

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra genetiky a šlechtění



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Sekvenční variabilita genu *mtCOII* jako nástroj pro studium
efektu zakladatele u populací mandelinky bramborové
v České republice**

Diplomová práce

**Bc. Barbora Codlová
Reprodukční biotechnologie**

doc. Dr. Ing. Pavel Vejl

© 2020 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci " Sekvenční variabilita genu *mtCOII* jako nástroj pro studium efektu zakladatele u populací mandelinky bramborové v České republice" 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 24. 7. 2020

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému vedoucímu doc. Dr. Ing. Pavlu Vejlovi za neuvěřitelnou ochotu, vstřícnost a trpělivost, které se mnou při tvorbě diplomové práce měl. Dále bych chtěla poděkovat zaměstnancům KGŠ za přátelský a vstřícný přístup a příkladnou pomoc při praktické části v laboratoři. Jmenovitě Ing. Daniele Čílové, Mgr. Martině Melounové, Ph.D. a Ing. Vladimíře Sedlákové Ph.D. A samozřejmě nesmím opomenout Janku a Karla, kteří tu pro mě vždy byli, jsou a budou.

Sekvenční variabilita genu *mtCOII* jako nástroj pro studium efektu zakladatele u populací mandelinky bramborové v České republice

Souhrn

Mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824) je nejvýznamnějším celosvětově rozšířeným škůdcem brambor (*Solanum tuberosum* L.). Podle publikovaných výsledků se v evropských populacích vyskytuje pouze jediný haplotyp genu *mtCOII*. To odpovídá hypotéze, že se mandelinka na evropský kontinent rozšířila díky jediné úspěšné invazi. Evropské populace tudíž vznikly z velmi nízkého počtu jedinců. Je tak možné hovořit o efektu zakladatele.

Tato diplomová práce se v první části zabývá výzkumem sekvenčních polymorfismů části mitochondriálního genomu nesoucího geny *nad2*, *trnW*, *trnC*, *trnY*, *mtCOI*, *trnL*, *mtCOII*, *trnK*, *trnD* a *atp8*. Pro analýzy bylo použito celkem 34 jedinců z různých lokalit České a Slovenské republiky. Na základě publikovaných genomů brouků čeledi Chrysomelidae byly navrženy degenerované primerové páry pro primární sekvenaci studované oblasti mtDNA mandelinky. Následně bylo navrženo 5 druhově specifických sekvenačních primerových párů, které umožnily získání konsensus sekvence o velikosti 3395 bp. Bylo zjištěno, že v rámci hodnocených jedinců byl nalezen pouze jediný haplotyp. Tento výsledek byl v souladu s publikovanými informacemi o neexistující variabilitě vybraných oblastí mtDNA u evropské populace mandelinky.

Sekvenční data studované oblasti mtDNA byla použita pro zpracování *in silico* fylogenetické studie, která zahrnovala vybrané zástupce čeledi Chrysomelidae, Bruchidae, Cerambycidae a Tenebrionidae. Haplotypy byly určeny pomocí programu DnaSP 6. Program MEGA X byl použit pro fylogenetickou analýzu založenou na metodě maximální věrohodnosti (ML). Pro konstrukci stromu byl použit model GTR+G+I. Fylogenetická analýza odhalila momofyletický původ čeledi Chrysomelidae. Taxonomická jednotka tribus je zřejmě jednotkou umělou, protože molekulární analýza klastruje některé zástupce rodů *Gastrolina* a *Galeruca* odlišným způsobem. Analýza prokázala, že rody *Leptinotarsa* a *Chrysolina* jsou seterské.

Pro populační analýzy hodnotící genom larev mandelinky je důležité mít informace o jejich pohlaví. Vzhledem k tomu, že u larev neexistuje zřejmý pohlavní dimorfismus, byly při řešení diplomové práce vyvinuty dva markerovací systémy založené na relativní kvantifikaci lokusů lokalizovaných na gonozomech a autozomech. Pomocí parametru Ratio Δ Ct bylo stanoveno relativní množství templátové DNA u lokusu *Ldvsc1*, lokalizovaného na gonozomu X ve dvou kopiích u samic a v jedné kopii u samců. Dva navržené markerovací systémy prokázaly, že hodnoty Ratio Δ Ct jsou u samic dvojnásobné oproti hodnotám samců. Pomocí diskriminační a kanonické analýzy byla statisticky potvrzena schopnost obou markerovacích systémů rozlišit jedince samičího a samčího pohlaví. Neparametrickým χ^2

testem bylo potvrzeno, že poměr samičího a samčího pohlaví odpovídal u vybraného vzorku populace poměru 1:1.

Řešení diplomové práce bylo podpořeno projekty GA FAPPZ Studium geneticky podmíněných vlastností s využitím molekulárně – genetických, bioinformatických a statistických metod (SV20-9-21360), Molekulární analýza nukleových kyselin rostlin a živočichů a možnosti jejího hodnocení s využitím metod bioinformatiky a biostatistiky (SV19-07-21360) a projektu NAZV MZe ČR Inovace integrované ochrany brambor proti mandelince bramborové založené na nových poznatcích genetických a biologických charakteristik (QK1910270).

Klíčová slova: mandelinka bramborová, *Leptinotarsa decemlineata*, gen *mtCOII*, efekt zakladatele, populace

Sequential variability of gene *mtCOII* as a tool for study of founder effect in potato beetle populations in the Czech Republic

Summary

The Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824) is a worldwide spread pest of the potato plant (*Solanum tuberosum* L.). According to the published results, only one haplotype of *mtCOII* gene occurs in European populations. This is in accordance with the hypothesis that suggests a single successful invasion which allowed the Colorado potato beetle to spread to the European continent. Therefore, European populations have origin in a very small number of individuals which is described as the founder effect.

In its first part, this diploma thesis focuses on the research of sequence polymorphism of a part of the mitochondrial genome where are located following genes: *nad2*, *trnW*, *trnC*, *trnY*, *mtCOI*, *trnL*, *mtCOII*, *trnK*, *trnD* and *atp8*. It has been used a total of 34 individuals from various locations of the Czech and Slovak Republic for the analysis. Based on the published genomes of the beetles from the Chrysomelidae family, degenerate primer pairs were designed for primary sequencing of the studied mtDNA region of the Colorado potato beetle. Subsequently, 5 species-specific primer pairs were designed, which allowed to obtain a consensus sequence of 3395 bp. It was found that there is only one haplotype within the evaluated individuals. This result was consistent with published information on the non-existent variability of selected mtDNA regions in the European Colorado potato beetle populations.

Sequence data of the studied mtDNA region were used to process an *in silico* phylogenetic study, which included selected members from the families Chrysomelidae, Bruchidae, Cerambycidae and Tenebrionidae. Haplotypes were determined using the DnaSP 6 program. The MEGA X program based on the maximum likelihood (ML) method was used for phylogenetics analysis. The GTR+ G+I model was used for phylogenetic tree construction. Phylogenetic analysis revealed the monophyletic origin of the Chrysomelidae family. The taxonomic unit tribus is probably an artificially created unit, because molecular analysis clusters some members of the *Gastrolina* and *Galeruca* genus differently. The analysis showed that the *Leptinotarsa* and *Chrysolina* genera are sisterly.

It is important to have information about the gender of larvae of the Colorado potato beetle for the population analysis. Due to the fact that there is no obvious sexual dimorphism in larvae, two marker systems based on the relative quantification of loci located on gonosomes and autosomes were developed. Using the Ratio Δ Ct parameter, the relative amount of the template DNA at the *Ldvssc1* locus, located on the X gonosome, was determined in two copies in females and one copy in males. The two proposed marker systems showed that the Ratio Δ Ct values in females are twice as high as in males. The discriminant and canonical analysis statistically confirmed the ability of both marker systems to distinguish between females and males individuals. Non-parametric χ^2 test confirmed that

the ration of female to male sex corresponded to a 1:1 ratio in a selected sample of the population.

The solution of the diploma thesis was supported by projects GA FAPPZ Study of genetics conditions using molecular genetic, bioinformatics and statistical methods (SV20-9-21360), Molecular analysis of nucleic acids of plants and animals and the possibility of its evaluation using methods of bioinformatics and biostatistics (SV19-07-21360) and project NAZV MZe Innovation of integrated protection of potatoes against potato beetle based on new knowledge of genetic and biological characteristics (QK1910270).

Keywords: Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, gene *mtCOII*, founder effect, population

Obsah

1	Úvod	10
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	11
3	Literární rešerše	12
3.1	Evoluce populací	12
3.1.1	Efekt hrdla láhve, efekt zakladatele	12
3.2	Biologická invaze a invazivní druhy	12
3.3	Mandelinka bramborová	14
3.3.1	Původ a rozšíření	14
3.3.2	Variabilita mitochondriální DNA	15
3.3.3	Biologie	16
3.3.3.1	Morfologické rozdíly mezi samečkem a samičkou	17
3.3.4	Mandelinka bramborová jako významný škůdce	18
3.3.4.1	Ochrana proti mandelince	18
3.4	Metody molekulární biologie	18
3.4.1	Izolace nukleových kyselin	18
3.4.2	PCR (Polymerase Chain Reaction)	19
3.4.3	Real Time PCR	20
3.4.4	Gelová elektroforéza	21
3.4.5	Sekvenování DNA	22
3.5	DNA barcoding	23
3.6	Mitochondrie a jejich genom	24
3.6.1	Mitochondriální DNA	25
4	Metodika	27
4.1	Biologický materiál – mandelinka bramborová	27
4.1.1	Původ biologického materiálu	27
4.2	Izolace genomické DNA	28
4.3	Sekvence vybrané části mitochondriální DNA mandelinky bramborové	28
4.3.1	Degenerované primery pro primární sekvenaci	28
4.3.1.1	Navržení degenerovaných primerů a podmínky amplifikace	28
4.3.1.2	Čištění a sekvenování ampliconů pomocí separace v agarózovém gelu	32
4.3.2	Druhově specifické primery pro mitochondriální genom mandelinky bramborové	33
4.3.2.1	Navržení druhově specifických primerů	33
4.3.2.2	Sekvence druhově specifických PCR ampliconů	33
4.3.3	Bioinformatické zpracování sekvenčních dat zkoumané oblasti mitochondriální DNA	34
4.3.3.1	Fylogenetická analýza	34
4.3.3.2	Porovnání sekvenční variability studovaných genů s databází NCBI	34
4.4	Navržení markerovacího systému pro identifikaci pohlaví u mandelinky bramborové	35
4.4.1	Bioinformatická analýza molekulárních dat předcházející návržení markerovacích systémů	35

