the X Chromosome". *Molecular Biology and Evolution* 38 (3): 856–75. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa246>.

Mathers, Thomas C., Yazhou Chen, Gemy Kaithakottil, Fabrice Legeai, Sam T. Mugford, Patrice Baa-Puyoulet, Anthony Bretaudeau, Bernardo Clavijo, Stefano Colella, Olivier Collin, Tamas Dalmay, Thomas Derrien, Honglin Feng, Toni Gabaldón, Anna Jordan, Irene Julca, Graeme J. Kettles, Krissana Kowitwanich, Dominique Lavenier, Paolo Lenzi, Sara Lopez-Gomollon, Damian Loska, Daniel Mapleson, Florian Maumus, Simon Moxon, Daniel R. G. Price, Akiko Sugio, Manuella Van Munster, Marilyne Uzest, Darren Waite, Georg Jander, Denis Tagu, Alex C. C. Wilson, Cock VAN Oosterhout, David Swarbreck a Saskia A. Hogenhout, 2017. Rapid transcriptional plasticity of duplicated gene clusters enables a clonally reproducing aphid to colonise diverse plant species. *Genome Biology* [online]. 18(1), 27. ISSN 1474-760X. Dostupné z: doi:10.1186/s13059-016-1145-3

Miller, Carol, 2019. Field Scouting Guide: Green Peach Aphid. Growing Produce [online]. [vid. 2024-02-25]. Dostupné z: <https://www.growingproduce.com/vegetables/field-scouting-guide-green-peach-aphid/>

Monti, Valentina, Giorgia Lombardo, Hugh D. Loxdale, Gian Carlo Manicardi, a Mauro Mandrioli. 2012. „Continuous Occurrence of Intra-Individual Chromosome Rearrangements in the Peach Potato Aphid, *Myzus Persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae)". *Genetica* 140 (1): 93–103. <https://doi.org/10.1007/s10709-012-9661-x>.

Nadeem, Muhammad Azhar, Muhammad Amjad Nawaz, Muhammad Qasim Shahid, Yıldız Doğan, Gonul Comertpay, Mehtap Yıldız, Rüştü Hatipoğlu, et al. 2018. „DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing". *Biotechnology & Biotechnological Equipment* 32 (2): 261–85. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>.

Okonechnikov, Konstantin, Olga golosova, Mikhail fursov, a the ugene team, 2012. Unipro ugene: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics* [online]. 28(8), 1166–1167. ISSN 1367-4803, 1367-4811. Dostupné z: doi:10.1093/bioinformatics/bts091

Oliveira, Eder Jorge, Juliano Gomes Pádua, Maria Imaculada Zucchi, Roland Vencovsky, a Maria Lúcia Carneiro Vieira. 2006. „Origin, Evolution and Genome Distribution of Microsatellites". *Genetics and Molecular Biology* 29 (2): 294–307. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000200018>.

Pâques, Frédéric, a James E. Haber. 1999. „Multiple Pathways of Recombination Induced by Double-Strand Breaks in *Saccharomyces Cerevisiae*". *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63 (2): 349–404. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.2.349-404.1999>.

Pasquarelli, Alberto, 2021. Genome Sequencing. In: Alberto pasquarelli, ed. *Biosensors and Biochips* [online]. Cham: Springer International Publishing, Learning Materials in Biosciences,

s. 225–255 [vid. 2024-02-25]. ISBN 978-3-030-76469-2. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-030-76469-2_9