4.4.2	Identifikace pohlaví na základě relativní kvantifikace DNA pomocí Ratio ΔCt	37
4.4.3	Podmínky amplifikace navržených markerovacích systémů.....	37
4.4.4	Statistické vyhodnocení schopnosti markerů diskriminovat jedince samičího a samčího pohlaví.....	38
5	Výsledky	39
5.1	Kvantita a kvalita izolované DNA	39
5.2	Sekvence vybrané oblasti mitochondriální DNA mandelinky bramborové	39
5.2.1	Velikost amplikonů primární sekvenace a amplikonů druhově specifické sekvenace.....	39
5.2.2	Finální sekvence studované oblasti mitochondriální DNA.....	40
5.2.3	Anotace genů lokalizovaných na studované části mitochondriální DNA.....	41
5.2.4	Fylogenetická analýza	42
5.2.5	Haplotypová analýza.....	45
5.3	Vývoj molekulárních markerů pro identifikaci pohlaví mandelinky bramborové	45
5.3.1	Průběh amplifikace a specifita navržených primerových dvojic	45
5.3.2	Identifikace pohlaví pomocí navržených markerovacích systémů u adultních jedinců	47
5.3.3	Identifikace pohlaví pomocí navržených markerovacích systémů u larev L4	48
5.3.4	Výsledky statistické analýzy diskriminačních schopností navržených markerovacích systémů ...	49
6	Diskuze	53
6.1	Izolace DNA u mandelinky bramborové.....	53
6.2	Analýza vybrané oblasti mitochondriálního genomu	54
6.3	Haplotypová analýza	55
6.4	Fylogenetická analýza.....	56
6.5	Pohlavní dimorfismus mandelinky bramborové a možnosti identifikace pohlaví	58
7	Závěr	62
8	Literatura	64
9	Seznam použitých zkratk a symbolů	71
10	Samostatné přílohy	I
Příloha I	Přehled haplotypů mandelinky bramborové.....	I

1 Úvod

Mandelinka bramborová (*Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824) je celosvětově nejvýznamnějším hospodářským škůdcem brambor (*Solanum tuberosum* L.). Larvy i dospělci mandelinky se živí požerem listů, při jejich přemnožení dochází ke vzniku holožírů a výnos rostlin se snižuje o desítky procent.

Na území Evropy a dnešní České republiky se mandelinka dostala z amerického kontinentu ve druhé polovině minulého století. S ohledem na publikované sekvence mitochondriální DNA lze předpokládat, že mandelinka pronikla na evropský kontinent ze Severní Ameriky díky jediné úspěšné invazi. Analýzou mitochondriální DNA mandelinky bylo totiž zjištěno, že se v rámci Evropy vyskytuje jediný haplotyp. Takováto výrazná ztráta genetické variability je spojována s termínem efekt zakladatele, který popisuje situaci, kdy je nová oblast kolonizována malou skupinou jedinců původem z velké mateřské populace. Lze proto předpokládat, že na evropský kontinent bylo importováno minimální množství jedinců, kteří mají stejný typ mitochondriální DNA, jsou tudíž z hlediska mitochondriální DNA identičtí nebo blízce příbuzní. Přestože je nízká genetická variabilita obecně považována za nevýhodu, mandelince se podařilo na území Evropy trvale usadit a pokračuje v expanzi do Asie a na další kontinenty. Lze ji proto označit jako jeden z nejinvazivnějších druhů, což lze zdůvodnit i obdobnými klimatickými podmínkami v Evropě a Asii. K invazivnosti mandelinky přispěl i člověk masovým pěstováním brambor.

Evropská populace se rozrůznila v jiných oblastech DNA, zejména co se týče polymorfismů zodpovědných za rezistence k různým typům insekticidů. Právě častý výskyt rezistentních jedinců komplikuje ochranu lilkovitých rostlin před mandelinkou. Dalšími komplikacemi jsou extrémní plodnost mandelinky a skutečnost, že mandelinka v podstatě nemá přirozeně se vyskytující predátory.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem diplomové práce je potvrdit nebo vyvrátit následující vědecké hypotézy:

- V rámci čeledi mandelinkovití (Chrysomelidae) existují homologní oblasti genu *mtCOII*, které umožňují navrhnout specifických PCR primerů vhodných pro amplifikaci tohoto genu u mandelinky bramborové.
- Evropské populace mandelinky bramborové jsou odvozeny od malého množství jedinců introdukovaných z Ameriky, a proto lze očekávat malý polymorfismus genu *mtCOII*.
- U mandelinky bramborové existují rozdíly v počtu gonozomů u samičky (XX) a samečka (XO), a proto lze navrhnout specifický markerovací systém na principu qRT-PCR umožňující rozlišení pohlaví.

Z uvedených hypotéz vyplývají následující konkrétní cíle práce:

- Vybrat modelové populace mandelinky bramborové v České republice (adultní jedinci a larvy L4).
- Připravit kolekci izolované DNA z adultních jedinců a larev L4 mandelinky bramborové pocházejících z různých oblastí České republiky.
- Navrhnout druhově specifické primerové páry pro amplifikaci dostatečně velkých fragmentů genu mitochondriální DNA obsahující mimo jiné sekvenci genů *mtCOI* a *mtCOII* s využitím doposud publikovaných sekvencí v mezinárodních nukleotidových databázích.
- Provést ampikonovou sekvenaci vybrané oblasti mitochondriální DNA a získané molekulární data vyhodnotit pomocí fylogenetické analýzy
- Navrhnout markerovací systém na principu qRT-PCR pro identifikaci pohlaví larev L4.

3 Literární rešerše

3.1 Evoluce populací

Populace je soubor jedinců téhož druhu nacházejících se v jednom určitém místě v daném čase. Evoluční změny v populacích jsou pozorovány jako změny v relativních četnostech jednotlivých alel nebo genotypů. Zdrojem genetické variability jsou mutace a rekombinace. Mutacemi vznikají nové alely, rekombinací vznikají nové kombinace alel. Změny způsobené mutacemi a rekombinacemi mohou být pro svého nositele nevýhodné, neutrální nebo výhodné. Mutace vznikají náhodně a jejich frekvence je velmi nízká. Frekvence jednotlivých alel je ovlivněna celou řadou procesů (Flegr 2007).

V této kapitole budou popsány efekt hrdla láhve a efekt zakladatele, které jsou v odborné literatuře uváděny ve spojitosti s evropskými populacemi mandelinky bramborové.

3.1.1 Efekt hrdla láhve, efekt zakladatele

Efekt hrdla láhve (bottle-neck effect) nastává při prudkém poklesu počtu jedinců v populaci. Při takovém zúžení populace musí nutně dojít k poklesu genetické diverzity a tím i heterozygotnosti, protože některé alely vymizely společně se svými nositeli v průběhu snížení početnosti populace a do dalších generací se tak předávají jen některé alely (Nei et al. 1975). Účinek efektu hrdla láhve je tím výraznější, čím větší bude redukce počtu jedinců a čím déle bude tento stav trvat. Efekt hrdla láhve má výrazný vliv zejména na mitochondriální genom, který je děděn pouze po mateřské linii.

Efektu hrdla je podobný efekt zakladatele (founder effect). Efekt zakladatele se ale uplatňuje jen při kolonizaci nového území malou skupinou jedinců původem z velké mateřské populace (Grapputo et al. 2005). Zakladatelská populace tvoří náhodný a omezený vzorek původního genofondu, čímž dochází ke změně alelových frekvencí a ke snížení variability. V extrémním případě může být zakladatelská skupinka tvořena jedinou matkou a jejími potomky (Nei et al. 1975). Účinky efektu zakladatele a efektu hrdla láhve se často vzájemně kombinují, a proto je od sebe někdy lze jen těžko odlišit (Flegr 2007; Macholán 2014).

3.2 Biologická invaze a invazivní druhy

Biologická invaze je definována jako proces, při kterém nepůvodní druh obsadil nové území (Richardson et al. 2000). Invazivní druhy jsou ty, které pronikají do nových biotopů, kde mohou vytlačit původní faunu a flóru a poškodit životní prostředí (Sakai et al. 2001).

Proces invaze se obecně dělí na tři fáze. První je introdukce do nové oblasti, následuje usazení se v dané oblasti a poslední je rozšíření do přilehlých oblastí. Fáze introdukce zahrnuje přesun jedinců z jejich přirozeného prostředí do nového, což často obnáší přesun na velké vzdálenosti, nezářídka i napříč kontinenty. Mezi fázemi introdukce a usazení dochází

k jisté časové prodlevě (anglická literatura používá termín „lag time“), která trvá tak dlouho, dokud se druh neadaptuje na nové podmínky a nevyrovná se s případnou inbrední depresí. Pro „lag time“ je dále typické, že se populace z původního nízkého počtu rozrůstá úměrně tomu, jak rychle se adaptuje na nové podmínky. Během poslední fáze invaze se populace začíná šířit do okolních oblastí a u škůdců je hustota populace již tak vysoká, že začínají způsobovat škody (Sakai et al. 2001).

V cestě úspěšné invazi stojí různé překážky. Globalizace sice smazala ty geografické, nicméně další zůstávají. Boman (2008) uvádí následující: ekologické (abiotické i biotické) a evoluční (genetické). Oboje ovlivňuje schopnost druhů přežít a rozmnožit se v novém prostředí. Ekologické faktory si dovolím jen vyjmenovat podle toho, jak je uvádí Boman (2008), která mezi abiotickými vyzdvihuje jako nejdůležitější teplotu. Jako příklad biotických pak uvádí kompetici, predátorství a poměr mezi parazity a jejich hostiteli. Jako nejdůležitější genetický faktor uvádí Boman (2008) genetickou diverzitu, která bude dále rozebrána.

Velikost invazivní populace je často malá. Proto u nich bývá předpokladem, že si druh během invaze prošel efektem zakladatele a/nebo efektem hrdla láhve. Následkem může být ztráta genetické diverzity, z populace obvykle vymizí zejména vzácné alely (Dlugosch & Parker 2008). Nicméně to nutně nemusí vést k horší schopnosti adaptace. Naopak, Dlugosch a Parker (2008) uvádějí jako příklad, kdy se navzdory snížené genetické diverzitě nový botanický druh adaptoval a byl ve své invazi úspěšný, *Hypericum canariense*.

Další autoři (Sakai et al. 2001; Bomann 2008) ale zdůrazňují nezbytnost genetické variability pro adaptaci invazivního druhu na nové prostředí a odkazují se na opakovanou introdukci, která se často vyskytuje u úspěšných invazivních druhů. Právě opakovaná (můžeme se setkat i s termínem několikanásobná) introdukce má totiž druhu v rámci populace zajistit zvýšení genetické variability.

Genetická diverzita je důležitá pro udržení životaschopnosti a evolučního či adaptačního potenciálu populací a druhů (Holderegger et al. 2006; Allendorf & Lundquist 2003). Záleží ovšem na tom, kterých geneticky podmíněných znaků se diverzita týká. Pokud jde totiž o znaky důležité pro adaptaci, může její ztráta způsobit zpomalení selekce. Pokud bychom měli shrnout vliv snížené genetické diverzity na úspěšnost invaze, je nezbytné rozlišit, které znaky postihne. Holderegger et al. (2006) upozorňují na nutnost rozlišovat genetickou diverzitu adaptační a neutrální. Uvádějí, že neutrální genetická diverzita se týká variant genů, které nemají přímý vliv na fitness. Nemá tedy výpovědní hodnotu, co se adaptačního či evolučního potenciálu populací a druhů týče. Naopak adaptační genetická diverzita neboli genetická diverzita způsobená přirozeným výběrem, odkazuje na geny s přímým vlivem na fitness. Zjednodušeně se dá adaptační genetická diverzita popsat jako přirozená selekce výhodnějšího genotypu.

Mandelinka bramborová nicméně dokázala úspěšně proniknout do Evropy a usadit se v ní jedinou invazí, což je potvrzeno analýzou mitochondriální i genomické DNA. Dokonce se navzdory nízké genetické variabilitě rozšířila po celém evropském kontinentu (Grapputo et al. 2005), což Allendorf a Lundquist (2003) označují jako tzv. genetický paradox.

3.3 Mandelinka bramborová

Mandelinka bramborová (dále jen mandelinka), *Leptinotarsa decemlineata*, náleží do čeledi Chrysomelidae. Zástupci této čeledi se živí rostlinami během larválního i dospělého stádia. Mandelinka představuje nejznámějšího zástupce této čeledi. Dospělí brouci mají oválný tvar těla, které je 10 mm dlouhé a 7 mm široké. Základní zbarvení je světle žluté. Na každé krovce je pět tmavých pruhů táhnoucích se přes celou její délku. Na hlavě a štítu mandelinky se vyskytují tmavé skvrny (Alyokhin et al. 2013). Právě podle deseti tmavých pruhů byla mandelinka pojmenována (latinsky *decem linea*), jak uvádí Zahradník (2008).

Mandelinka patří do třídy hmyz (Insecta), řádu brouci (Coleoptera) a čeledi mandelinkovití (Chrysomelidae) (Kazda et al. 2001).

3.3.1 Původ a rozšíření

Mandelinka je původem z Mexika. Divoké populace zde parazitují primárně na rostlině *Solanum rostratum*, která je proto pokládána za původního hostitele. Je možné, že brouci stejně jako jejich hostitelská rostlina byli na území Severní Ameriky zavléčeni španělskými osadníky, kteří na území dnešních Spojených států amerických přišli ze Střední Ameriky a dále právě přes Mexiko. Mandelinka byla poprvé nalezena v roce 1811 na území Spojených států amerických Thomasem Nuttallem. Poprvé byla popsána roku 1824 Thomasem Sayem, který brouky sbíral na hranicích států Iowa a Nebraska. Nejprve byla mandelinka taxonomicky zařazena do rodu *Chrysomela*, později byla přesunuta do rodu *Doryphora*. Aktuálně je již od roku 1865 trvale zařazena do tehdy nově pojmenovaného rodu *Leptinotarsa* (Alyokhin et al. 2013).

V roce 1860 byly zaznamenány škody způsobené tímto broukem ve státě Nebraska. Roku 1874 dosáhla mandelinka pobřeží Atlantského oceánu (Zahradník 2008). První evropská populace mandelinky byla objevena v Anglii roku 1875, odkud se následně mandelinka rozšířila přes Německo (rok 1877) i do kontinentální Evropy. Mimo jiné byl její výskyt zaznamenán i v Polsku. Nicméně veškeré evropské populace mandelinky byly záhy vymýceny (Alyokhin et al. 2013). Díky karanténním opatřením byla Evropa prostá mandelinky až do roku 1922, kdy došlo k rychlému rozmnožení mandelinky ve Francii. Následně se mandelinka rozšířila prakticky po celé Evropě, čemuž pomohly i přesuny vojenských nákladů během druhé světové války (Alyokhin 2009; Boman 2008). V roce 1949 došlo k opětovnému vyhubení mandelinky, ovšem o devět let později, v roce 1958, umožnilo teplé počasí a příznivě vanoucí větry invazi, kdy došlo ke konečnému usazení a pokračující expanzi mandelinky po Evropě (Alyokhin et al. 2013).

V současnosti mandelinka působí škody na bramborách po celé Evropě, ve Spojených státech amerických i Asii. Potenciálně by se mandelinka mohla rozšířit do mírného pásma Východní Asie, Indonéského subkontinentu, Jižní Ameriky, Afriky, na Nový Zéland i do Austrálie (Weber 2003), respektive Radcliffe a Lagnaoui (2007) uvádějí, že se již rozšířila i na území Iránu, Střední Asie, východní Číny i na Sibiř a do asijské části Ruska.

V České republice došlo k masovému rozšíření mandelinky po druhé světové válce. Mandelinka na našem území nejvíce škodí v teplých oblastech, a to především na jižní a jihovýchodní Moravě a v Polabí, kde může, vzhledem k příznivým klimatickým podmínkám, vytvořit dvě generace (Rasocha et al. 2009). V současné době se mandelinka objevuje i v lesích, kde se brambor nikdy nepěstoval, jako například ve Vysokých Tatrách či Krkonoších (Zahradník 2008).

Přestože je mandelinka, zejména za příznivých podmínek, schopna letu na delší vzdálenosti (Boiteau et al. 2003; Boman 2008), její rychlé rozšíření je primárně následkem lidské činnosti – přeprava brambor na velké vzdálenosti a doprava v oblastech, kde se brambory pěstují (Alyokhin et al. 2013).

3.3.2 Variabilita mitochondriální DNA

Pro hodnocení genetické variability mitochondriální DNA se u mandelinky bramborové porovnává výskyt tzv. haplotypů. Haplotyp je skupina alel na jednom chromozomu, které jsou potomky děděny pohromadě, což znamená, že mezi nimi nedochází k rekombinacím. Jedinci sdílející stejný (identický) haplotyp musejí tedy mít společného předka, od kterého haplotyp zdědili. Haplotypy jsou studovány pomocí sekvenčních analýz, které stanovují pořadí jednotlivých dusíkatých bází ve studovaném úseku genomu.

Grapputo et al. (2005) porovnávali haplotyp mitochondriální DNA (dále může být uvedeno jen jako mtDNA) třinácti evropských populací mandelinky s haplotypy dvaceti původních populací mandelinky bramborové v Severní Americe a zjistili, že evropské populace mají shodný haplotyp pouze s jednou populací mandelinek ze Severní Ameriky, což podporuje teorii o rozšíření mandelinky na evropský kontinent díky jediné úspěšné invazi. Pro svou analýzu si vybrali oblast mitochondriálního genu *mtCOII*, který je u mandelinky bramborové nejčastěji používaným mitochondriálním genetickým markerem a to z toho důvodu, že mitochondriální DNA neobsahuje introny, má omezenou četnost rekombinací a je maternálně a haploidně dědičná, kdy maternální dědičnost umožňuje vystopovat přímou genetickou linii mezi populacemi.

Část mitochondriálního genomu o velikosti 577 bp obsahující sekvenci genu *mtCOII* osekvenovaná Grapputem et al. (2005) je zveřejněna v databázi NCBI pod číslem AJ884950.1. Grapputo et al. (2005) ji ve svých výsledcích označili jako haplotyp 1 (H1), který je společný všem jimi testovaným jedincům pocházejících z evropských populací mandelinky bramborové. Stejný haplotyp identifikovali i u všech deseti testovaných populací ve státě Idaho.

Na Grapputo et al. (2005) navázali Crossley et al. (2019), kteří osekvenovali 544 bp veliký úsek mitochondriální DNA taktéž obsahující sekvenci genu *mtCOII* u amerických populací mandelinky bramborové zveřejněnou v databázi NCBI pod číslem MK605457.1., i oni tento haplotyp označili jako H1. Bohužel není z jimi publikovaného geografického popisu možné se stoprocentní přesností určit, ze kterého amerického státu populace s tímto haplotypem pochází.

Obdobné výsledky byly publikovány i dalšími autory (Boman 2008; Przybylska et al. 2014). Boman (2008) stejně jako Grapputo et al. (2005) a Crossley et al. (2019) porovnávala evropské a severoamerické populace, zatímco Przybylska et al. (2014) se zaměřili pouze na polské populace mandelinky bramborové.