- Pearson, C. E., A. Ewel, S. Acharya, R. A. Fishel, a R. R. Sinden. 1997. „Human MSH2 Binds to Trinucleotide Repeat DNA Structures Associated with Neurodegenerative Diseases". *Human Molecular Genetics* 6 (7): 1117–23. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.7.1117>.
- Pinheiro, Patricia V., Jennifer R. Wilson, Yi Xu, Yi Zheng, Ana Rita Rebelo, Somayeh Fattah-Hosseini, Angela Kruse, et al. 2019. „Plant Viruses Transmitted in Two Different Modes Produce Differing Effects on Small RNA-Mediated Processes in Their Aphid Vector". *Phytobiomes Journal* 3 (1): 71–81. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-10-18-0045-R>.
- Pyell, Ute. 2006. „Theory of Electrokinetic Chromatography". In *Electrokinetic Chromatography*, 1–31. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470871041.ch1>.
- Radcliffe, Edward a Abdelaziz Iagnaoui, 2007. *Insect Pests in Potato*. In: *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives* [online]. s. 543–567. ISBN 978-0-444-51018-1. Dostupné z: doi:10.1016/B978-044451018-1/50067-1
- Rajapakse, S. 2003. „genetics | Molecular Markers". In *Encyclopedia of Rose Science*, editoval Andrew V. Roberts, 334–41. Oxford: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B0-12-227620-5/00113-0>.
- Richardson, Author Joseph T., 2017. *A Breakthrough in Zachariah Dutton’s Paternal Ancestry*. *Zachariah Dutton Genealogy Web* [online] [vid. 2024-02-25]. Dostupné z: <https://www.zdutton.org/2017/03/06/a-breakthrough-in-zachariah-duttons-paternal-ancestry/>
- Rossi, Magdalena, Lily goggin, Stephen milligan, Isgouhi kaloshian, Diane ullman a Valerie williamson, 1998. *The Nematode Resistance Gene Mi of Tomato Confers Resistance against the Potato Aphid*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [online]. 95, 9750–4. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.95.17.9750
- Roehrdanz, R. L., 1993. *An improved primer for PCR amplification of mitochondrial DNA in a variety of insect species*. *Insect Molecular Biology* [online]. 2(2), 89–91. ISSN 0962-1075. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2583.1993.tb00129.x
- Saguez, Julien, Philippe Giordanengo, a Charles Vincent. 2013. „Aphids as Major Potato Pests". In *Insect Pests of Potato*, 31–63. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386895-4.00003-X>.
- Saiki, Randall K. 1989. „The Design and Optimization of the PCR". In *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*, editoval Henry A. Erlich, 7–16. London: Palgrave Macmillan UK. https://doi.org/10.1007/978-1-349-20235-5_1.
- Sailus, Jeff, Nicola oldroyd, Lisa calandro, Julio mulero a Liwei QI, 2012. *PCR Amplification Kits in Human Identification Laboratories*.
- Salisu, I. B., A. S. Olawale, B. Jabbar, B. L. Koloko, S. L. Abdurrahaman, A. B. Amin, a Q. Ali. 2018. „Molecular Markers and Their Potentials in Animal Breeding and Genetics". *Nigerian Journal of Animal Science* 20 (3): 29–48. <https://doi.org/10.4314/tjas.v20i3>.