Naopak v jaderném genomu je pomocí molekulárně genetických metod AFLP (polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů) a RFLP (polymorfismus délky restričních fragmentů) identifikováno velké množství SNP (jednonukleotidových polymorfismů), které jsou intenzivně sledovány kvůli spojitosti s rezistencí k insekticidům (Clark et al. 2001; Hawthorne 2001; Kim et al. 2005; Clements et al. 2016; Crossley et al. 2017).

3.3.3 Biologie

Brouci i larvy žijí na lilkovitých rostlinách, nejčastěji ale na bramboru (Allendorf & Lundquist 2003; Boman 2008; Zahradník 2008). Jejich výskyt byl zaznamenán i na rulíku zlomocném, lilku potměchuti, rajčeti a tabáku. Ne všechny lilkovité rostliny jsou ale vhodné pro vývin larev. Například na blínu se vyskytují jen brouci, neboť jeho listy jsou pro larvy jedovaté (Zahradník 2008). Brouci parazitují i na dalších zástupcích čeledi lilkovitých, jako je paprika, durman, kustovnice, mochně židovská třešeň aj. (Rod et al. 2005).

Optimální podmínky pro množení druhu jsou při suchém a teplém počasí (Rod et al. 2005). Mandelinka je polygamní druh, kopuluje s různými partnery, nicméně 5-20 % všech kopulací nevede k přenosu spermatu. Přezimující samičky mohou klást vajíčka oplodněná spermii z podzimního páření před přezimováním, tzn. z předchozího roku. Počet potomků je ale v tomto případě nižší, než když se samička páří na jaře (Alyokhin 2009). Samičky kladou vajíčka ve skupinách na spodní stranu listů brambor. Skupina je průměrně tvořena 30-35 vajíčky. Průměrná plodnost samiček je 500 vajíček. Za optimálních teplotních podmínek se zhruba za 10 dní z vajíček líhnou larvy (Rasocha et al. 2008). Samička klade vajíčka po dobu několika týdnů, kdy se přesunuje ze starších rostlin na mladší. Během období kladení vajíček se samička intenzivně živí listy rostlin (Boiteau 1992).

Larva mandelinky prochází čtyřmi vývojovými stadii (třikrát se svléká) a zakuklení probíhá v zemi (Zahradník 2008). Dospělý brouk se objevuje jeden až dva týdny po zakuklení posledního čtvrtého larválního stádia (Boiteau 1992). Celý vývoj od vajíčka po dospělé další generace trvá 40-60 dní (Šefrová 2006), nejrychleji probíhá při teplotě 25-32 °C (Alyokhin 2009).

Dospělec mandelinky přezimuje v diapauze v půdě v hloubce až 50 cm. Diapauza je geneticky podmíněna a impulsem k jejímu zahájení je zkracující se světelná část dne. Toto období klidové fáze trvá přibližně tři měsíce. Diapauza je ukončena teplotami nad 10 °C (Alyokhin 2009), obvykle ve druhé polovině května (Rasocha et al. 2009). Po vyhrabání z půdy brouk aktivně vyhledává hostitelské rostliny z čeledi lilkovitých (Boiteau 1992). Podle rázu krajiny a klimatických podmínek vytvoří mandelinka v průběhu roku jednu nebo dvě generace (Zahradník 2008). Brouci druhé generace se obvykle líhnou v červnu (Rod et al. 2005).

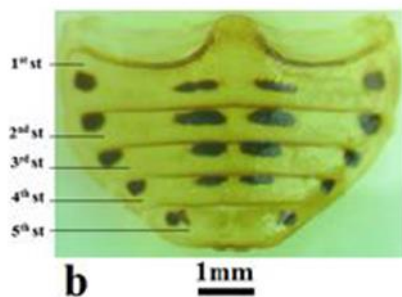
Mandelinky jsou schopny jak chůze, tak i letu. Protože mandelinky dokážou doletět až na vzdálenost několika kilometrů, je pro ně let důležitější než chůze. Mandelinka má tři odlišné typy letu. První z nich je krátký, tzv. místní („short-range“), který využívá jen v hostitelském prostředí. Další druh letu je dlouhý, tzv. stěhovavý („long-range“), používaný pro kolonizaci nových oblastí, který probíhá po větru. Třetím typem letu je tzv. diapauza, která začíná spirálovitým výstupem z plodiny s následnou orientací na vysokou vegetaci. Po čase se mandelinka snese na zem, kde se zahrabe do půdy (Alyokhin 2009).

3.3.3.1 Morfologické rozdíly mezi samečkem a samičkou

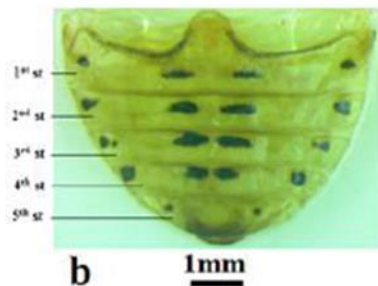
Tělo mandelinky bramborové je členěno na hlavu, hrud' a zadeček. A právě drobné anatomické rozdíly v utváření zadečku umožňují makroskopické odlišení samečka od samičky, jak popisují Khidhir a Mustafa (2018).

Zadeček má oválný tvar a u samičky je větší než u samečka. Další rozdíl je v pigmentaci ventrální plochy zadečku. U obojího pohlaví jsou na sternitech zadečku černé oválné skvrny, které z obou stran lemují osu zadečku. Další černé skvrny jsou rozmístěny po jedné na laterálním okraji každého sternitu. U samičky jsou v porovnání se samečkem tyto skvrny výrazně menší. Další rozdíl je patrný v utváření posledního sternitu, který je u samečka zakončen ploše, zatímco u samičky je oválný (Obrázky 1 a 2).

Obrázek 1 Zadeček sameček - ventrální pohled



Obrázek 2 Zadeček samička - ventrální pohled



(Oba obrázky zdroj: Khidhir & Mustafa 2019)

3.3.4 Mandelinka bramborová jako významný škůdce

Mandelinka je nejvýznamnější škůdce brambor. Larvy i brouci škodí zejména žírem listů. Nejvýraznější škody způsobují larvy nejstarších vývojových stadií (Rasocha et al. 2008). V průběhu larválního vývoje je jediná mandelinka schopná zkonzumovat přibližně 40 cm² listů bramboru, a jako imago téměř 10 cm² listů denně. Jakmile mandelinka spotřebuje všechny listy bramboru, živí se dále jeho stonky a hlízy (vyčnívajícimi nad zem i těmi těsně pod povrchem půdy), přestože listy jsou pro ni nevhodnějším zdrojem potravy (Alyokhin 2009; Cingel et al. 2016; Doležal & Hausvater 2018). Při silném přemnožení mandelinka způsobuje holožírny a tím výrazně snižuje výnos brambor, při silném napadení dokonce až o 30-50 % (Allendorf & Lundquist 2003; Rod et al. 2005; Cingel et al. 2016). Brambory jsou před mandelinkou nejzranitelnější v období brzy po vzejití, kdy se ještě netvoří hlízy. Pokud nejsou v tomto období brambory před mandelinkou chráněny, lze očekávat úplné zničení natě a tím i celé produkce brambor (Doležal & Hausvater 2018).

Mandelinka je úspěšným invazivním druhem a škůdcem hned z několika důvodů. Za prvé je to dáno tím, že samičky jsou velmi plodné a během vegetační doby mohou naklást až 1300 vajíček. Za druhé mají nepříjemnou chuť a jsou aposematicky zbarvené (výstražné zbarvení, často kombinace žluté/žlutooranžové a černé, které ostatní živočichy varuje, že se jedná o jedovatého či jinak nebezpečného jedince). Oboje vede k tomu, že má mandelinka jen velmi málo přirozených predátorů. Navíc živočichové parazitující na jejích vajíčkách nebyli schopni mandelinku následovat během jejích přesunů na další kontinenty. A za třetí si mandelinka velmi rychle vytvořila rezistenci vůči značnému množství insekticidů (Hare 1999; Lyttinen et al. 2008).

3.3.4.1 Ochrana proti mandelince

Mandelinka patří ke škůdcům s nejvyšší pravděpodobností selekce rezistentních populací k insekticidům. Důvodem je její schopnost adaptace na obranné látky rostlin, které buď dokáže zbavit toxicity, nebo je umí tolerovat. V ochraně proti mandelince byly testovány stovky chemických přípravků, přičemž postupně vznikaly populace rezistentní k DDT, organofosfátům, pyrethroidům, neonikotinoidům a dalším. Rezistence mandelinky pravděpodobně zůstane i nadále hlavní komplikací v ochraně proti ní (Hausvater & Doležal 2014).

3.4 Metody molekulární biologie

3.4.1 Izolace nukleových kyselin

Izolace nukleových kyselin je prvním krokem většiny molekulárních metod. Jejím principem je oddělit nukleovou kyselinu od zbylého biologického materiálu za použití chemických a fyzikálních metod. Cílem je získat dostatečné množství nukleových kyselin v co nejvyšší čistotě.

Izolace nukleových kyselin vždy zahrnuje tyto tři základní kroky – rozrušení buněk a tkání, odstranění kontaminujících látek a konečně extrakci samotné nukleové kyseliny.

K rozrušení celistvosti buněk a uvolnění jejich obsahu je nutné vyvolat lýzu pomocí lyzačních roztoků. Lyzační roztok obsahuje detergenty, které způsobí snížení osmolarity a popraskání buněk. U bakterií a rostlinných buněk je důležité nejprve rozrušit buněčnou stěnu, čehož se docílí přidáním lysozymu, CTAB nebo celulázy. Lýzu živočišných buněk, které postrádají buněčnou stěnu, vyvolá již slabé detergenční činidlo. Z takto rozrušených buněk vzniká v lyzačním roztoku směs nukleových kyselin a degradačních produktů buňky, typicky se jedná o proteiny, lipidy, sacharidy, uhlovodíky nebo nízkomolekulární látky.

K odstranění kontaminujících látek ze směsi se využívá proteáza (nejčastěji Proteináza K), která natráví přítomné proteiny, RNáza pro odstranění RNA a chelatační činidlo (používá se EDTA), které vyvazuje dvojmocné kationty, čímž deaktivuje DNázy, které by degradovaly DNA (Šmarda et al. 2010)

3.4.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)

PCR neboli polymerázová řetězová reakce je metoda, která umožňuje amplifikaci (zmnožení) specifického úseku DNA *in vitro*. Výhodou je, že PCR funguje i u vzorků DNA o velmi nízké koncentraci.

Principem reakce je cyklicky se opakující enzymatická syntéza kopií templátové DNA, během které se opakují tři teplotně řízené fáze: denaturace, annealing a elongace (Bartlett & Stirling 2003; Šmarda et al. 2010).

Požadovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen navázáním dvou vhodně vybraných oligonukleotidových primerů, které specificky hybridizují s komplementárními sekvencemi na obou koncích studované templátové DNA a slouží jako základ pro syntézu nových vláken.

Po navázání primerů začíná syntéza podle jednovláknových templátů, probíhá obousměrně od obou primerů ve směru 5' → 3'. Syntéza je katalyzována enzymem termostabilní DNA polymerázou na principu komplementarity bází. Jako termostabilní DNA polymeráza se nejčastěji používá *Taq* DNA polymeráza, která byla izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*. Tato bakterie přežívá v horkých pramenech, takže jsou její enzymy přizpůsobené vysokým teplotám a nepodléhají denaturaci, tzn. i její DNA polymeráza je termostabilní. Její teplotní optimum je přibližně 70 °C, ale přestože při PCR dochází k cyklickému zahřívání reakční směsi na teplotu až 94 °C, nedojde k denaturaci *Taq* DNA polymerázy. Enzym pracuje tak dlouho, dokud je ve zkumavce, kde PCR probíhá, optimální teplota pro jeho aktivitu (Chien et al. 1976).

Reakční směs pro PCR obsahuje následující komponenty:

- analyzovaná (templátová) DNA
- dva primery
- dNTP (deoxyribonukleotid trifosfáty)
- termostabilní DNA polymerázu
- Mg²⁺ a ostatní složky pufu

Celá reakce probíhá v přístroji termocykleru, ve kterém se automaticky mění teplota v předem naprogramovaných časových intervalech. V závislosti na teplotě reakční směsi tak dochází ke střídání jednotlivých fází cyklu:

1. Denaturace DNA, rozrušení vodíkových můstků mezi komplementárními bázemi vláken DNA a DNA se mění z dvouvláknové na jednovláknovou, 94-98 °C po dobu 30 s.
2. Annealing primerů k jednovláknovým templátům při 30 – 65 °C po dobu 30-60, čímž dojde k hybridizaci primerů s templátem (vytvoření vodíkových můstků mezi komplementárními úseky). Teplota annealingu je velmi specifická, aby primer nasedl pouze na ten úsek templátové DNA, ke kterému je komplementární v celé své délce.
3. Polymerační fáze (prodlužování, elongace) probíhá při teplotě 65 – 72 °C po dobu 45-90 s (podle délky templátové DNA). DNA polymeráza syntetizuje nové řetězce DNA podle DNA templátu (Chien et al. 1976; Hruban & Majzlík 2002; Šmarda et al. 2010; Domingues 2017).

Tyto tři kroky se neustále opakují. Počet opakování je limitován aktivitou DNA polymerázy, obvykle se cyklus opakuje 35 krát. S každým cyklem PCR se počet molekul DNA zdvojnásobuje, což se popisuje jako exponenciální růst. V dalších cyklech primery a následně i DNA polymeráza nasedají na původní (templátové) vlákno DNA i na vlákna nově nasyntetizovaná v předchozích cyklech (Hruban & Majzlík 2002; Šmarda et al. 2010; Domingues 2017).

3.4.3 Real Time PCR

Metoda real time PCR je jednou z modifikací klasické PCR, která umožňuje kontinuálně monitorovat přírůstky DNA během každého cyklu. Princip reakce je opět založen na třech cyklicky se opakujících krocích denaturace, annealingu a elongace. I složení reakční směsi je stejné jako u klasické PCR s tou výjimkou, že jsou navíc přidány fluorescenční látky. Reakce také běží ve speciálním cykleru, který kromě cyklického střídání teplot detekuje fluorescenci a zaznamenává přírůstky DNA během každého cyklu. Detekce množství DNA je podmíněna přítomností fluorescenčních látek, které po navázání na přítomnou DNA fluorescenci vyzařují. Emitovaná fluorescence je detektorem monitorována v každém cyklu PCR a odráží množství přítomné DNA (je přímo úměrná koncentraci produktu přítomného v reakční směsi). Výsledkem PCR v reálném čase je tedy graf, kde je naměřená fluorescence vynesena proti příslušnému cyklu, čímž vzniká tzv. amplifikační křivka (Šmarda et al. 2010; Domingues 2017).

Pro zjednodušení zde uvádím jen základní rozdělení fluorescenčních látek převzaté od Navarro et al. (2015), kteří je dělí do dvou skupin podle použitého fluorescenčního agens a specifiy detekce PCR produktů:

1. Interkalární barviva vázající se na DNA (např. SYBRGreen I), které se vážou mezi vlákna dvoušroubovice DNA, tzn. mezi vlákno templátové DNA a nově

syntetizované k ní komplementární vlákno. Dokud nedojde k zabudování interkalárního barviva do dvoušroubovice DNA, emituje jen velmi slabou fluorescenci, která se po zabudování zintenzivní a dále se zvyšuje s rostoucí koncentrací produktu PCR reakce. Nevýhodou je, že není možné rozlišit specifické a nespecifické produkty PCR, protože interkalární barviva se mohou vázat do jakékoliv dvoušroubovice (např. dimery primerů).

2. Oligonukleotidy značené fluoroforem, které se vážou specificky na templátovou DNA v úseku mezi forwardovým a reverzovým primerem. Díky exonukleázové aktivitě DNA polymerázy dojde při syntéze komplementárního vlákna k odštěpení fluoroforu a emisi fluorescence. Na rozdíl od předchozí skupiny dochází k detekci pouze specifických produktů PCR.

Real-time PCR je založena na konceptu Ct hodnoty („threshold cycle“ překládá se jako cyklus prahu), což je cyklus, ve kterém intenzita fluorescence překročí práh pozadí (threshold), které se v reakci vyskytuje a je již zachycena detektorem. Čím vyšší je počáteční koncentrace templátové DNA v reakční směsi, tím dříve se fluorescence produktu dostane nad hranici threshold a tím nižší je hodnota Ct (Šmarda et al. 2010). Někteří autoři místo Ct používají označení Cq.

Metodu real time PCR používáme ke stanovení míry exprese genů. Jako referenční geny se používají tzv. housekeepingové geny, u kterých předpokládáme stejnou transkripci či počet jejich kopií u všech testovaných vzorků (Labguide 2014).

Pomocí parametru ΔCt lze porovnat dva vzorky za využití house keepingového (referenčního) genu. Hodnotu ΔCt lze získat odečtením Ct house keepingového genu od Ct sledovaného genu (Perkins et al. 2012).

K přesnějšímu výpočtu kvantifikace RT-PCR je zapotřebí hodnota eficeience (E), která je definována jako zlomek cílových molekul, které jsou kopírovány v jednom cyklu PCR. To je v ideálním případě 2^n , kdy n je počet cyklů reakce. Tohoto stavu ale většinou není dosaženo a účinnost reakce bývá nižší. V případě nepřítomnosti interferujících látek v matrici vzorku by se měla cílová DNA amplifikovat alespoň s 90% účinností (Lalam 2006; Perkins et al. 2012; Labguide 2014).

3.4.4 Gelová elektroforéza

Gelová elektroforéza patří v molekulární biologii mezi nejčastěji používané separační techniky. Její princip spočívá v separaci analyzovaných molekul/fragmentů nukleových kyselin nebo proteinů na základě rychlosti pohybu gelem, ve kterém je vytvořeno elektrické pole. Rychlost pohybu je ovlivněna velikostí, konformací a nábojem.

V případě nukleových kyselin je pohyb gelem způsoben jejich záporným nábojem, H_3PO_4 na 3' konci molekuly DNA ve vodném prostředí disociuje, uvolňuje H^+ , vzniklý fosfát má negativní náboj a molekula DNA se díky tomu elektricky nabitým gelem pohybuje od

záporně nabitě elektrody (katody) k anodě, elektrodě s pozitivním nábojem. Vzorky nukleových kyselin se na gel nanášejí do jamek vytvořených hřebínkem.

Pro elektroforézu DNA se jako nosič nejčastěji používá agarózový nebo polyakrylamidový gel o různé hustotě. V gelu se tak vytvoří složitá síť polymerních molekul s póry, jimiž různě velké molekuly prostupují s rozdílnou rychlostí. Rychlost pohybu makromolekul se označuje elektroforetická pohyblivost a je nepřímo úměrná jejich velikosti. Migrace v gelu je při elektroforéze kontrolována pomocí barviva přítomného v nanášecím pufru, se kterým je roztok DNA před nanesením na gel smíchán. Pro zjištění velikosti fragmentů DNA se do gelu přidávají i tzv. velikostní standardy, což jsou fragmenty DNA o známém počtu bází. Velikost analyzovaného fragmentu je následně možné odhadnout pomocí kalibrační křivky na základě vzdálenosti, kterou v gelu urazil. Pro vizualizaci molekul DNA po elektroforetické separaci se nejčastěji používá značení ethidium bromidem, samotná vizualizace probíhá pod fluorescenční lampou (UV záření zviditelní značené fragmenty). Další možnosti vizualizace je radioaktivní značení nebo hybridizace se značenou sondou. Pro další manipulaci je možné fragmenty DNA z gelu izolovat (Šmarda et al. 2010; Domingues 2017).