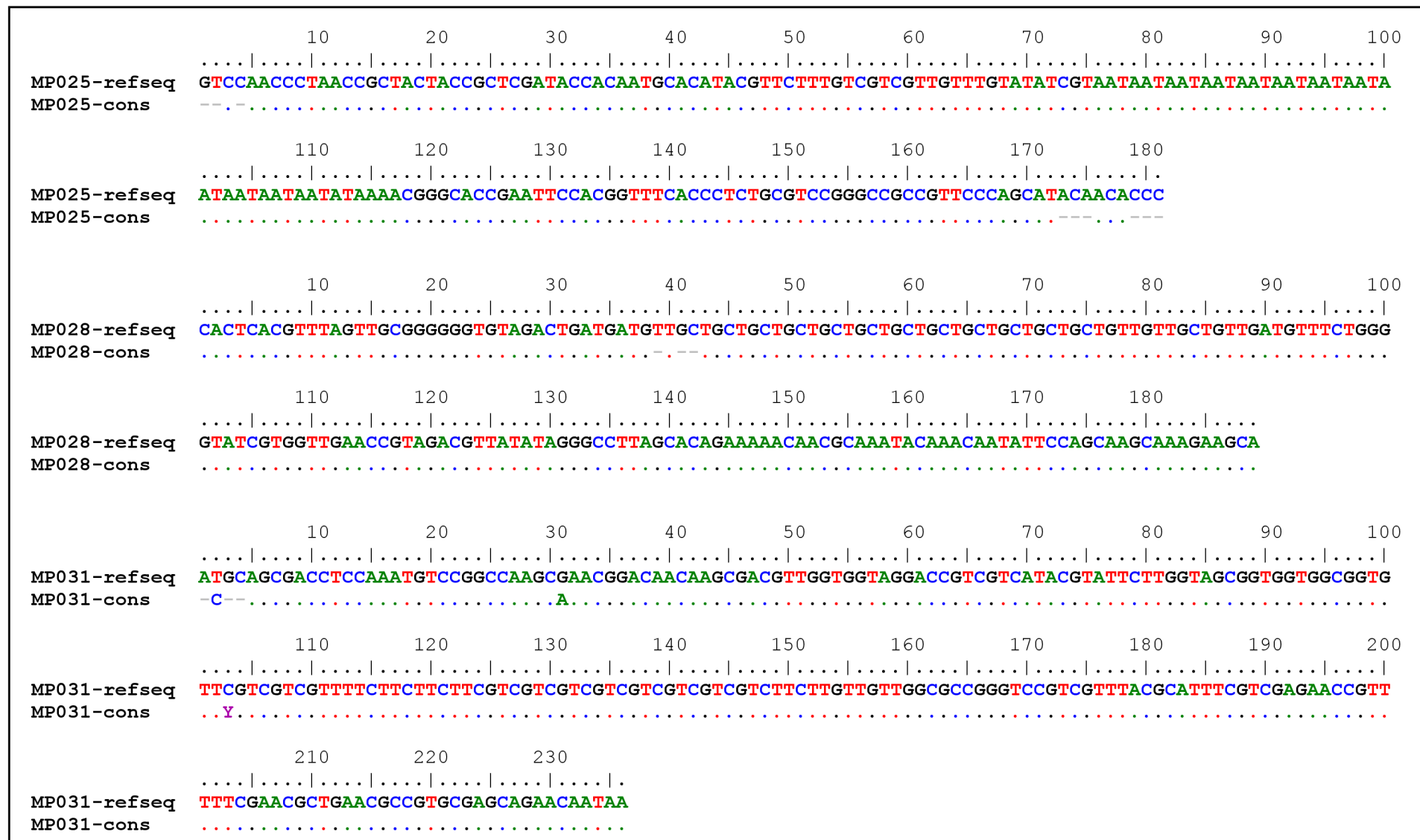
- Sanger, F., S. Nicklen a A. R. Coulson, 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74(12), 5463–5467. ISSN 0027-8424.
- Senan, Siju, Dhanya Kizhakayil, Bhaskaran Sasikumar a Thotten Elampilay Sheeja, 2014. Methods for Development of Microsatellite Markers: An Overview. *Notulae Scientia Biologicae* [online]. 6(1), 1–13. ISSN 2067-3264. Dostupné z: doi:10.15835/nsb619199
- Shahzad, Shaheen, Mohammad Afzal, Shomaila Sikandar, Imran Afzal, Shaheen Shahzad, Mohammad Afzal, Shomaila Sikandar, a Imran Afzal. 2020. „Polymerase Chain Reaction". In *Genetic Engineering - A Glimpse of Techniques and Applications*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.81924>.
- Shinde, Deepali, Yinglei LAI, Fengzhu sun a Norman arnheim, 2003. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites. *Nucleic Acids Research* [online]. 31(3), 974–980. ISSN 1362-4962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkg178
- Schaeper, James P., "Reproducibility and optimization in capillary electrophoresis. " PhD diss., University of Tennessee, 2002. https://trace.tennessee.edu/utk_graddiss/6302
- Schoch, Conrad L, Stacy Ciufu, Mikhail Domrachev, Carol L Hotton, Sivakumar Kannan, Rogneda Khovanskaya, Detlef Leipe, et al. 2020. „NCBI Taxonomy: A Comprehensive Update on Curation, Resources and Tools". *Database* 2020 (leden): baaa062. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>.
- Sia, Elaine Ayres, Christine A. Butler, Margaret Dominska, Patricia Greenwell, Thomas D. Fox, a Thomas D. Petes. 2000. „Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (1): 250–55.
- Sloane, M. A., P. Sunnucks, A. C. Wilson a D. F. Hales, 2001. Microsatellite isolation, linkage group identification and determination of recombination frequency in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Genetical Research* [online]. 77(3), 251–260. Dostupné z: doi:10.1017/s0016672301005018
- Sonagra, Amit D. a Sagar J. Dholariya, 2024. Electrophoresis. In: *StatPearls* [online]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK585057/>
- Srivastava, Deepti, Malik Mobeen Ahmad, Md Shamim, Rashmi Maurya, Neha Srivastava, Pramila Pandey, Saba Siddiqui, a Mohd Haris Siddiqui. 2019. „Chapter 12 - Modulation of Gene Expression by Microsatellites in Microbes". In *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*, editoval Harikesh Bahadur Singh, Vijai Kumar Gupta, a Sudisha Jogaiah, 209–18. Amsterdam: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63503-7.00012-7>.
- Srivastava, Deepti, Malik Mobeen ahmad, Md shamim, Rashmi maurya, Neha srivastava, Pramila PANDEY, Saba siddiqui a Mohd Haris siddiqui, 2019. Modulation of Gene Expression by Microsatellites in Microbes. In: *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and*