3.4.5 Sekvenování DNA

Sekvenování DNA slouží ke stanovení primární struktury, tedy sekvence nukleotidů dané molekuly DNA. Tato znalost nám následně umožní odvodit aminokyselinovou sekvenci kódovaných proteinů. Popisují se dvě základní metody: Maxam-Gilbertova a Sangerova.

Maxam-Gilbertova metoda využívá chemického štěpení jednotlivých typů bází. Pracuje se s jednovláknovou molekulou DNA, která je na jednom ze svých konců radioaktivně označena. Reakce běží ve čtyřech zkumavkách (máme čtyři typy bází v DNA) a v každé z nich je prováděno štěpení jen určitého typu bází, tzn. DNA je štěpeno jen v místě určitých bází, čímž vzniká směs různě dlouhých DNA fragmentů, které končí v místě určité báze. Následně se provede elektroforéza všech 4 vzorků vedle sebe. Na základě vzdálenosti, kterou gelem urazí, určíme rozdíly v délce fragmentů a zároveň určíme, jak daleko od začátku fragmentu tato báze byla. Odečtením pozice jednotlivých bází ve všech čtyřech reakcích stanovíme sekvenci daného úseku (Maxam & Gilbert 1977).

Sangerova metoda naopak využívá proces replikace DNA (obdobně jako PCR). Na jednořetězcovou DNA se naváže radioaktivně značený primer, který je komplementární k začátku sekvenovaného úseku. Od navázání primeru začne syntéza DNA. Směs obsahuje deoxynukleotidy a dideoxynukleotidy, přičemž dideoxynukleotidy jsou zastoupeny jen ve velmi malém množství. Reakce opět běží ve čtyřech zkumavkách, každá zkumavka obsahuje jen jeden typ dideoxynukleotidu (tzn. buď ddATP, nebo ddCTP, nebo ddGTP, nebo ddTTP). Dideoxynukleotidy se náhodně začlení do syntetizovaného řetězce místo příslušného deoxynukleotidu. Protože dideoxynukleotidy nemají na svém 3' – konci hydroxylovou skupinu, na niž by se mohl navázat další nukleotid, dochází zabudováním dideoxynukleotidu do vznikajícího řetězce k zastavení syntézy a řetězec se již dále neprodlužuje. V reakční směsi tak vznikají různě dlouhé fragmenty DNA, které na svém konci nesou specificky značený dideoxynukleotid. Vyhodnocení opět probíhá pomocí elektroforézy. Po separaci fragmentů

se díky radioaktivnímu značení primerů odečte délka jednotlivých fragmentů. Pozice jednotlivých fragmentů odpovídají pozicím jednotlivých nukleotidů v sekvenovaném vzorku (Sanger & Coulson, 1975).

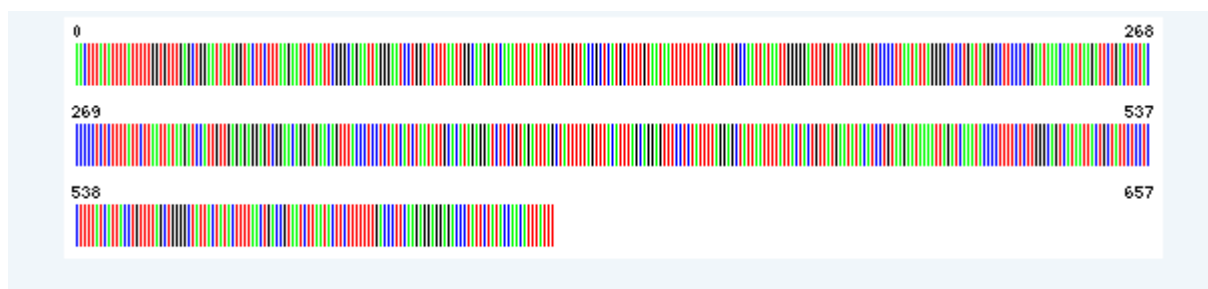
V současnosti se k sekvenování používají zejména automatické sekvenátory, kde syntéza DNA probíhá pouze v jedné reakci. Vzniklé produkty jsou značeny dideoxynukleotidy s fluorescenčními barvami a určení pořadí jednotlivých nukleotidů probíhá na kapilární elektroforéze pomocí laserového detektoru (Šmarda et al. 2010).

3.5 DNA barcoding

DNA barcoding je rozvíjející se taxonomická metoda, která vychází z předpokladu, že každý biologický druh obsahuje v genomu krátkou sekvenci, která je pro něj naprosto unikátní, takže by na jejím základě mělo být možné od sebe vzájemně odlišit různé druhy (Hebert et al. 2003a; Roopnarine 2006). Taková sekvence by měla podléhat mutacím dostatečně rychle na to, aby byla odlišná od sekvence blízké příbuzných druhů, zároveň ale tak pomalu, aby zůstaly zachovány minimální rozdíly mezi jednotlivci v rámci jednoho druhu (Roopnarine 2006).

Název „DNA barcoding“ vychází z analogie s čárovými kódy na výrobcích, podle kterých se dá zboží naprosto přesně identifikovat (Hebert et al. 2003a). Výběr vhodného bar kódu v DNA není vůbec jednoduchý. Některé úseky genomu totiž nepodléhají vůbec žádným změnám a jiné naopak mutují až příliš často, aby se daly použít (Hebert et al. 2003a).

Pro výběr bar kódu pro živočichy se zdá být ideální mitochondriální DNA, která obsahuje celkem 13 genů pro různé proteiny. Navíc mitochondriální DNA na rozdíl od DNA jaderné neobsahuje introny, má omezenou četnost rekombinací a je haploidně dědičná (Saccone et al. 1999). Hebert et al. (2003a,b) navrhli použít jako bar kód jediný gen, s jehož pomocí by bylo možné identifikovat jakýkoliv druh napříč živočišnou říší. Konkrétně si zvolili sekvenci mitochondriálního genu pro podjednotku 1 cytochrom c oxidázy (*mtCOI*) a následně u něj prokázali, že více než 95 % živočišných druhů má v tomto genu odlišnou sekvenci. Výhodou tohoto genu je, že sekvence použitá pro „barcoding“ je dostatečně krátká (648 bp), takže může být rychle sekvenována, a zároveň je dostatečně dlouhá, aby mohla být použita k identifikaci druhů (Hebert et al. 2003a). Vzorový „barcoding“ je uveden na obrázku 3.



Obrázek 3 Bar kód mandelinky bramborové, část genu *mtCOI*

(Zdroj: “Public Data Portal - Specimen Record”)

3.6 Mitochondrie a jejich genom

Mitochondrie jsou cytoplasmatické orgány, které jsou přítomné ve většině eukaryotických buněk. Jejich šířka je až 1 μ m a délka až 10 μ m, jejich tvar je sférický až oválný. Proti cytoplazmě jsou ohraničeny dvojitou membránou – vnější a vnitřní. Vnější je vybavena receptory pro komunikaci s okolní cytoplasmou a vnitřní vybíhá v četné výběžky, tzv. kristy. Různé buňky mohou obsahovat různý počet mitochondrií, řádově od desítek až po stovky tisíc. Počet mitochondrií souvisí s metabolickou aktivitou příslušných tkání.

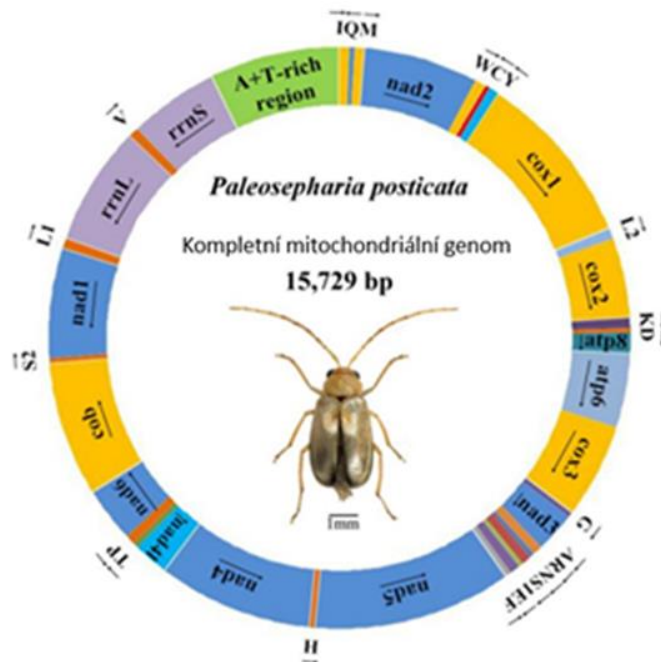
Mitochondrie jsou energetickým centrem buňky. Probíhá v nich Krebsův cyklus a oxidativní fosforylace, procesy transformující energii, která je následně uložena ve formě molekul ATP (Gibson 2005).

Z evolučního hlediska jsou mitochondrie řazeny mezi tzv. semiautonomní orgány. Vyvinuly se pravděpodobně z bakterií, které pronikly do jiných buněk, a vytvořily si s nimi endosymbiotický vztah (Gray 1999; Poole & Penny 2007). Podle endosymbiotické teorie byla mitochondrie původně volně žijící bakterie, která byla během evoluce pohlcena původní eukaryotickou buňkou a stala se jejím endosymbiontem (Dyall & Johnson 2000; Ballard & Rand 2005). O cizorodém původu mitochondrií vypovídá dvojitá membrána i vlastní genetická informace, která je uložena ve formě DNA prokaryotického uspořádání (kruhová molekula DNA) (Holland & Parsons 1999).

3.6.1 Mitochondriální DNA

Mitochondriální DNA (dále jen mtDNA) (Obrázek 4) je relativně malá cirkulární dvoušroubovice DNA o velikosti 13-26 kb, která je nositelem mimojaderné dědičnosti. Je volně uložena v matrix, blízko vnitřní mitochondriální membrány.

Obě dvě vlákna dvoušroubovice mtDNA se vzájemně liší co do obsahu dusíkatých bází, díky čemuž je rozlišováno vlákno těžké (bohatší na puriny – adenin a guanin), zatímco vlákno obsahující více pyrimidinových bází (cytosin a thymin) se označuje jako lehké. Oba řetězce nesou počáteční místa replikace označované jako ori H a ori L. MtDNA obsahuje celkem 37 genů, z nichž většina nese informace pro RNA molekuly. 28 z nich je kódováno těžkým vláknem a 9 lehkým. Tyto geny kódují 2 ribozomální RNA, 22 typů transferových RNA a 13 proteinů, které jsou nezbytné pro oxidativní fosforylaci – podjednotky respiračního řetězce a ATPázového komplexu (Ballard & Rand 2005). Součástí mitochondriálního genomu je i tzv. DNA-smyčka, která neobsahuje kódující geny, pouze transkripční faktory a replikační počátek pro těžký řetězec. Zajímavá je tím, že má důsledkem zvýšeného výskytu mutací zvýšenou sekvenační variabilitu, díky čemuž je hojně využívána v populačně genetických studiích (Pakendorf & Stoneking 2005).



Obrázek 4 Molekula mitochondriální DNA *Paleosepharia posticata*, zástupce řádu Coleoptera

(Upraveno podle Wang & Tang, 2017)

Genetická informace uložená v jádře buněk je děděna podle pravidel mendelistické genetiky. Matka i otec se na výsledné variantě DNA uložené v jádře buňky podílejí každý jednou sadou chromozomů. U dědičnosti mtDNA to ale funguje jinak. Matka předává svůj mitochondriální genom všem svým potomkům a do dalších generací ho předávají jen její dcery. Jedná se tedy o maternální dědičnost (Hutchison et al. 1974; Giles et al. 1980). Je to dáno i tím, že většinu mitochondrií obsahuje na cytoplasmu bohaté vajíčko. Spermie obsahují jen minimální počet mitochondrií, které jsou po splynutí pohlavních buněk zničeny samičí pohlavní buňkou – vajíčkem (Sutovsky et al. 1999).

4 Metodika

4.1 Biologický materiál – mandelinka bramborová

4.1.1 Původ biologického materiálu

V rámci diplomové práce byly analyzovány dvě kategorie vzorků. První skupinou byli dospělí samečci (15 jedinců), dospělé samičky (15 jedinců) a padesát L4 larev, kteří byli získáni sběrem na Pokusném a demonstračním pozemku ČZU v Praze v srpnu 2019. Tito jedinci byli použiti pro optimalizaci všech experimentů zaměřených na sekvenaci mitochondriálního genomu i pro molekulární metodu určení pohlaví a fylogenetickou analýzu.

Druhou skupinou analyzovaných vzorků byli dospělci obou pohlaví, pocházející z různých lokalit České a Slovenské republiky. Sběr těchto brouků probíhal ve spolupráci s pracovníky VÚB HB a Biologického centra AVČR v Českých Budějovicích. Z každé z celkem čtrnácti lokalit (třináct lokalit v ČR a jedna lokalita na Slovensku - Tabulka 1) bylo odebráno sto brouků, kteří byli zamrazeni a v chladících boxem přepraveni na katedru genetiky a šlechtění ČZU v Praze. Sběr proběhnul během měsíců června a července roku 2019. Vybraní jedinci jsou původem ze staré zimní (jarní) generace. Lokality byly vybrány tak, aby pokryly co největší část České republiky. Slovenská lokalita (Stakčín) představuje výrazněji geograficky izolovanou populaci a byla zvolena kvůli možnosti porovnání. Pro molekulární analýzy byli z každé lokality vybráni náhodní dva jedinci, pro hodnocení jejich variability byly použity sekvenční analýzy vybraného úseku mitochondriální DNA.

Tabulka 1 Seznam odběrových lokalit vzorků mandelinky bramborové

	Lokalita	Okres	Region	Zeměpisná šířka	Zeměpisná délka
1	Bojanovice	Klatovy	Plzeňsko	49.2952192N	13.6350417E
2	Bělčice	Strakonice	Plzeňsko	49.5057981N	13.8681967E
3	České Budějovice	České Budějovice	Jižní Čechy	48.9845344N	14.4213594E
4	Čelákovice	Praha - východ	severně od Prahy	50.1601811N	14.7772483E
5	Čížov	Znojmo	Jižní Morava	48.8791622N	15.8693608E
6	Dolní Hořice - Oblajovice	Tábor	Vysočina	49.4445492N	14.8783194E
7	Havlíčková Borová	Havlíčkův Brod	Vysočina	49.6405228N	15.7941717E
8	Chlumín	Mělník	severně od Prahy	50.2872792N	14.4568278E
9	Jámy	Žďár nad Sázavou	Vysočina	49.5318772N	16.0027469E
10	Malonty	Český Krumlov	Jižní Čechy	48.6820467N	14.5689025E
11	Stakčín (Slovensko)	Snina	Slovensko	49:0046822N	22:2244244E
12	Valečov	Havlíčkův Brod	Vysočina	49.6432406N	15.4946897E
13	Žabčice	Brno - venkov	Jižní Morava	49.0018942N	16.5916219E
14	Želiv	Pelhřimov	Vysočina	49.5276297N	15.2110433E

4.2 Izolace genomické DNA

Brouci i larvy mandelinky byli usmrceni v 75% ethanolu a následně uchováni v mrazicím boxu při teplotě -20°C. Před vlastní izolací byla z dospělců skalpelem odebrána část těla tvořená hlavou a hrudí včetně končetin. Tento postup byl proveden z důvodu, že tato část těla je teoreticky minimálně kontaminovaná konzumovanou potravou. U larev L4 generace byla skalpelem odebrána přibližně jedna čtvrtina celého těla včetně hlavy i části zadečku. V tomto případě výchozí biologický materiál obsahoval i různě natrávenou potravu.

Pro izolaci DNA byl použit kit NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel), který k izolaci DNA používá kolonkovou metodu. Izolace byla provedena dle návodu výrobce a to podle protokolu určeného pro živočišné tkáně (animal tissue). Dle doporučení výrobce byla provedena degradace RNA enzymatickým způsobem. Kvantita a kvalita izolované genomické DNA byla hodnocena pomocí UV spektrofotometrické metody - NanoPhotometer (Implen). Vysokomolekularita extrahované DNA byla ověřena pomocí gelové elektroforézy - SubCell (BioRad). Pro fragmentaci byl použit 1% agarózový gel v 1× TBE pufru. Genomická DNA byla vizualizována ethidium bromidem.

4.3 Sekvence vybrané části mitochondriální DNA mandelinky bramborové

Cílem diplomové práce bylo získání sekvence mitochondriální DNA obsahující tyto geny: část genu *nad2*, kompletní geny *trnW*, *trnC*, *trnY*, *mtCOI*, *trnL*, *mtCOII*, *trnK*, *trnD* a část genu *atp8*. Pro získání výsledků byl použit metodický postup, který lze rozdělit na dvě etapy. První etapou bylo zpracování bioinformatické analýzy na základě vyhodnocení sekvencí zástupců čeledi Chrysomelidae se známým mitochondriálním genomem. Tato část experimentu vyústila v navržení degenerovaných primerů, které byly vhodné pro sekvenování a vytvoření první sekvence této oblasti mitochondriální DNA u mandelinky. Tato sekvenční data byla použita pro druhou etapu experimentu, jejímž cílem bylo navržení druhově specifických (nedegenerovaných) primerů, které poskytovaly překrývající se amplikony vhodné pro rutinní sekvenování jedinců populací mandelinky bramborové.

4.3.1 Degenerované primery pro primární sekvenaci

4.3.1.1 Navržení degenerovaných primerů a podmínky amplifikace

V databázi NCBI byli vybráni zástupci čeledi Chrysomelidae, u kterých byly publikovány sekvence námi studovaných genů. Tyto druhy včetně čísel NCBI sekvencí jsou uvedeny v tabulce 2. Pomocí programu MAFFT version 7 (Katoh & Toh 2008), byl proveden alignment těchto sekvencí za použití modulu progresivní metody G-INS-1. U adultního jedince samčího pohlaví (jedinec 16 v tabulce 9), pocházejícího z Pokusného a demonstračního pozemku ČZU v Praze. Pomocí programu BioEdit version 7.2.5 (Hall 1999) byly identifikovány oblasti těchto

genů s vysokou sekvenční homologií. Jednalo se tudíž o oblasti genů potenciálně vhodných k navržení degenerovaných primerů. Pro navržení primerů byl použit program Primer3 Input 0.4.0 Program (Rozen & Skaletsky 2000). Sekvence navržených degenerovaných primerů je uvedena v tabulce 3. Tyto primery byly navrženy tak, aby se jejich produkty vzájemně překrývaly. V tabulce 4 jsou uvedeny konkrétní dvojice degenerovaných primerů, teoreticky očekávané velikosti ampliconů a optimalizované anelační teploty. Cílem bylo získání primárních sekvenčních dat u adultního jedince č. 16. Pro amplifikaci s využitím výše uvedených degenerovaných primerů bylo použito složení PCR uvedené v tabulce 5. Teplotní a časový profil amplifikace je uveden v tabulce 6. Konkrétní anelační teplota pro daný primerový pár je uvedena v tabulce 4. Pro amplifikaci byl použit termocykler C1000TM Thermocycler (BioRad).