- Bioengineering [online]. B.m.: Elsevier, s. 209–218 [vid. 2024-02-26]. ISBN 978-0-444-63503-7. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-63503-7.00012-7
- Symondson, W. O. C., K. D. Sunderland, a M. H. Greenstone. 2002. „Can Generalist Predators Be Effective Biocontrol Agents?" Annual Review of Entomology 47: 561–94. Dostupné z: doi://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145240.
- Taheri, Sima, Thohirah Lee Abdullah, Mohd Yusop, Mohamed Hanafi, Mahbod Sahebi, Parisa Azizi a Redmond Shamshiri, 2018. Mining and Development of Novel SSR Markers Using Next Generation Sequencing (NGS) Data in Plants. *Molecules* [online]. 23(2), 399. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules23020399
- Tian, Lei, Caixia Hou, Keli Tian, Nathaniel C. Holcomb, Liya Gu, a Guo-Min Li. 2009. „Mismatch Recognition Protein MutS β Does Not Hijack (CAG) n Hairpin Repair in Vitro". *The Journal of Biological Chemistry* 284 (31): 20452–56. <https://doi.org/10.1074/jbc.C109.014977>.
- Untergasser, A.; Cutcutache, I.; Koressaar, T.; Ye, J.; Faircloth, B.C.; Remm, M.; Rozen, S.G. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012, 40, e115.
- Van emden, H. F., V. F. Eastop, R. D. Hughes a M. J. Way. The Ecology of *Myzus persicae*. Annual Review of Entomology [online]. 1969, 14(1), 197–270. Dostupné z: doi:10.1146/annurev.en.14.010169.001213
- Vieira, Maria Lucia Carneiro, Luciane Santini, Augusto Lima Diniz, a Carla de Freitas Munhoz. 2016. „Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful". *Genetics and Molecular Biology* 39 (3): 312–28. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0027>.
- Vignal, Alain, Denis Milan, Magali SanCristobal, a André Eggen. 2002. „A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics". *Genetics, Selection, Evolution : GSE* 34 (3): 275–305. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-34-3-275>.
- Wang, X.; Wang, L. GMATA: An integrated software package for genome-scale SSR mining, marker development and viewing. *Front. Plant. Sci.* 2016, 7, 1350.
- Wattier, r., c. R. Engel, p. Saumitou-laprade a m. Valero, 1998. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). *Molecular Ecology* [online]. 7(11), 1569–1573. ISSN 1365-294X. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-294x.1998.00477.x
- Wilson, Alex C. C., Ryan N. Delgado a Christoph vorburger, 2014. Biased Transmission of Sex Chromosomes in the Aphid *Myzus persicae* Is Not Associated with Reproductive Mode. *PLoS ONE* [online]. 9(12), e116348. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0116348
- Yang, H., T. Zhou. 2018. „The development of novel microsatellite markers and genetic diversity study for *Aconitum carmichaeli*." *Journal of Agricultural Biotechnology*. Dostupné z : doi/full/10.5555/20173124709#core-collateral-purchase-access.

- Yang, Wanjie, Xiaolong Kang, Qingfeng Yang, Yao Lin, a Meiyang Fang. 2013. „Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity". *Journal of Animal Science and Biotechnology* 4 (1): 2. <https://doi.org/10.1186/2049-1891-4-2>.
- Zhang, P., A. Seth a H. Fernandes, 2014. Other Post-PCR Detection Technologies. In: Linda M. MCMANUS a Richard N. Mitchell, ed. *Pathobiology of Human Disease* [online]. San Diego: Academic Press, s. 4074–4088 [vid. 2024-02-26]. ISBN 978-0-12-386457-4. Dostupné z: [doi:10.1016/B978-0-12-386456-7.07707-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.07707-8)
- Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. & Miller, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 7, 203–214 (2000).
- Zitoudi, Kiriaki, John T. Margaritopoulos, Zisis Mamuris, a John A. Tsitsipis. 2001. „Genetic Variation in *Myzus Persicae* Populations Associated with Host-Plant and Life Cycle Category". *Entomologia Experimentalis et Applicata* 99 (3): 303–11. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2001.00829.x>.



Tabulka č. 7: Osekvenované markery Myzper-14, Myzper-16 a Myzper-23.



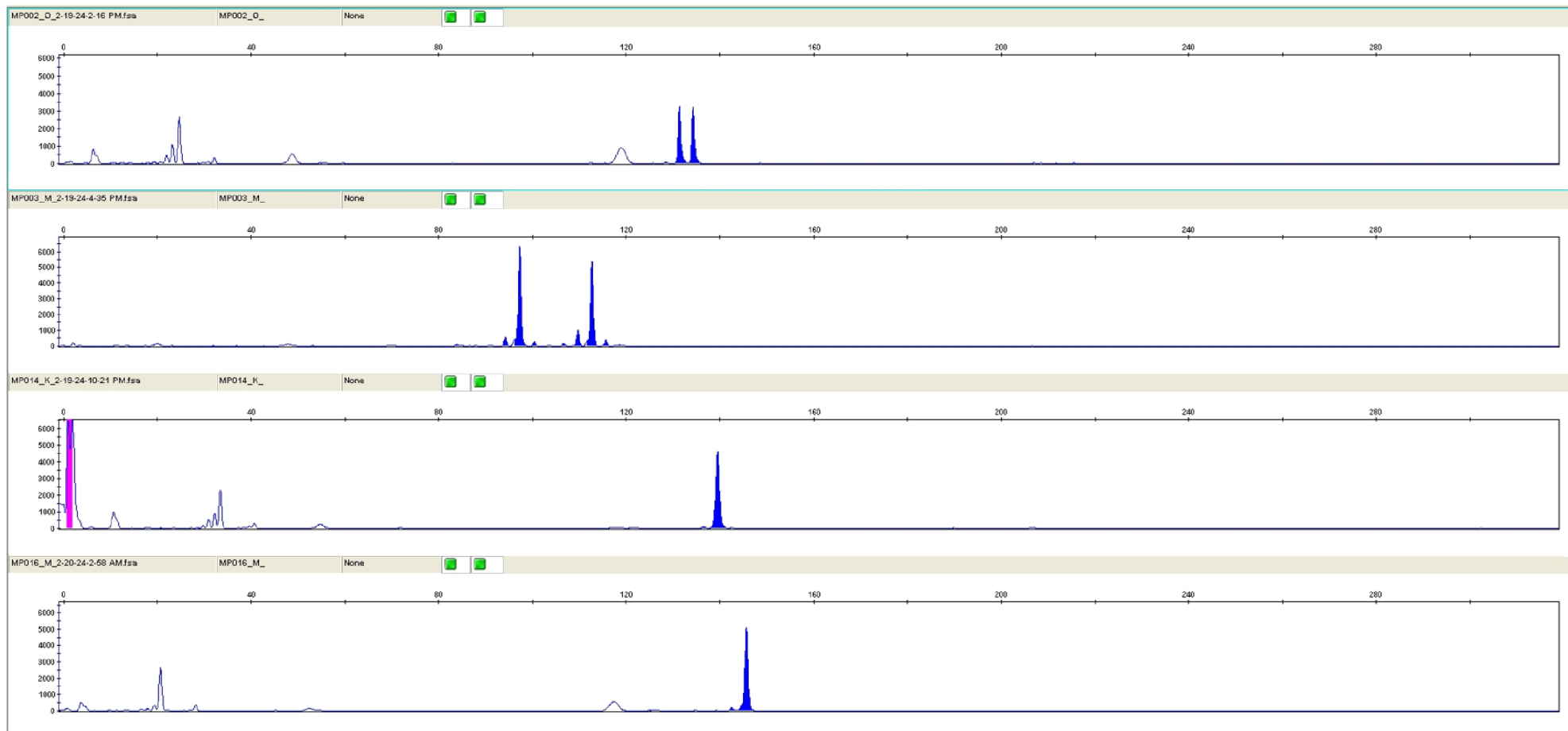
Tabulka č.8: Osekvenované markery Myzper-25, Myzper-28 a Myzper-31.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MP060-refseq									
MP060-cons	AGCTACCCTCCTTTTCGGTACGTCCTTCCTTATCAAGTCATGTTGGTTATCAGACTCCCGAGTGTCCGTCCGATCGTTTCATCCATGGAATAACGGCGTCGTA									
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
MP060-refseq									
MP060-cons	CAACCGTTCGCTCCATGGTTAACCTCATGTTTCCTCTGGTCGCACGATTATTATTATTATTATTATTATTATTGCGTTGGGCACCGTGTGCTATTGCTATAACT									
	210	220								
MP060-refseq									
MP060-cons	TGTGACTTGTGAGCGAGCGACATC									
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
MP061-refseq									
MP061-cons	GCAGCCAAAGTTTCGTTTACCACGATGGATTTCCTCTAAACAAAGGTAACGTGAAAAGGACAGATATCTTTGTGCGTGCCTGCCTGCCTGCCTGCCTGCCTGCAT									
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
MP061-refseq									
MP061-cons	GCGTGCCTGTTTGTGTGTGTATGTGTTTATACACATCCGTTGTATGTGTTTACGCCATCGCGGGCGGTGTGTGCAACCATCGTCTCGACTCTCGAGT									
	210	220								
MP061-refseq									
MP061-cons	TAGGAAGTGTAAAAACAACCCAAGGCGT									

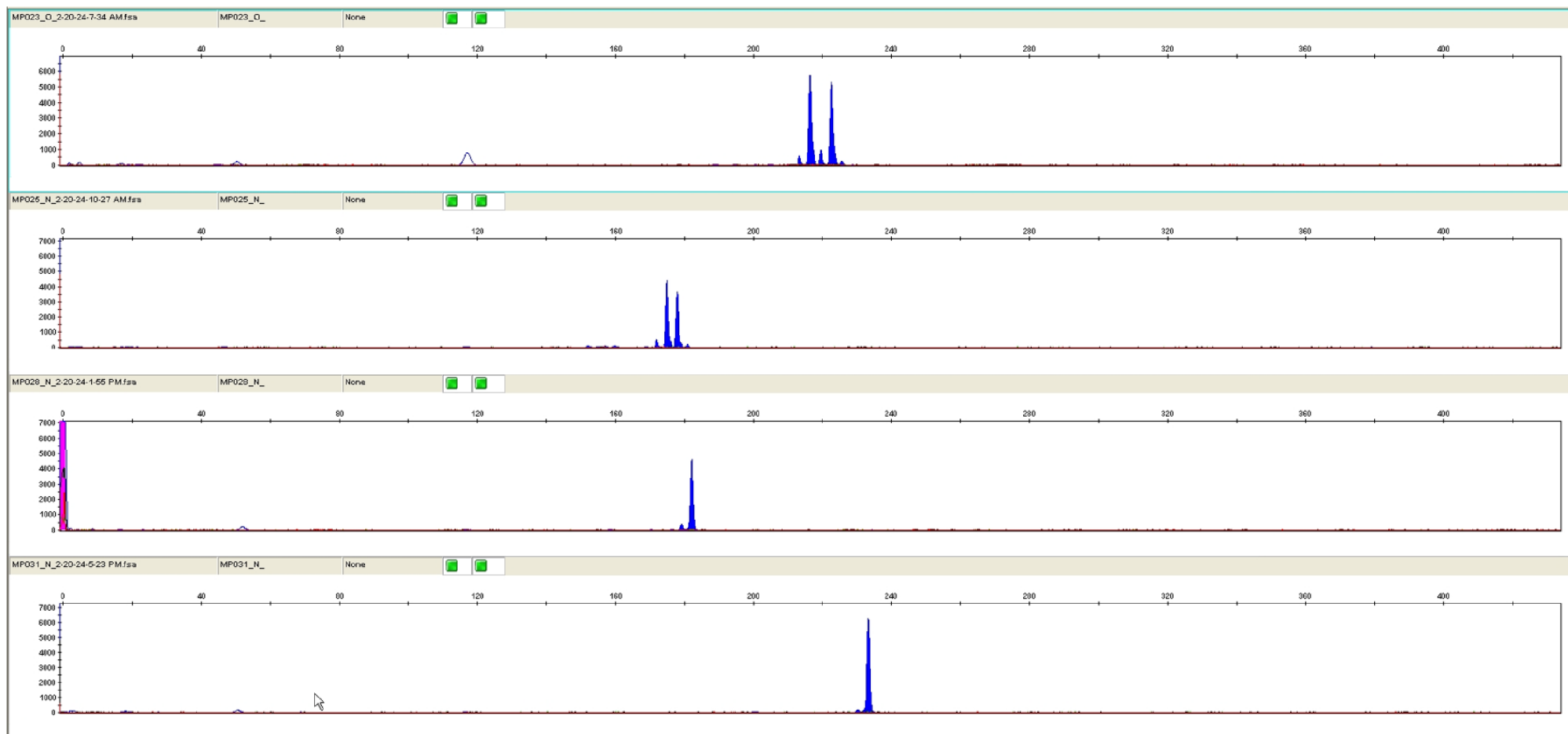
Tabulka č.11: Osekvonované markery Myzper-60 a Myzper-61.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
MP064-refseq										
MP064-cons	-----										
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
MP064-refseq										
MP064-cons										
	210										
MP064-refseq										
MP064-cons										
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
MP066-refseq										
MP066-cons										
	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
MP066-refseq										
MP066-cons										
	210										
MP066-refseq										
MP066-cons										

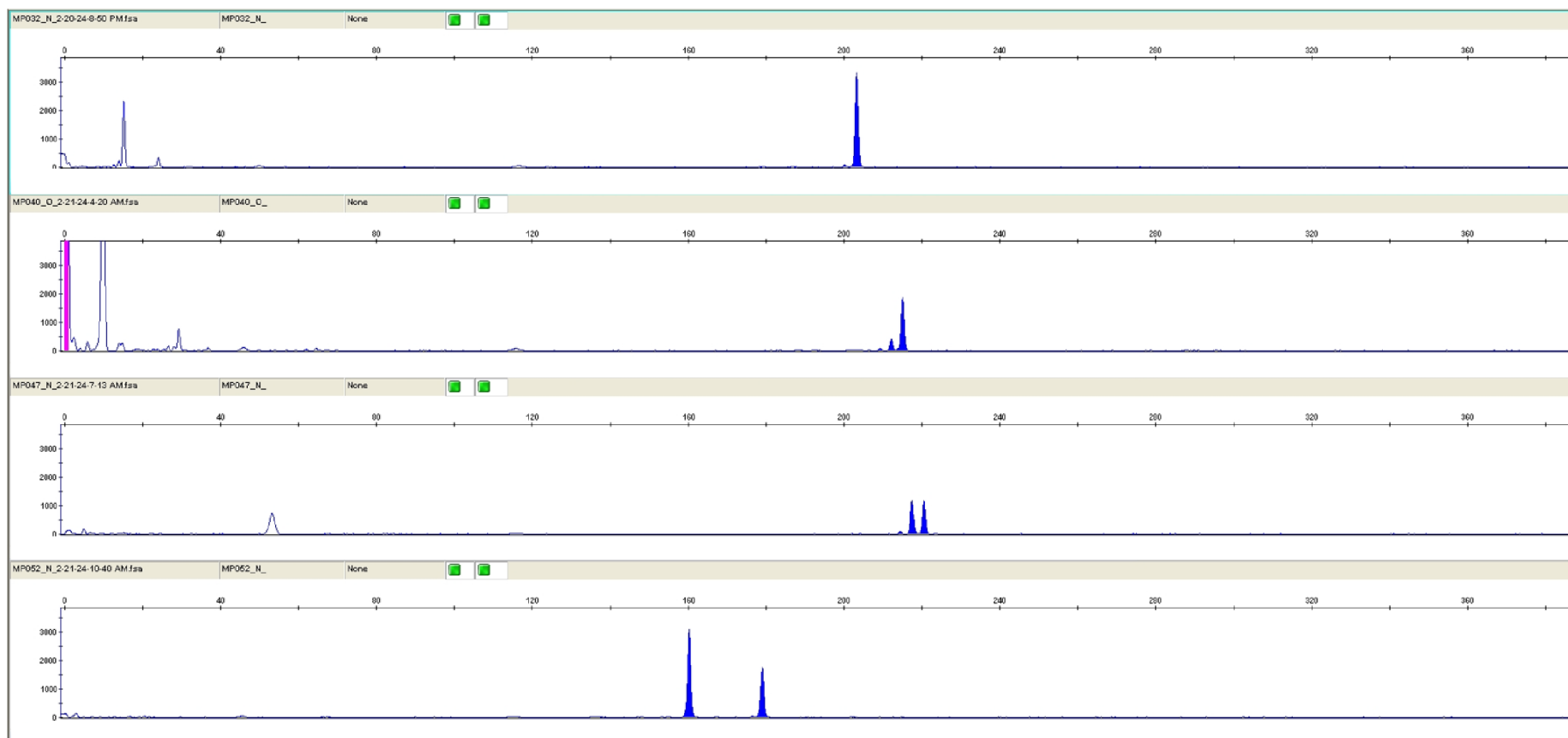
Tabulka č.12: Osekvenované markery Myzper-64 a Myzper-66.



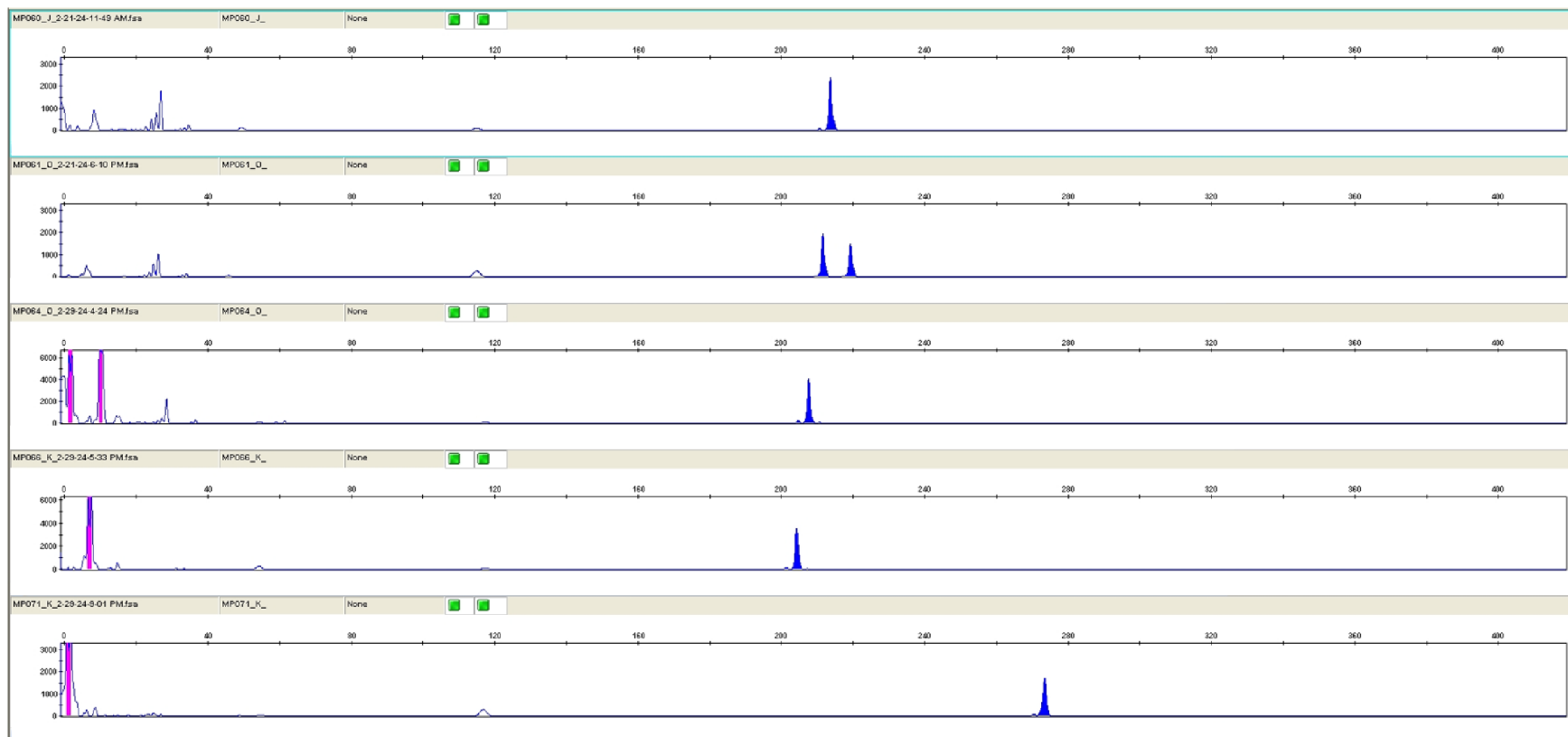
Obrázek č. 20: Fragmentační analýza markerů Myzper-2, Myzper-3, Myzper-14, Myzper-16.



Obrázek č. 21: Fragmentační analýza markerů Myzper-23, Myzper-25, Myzper-28, Myzper-31.



Obrázek č. 22: Fragmentační analýza markerů Myzper-32, Myzper-40, Myzper-47, Myzper-52.



Obrázek č. 23: Fragmentační analýza markerů Myzper-60, Myzper-61, Myzper-64, Myzper-66, Myzper-71.