Tabulka 2 Přehled vybraných zástupců řádu Coleoptera použitých pro navrzení degenerovaných primerů

Druh	Označení sekvence	Autor
<i>Chrysolina haemoptera</i>	KX943388.1	Gómez-Rodríguez et al. (2015)
<i>Monolepta atrimarginata</i>	MF946621.1	Nie et al. (2018)
<i>Phaedon tumidulus</i>	KX943499.1	Gómez-Rodríguez et al. (2015)
<i>Chaetocnema hortensis</i>	KX943358.1	Gómez-Rodríguez et al. (2015)
<i>Hydrothassa glabra</i>	KX943369.1	Gómez-Rodríguez et al. (2015)
<i>Monolepta quadriguttata</i>	KY039102.1	Song et al. (2017)
<i>Monolepta quadriguttata</i>	NC_039711.1	Song et al. (2017)
<i>Apteropeda ovulum</i>	KX943422.1	Gómez-Rodríguez et al. (2015)
<i>Phratora vulgatissima</i>	KX943459.1	Gómez-Rodríguez et al. (2015)
<i>Phratora vulgatissima</i>	KX087333.1	Hunter et al. (2016a)
<i>Chrysolina herbacea</i>	KX943345.1	Gómez-Rodríguez et al. (2015)
<i>Longitarsus melanocephalus</i>	KX943469.1	Gómez-Rodríguez et al. (2015)
<i>Chaetocnema obesa</i>	KX943442.1	Gómez-Rodríguez et al. (2015)
<i>Chaetocnema hortensis</i>	KX943358.1	Gómez-Rodríguez et al. (2015)
<i>Longitarsus niger</i>	KX943504.1	Gómez-Rodríguez et al. (2015)
<i>Ophraella communa</i>	NC_039710.1	Song et al. (2017)
<i>Ophraella communa</i>	KY039100.1	Song et al. (2017)
<i>Chaetocnema tibialis</i>	KX943476.1	Gómez-Rodríguez et al. (2015)
<i>Gonioctena intermedia</i>	NC_032693.1	Dierckxsens et al. (2017)
<i>Gonioctena intermedia</i>	MF563963.1	Kastally a Mardulyn (2017)
<i>Gonioctena intermedia</i>	MF563962.1	Kastally a Mardulyn (2017)
<i>Gonioctena intermedia</i>	KX922881.1	Dierckxsens et al. (2017)
<i>Phratora vulgatissima</i>	KX943459.1	Gómez-Rodríguez et al. (2015)
<i>Phratora vulgatissima</i>	KX087333.1	Hunter et al. (2016b)
<i>Calomicrus suturalis</i>	KX943500.1	Gómez-Rodríguez et al. (2015)
<i>Longitarsus candidulus</i>	KX943430.1	Gómez-Rodríguez et al. (2015)
<i>Longitarsus aeneus</i>	KX943357.1	Gómez-Rodríguez et al. (2015)
<i>Longitarsus atricillus</i>	KX943363.1	Gómez-Rodríguez et al. (2015)
<i>Gonioctena leprieuri</i>	KX943354.1	Gómez-Rodríguez et al. (2015)
<i>Chrysolina aurichalcea</i>	AB425717.1	Kitamura et al. (2008)
<i>Chrysolina aurichalcea</i>	AB425698.1	Kitamura et al. (2008)

Tabulka 3 Přehled použitých degenerovaných primerů pro primární sekvenaci

Název primeru	Sekvence primeru
MAND-F1	CCNGAAGTWDTDGAAGGNTTAARBGA
MAND-R1	TCATTGCCAATTAAGTACCAGGA
MAND-R2	CCAATTACCAAATCCCCAATTA
MAND-F3	ATTTTGGTGTGAGCTGGAAT
MAND-R3	TCCTCCTCTGAAGGGTCAAAA
MAND-F4	CATTACCTGTTTAGCTGGGGCTAT
MAND-R4	TTCTGAGTAGCCATGTTTCAGCAG
MAND-R5	CGTAACGAAGGAATAGCAATAAAA
MAND-F6	AGGGCTCACCTTAATAGAGCAA
MAND-R6	GWGWGDDGRTCAAAGAWGAAAAWARA

Tabulka 4 Přehled použitých kombinací degenerovaných primerů

Kombinace degenerovaných primerů	Očekávaná velikost produktu amplifikace [bp]	Anelační teplota [°C]
F1-R1	998	58
F1-R2	1089	58
F1-R3	1524	58
F3-R3	618	66
F3-R4	1461	66
F3-R5	1793	65
F4-R4	929	70
F4-R5	1261	66

Tabulka 5 Složení PCR reakce amplikonů určených k sekvenační analýze

Složka	Koncentrace
Genomická DNA	10 ng . 12,5 μl^{-1}
Pufr KCl	1×
MgCl₂	2 mM
dNTP	200 μM
Primer F	0,4 μM
Primer R	0,4 μM
Tetramethyl amonium oxalát (TOP BIO)	2 mM
BSA	5 ng . 12,5 μl^{-1}
Taq polymeráza (Thermo Scientific)	0,7U . 10 ng . 12,5 μl^{-1}

Tabulka 6 Teplotní a časový profil PCR

Počáteční denaturace	95 °C	180 s	1×
Denaturace	95 °C	30 s	
Annealing	viz Tabulka 4	40 s	40×
Prodlužování	72 °C	90 s	
Závěrečné prodlužování	72 °C	420 s	1×

4.3.1.2 Čištění a sekvenování amplikonů pomocí separace v agarózovém gelu

Amplikony byly separovány v 1% agarózovém gelu v 1× TBE pufru. Separace probíhala při konstantním napětí 120 V po dobu 60 minut. Fragments DNA s požadovanou velikostí byly vyříznuty pomocí skalpelu. Ze získaných agarózových bločků byla vyizolována DNA použitím GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific). Každý amplikon byl sekvenován ve třech replikátech od F i R primerů. Pro sekvenaci byl použit kit BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo SCIENTIFIC). Produkty sekvenační reakce byly separovány kapilární elektroforézou ABI PRISM 310 (Thermo Scientific). Pro vytvoření konsenzu sekvence byl použit program BioEdit version 7.2.5 (Hall 1999). Pro editaci získaného amplikonu s cílem identifikovat konkrétní mitochondriální geny byla použita platforma MITOS WebServer ("MITOS Web Server").

4.3.2 Druhově specifické primery pro mitochondriální genom mandeliky bramborové

4.3.2.1 Navržení druhově specifických primerů

Sekvence vybrané oblasti mtDNA, která byla získána pomocí protokolu uvedeného v předchozí kapitole, byla použita pro navržení druhově specifických primerů přímo pro mandelinku bramborovou. Pro navržení primerů byl rovněž použit program Primer3 Input 0.4.0 Program (Rozen & Skaletsky 2000). Pro vyhodnocení specifičnosti primerů a pro jejich lokalizaci ve výchozí sekvenci byl použit program Primer-BLAST, který je součástí platformy NCBI (“NCBI: National Center for Biotechnology Information”). Použité sekvenační primery jsou uvedeny v tabulce 7. Složení amplifikační směsi je uvedeno v tabulce 5. Teplotní a časový profil PCR reakce je uveden v tabulce 6. Anelační teploty jednotlivých primerových dvojic jsou součástí tabulky 7.

Tabulka 7 Přehled použitých sekvenačních primerů, jejich parametrů a velikostí ampliconů

Primerový pár seqF7:seqR7 - Ta = 69°C

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TTGACTTGACAAAATTAAGCCCAATA	Plus	26	2	27	58.04	30.77	5.00	2.00
Reverse primer	TCATTGCCAATTAAGTACCAGGA	Minus	24	953	930	58.42	37.50	7.00	1.00
Product length	952								

Primerový pár seqF8:seqR8 - Ta = 64,5°C

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TTTTTACATACGAATAACTTTTCAACG	Plus	28	477	504	56.61	25.00	7.00	3.00
Reverse primer	GCCCAAGAGAAAAGGGGTATTG	Minus	23	1361	1339	59.80	47.83	3.00	0.00
Product length	885								

Primerový pár seqF9:seqR9 - Ta = 69°C

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GATCCATTGTTGAGAGAGGAGTCG	Plus	24	1145	1168	60.74	50.00	4.00	2.00
Reverse primer	AAGTTAGTCTGTGAATAATGGGAATCA	Minus	28	2014	1987	60.54	35.71	5.00	3.00
Product length	870								

Primerový pár seqF10:seqR10 - Ta = 64,5°C

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TTGTATTGTTTCACTGTTGGTGGA	Plus	26	1832	1857	59.62	34.62	3.00	1.00
Reverse primer	AAATTAACGTAACGAAGGAATAGCA	Minus	26	2662	2637	57.97	30.77	5.00	0.00
Product length	831								

Primerový pár seqF12:seqR12 - Ta = 64,5°C

	Sequence (5'→3')	Template strand	Length	Start	Stop	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GATAGGGCTTCACCTTTAATAGAGCA	Plus	26	2440	2465	60.46	42.31	5.00	2.00
Reverse primer	GTTTTTTAATTTTCAGGGTTTGTATTG	Minus	30	3355	3326	57.60	26.67	4.00	0.00
Product length	916								

4.3.2.2 Sekvenace druhově specifických PCR ampliconů

Pro purifikaci ampliconů, jejich sekvenaci i sestavení konsenzu sekvence byl použit stejný metodický postup, který je uveden v kapitole 4.3.3.1.

4.3.3 Bioinformatické zpracování sekvenčních dat zkoumané oblasti mitochondriální DNA

4.3.3.1 Fylogenetická analýza

Metodický postup uvedený v kapitole o specifických primerech byl aplikován u 2 adultních jedinců z každé z lokalit uvedených v tabulce 1. Současně byla provedena sekvenace u třech dospělých samic a třech dospělých samců z Pokusného a demonstračního pozemku ČZU v Praze. Získané sekvence byly porovnány s mezinárodní nukleotidovou databází NCBI a to konkrétně s vybranými zástupci řádu Coleoptera, u kterých byla publikována sekvence studované oblasti mtDNA. Jednalo se celkem o 68 zástupců čeledí Chrysomelidae, Bruchidae, Cerambycidae. Jako outgroupový druh byl použit *Tenebrio molitor* z čeledi Tenebrionidae. Čísla NCBI sekvencí hodnocených druhů brouků jsou součástí obrázku 11. Celkem bylo hodnoceno 69 sekvencí sledované oblasti mtDNA. Pro identifikaci haplotypů byl použit program DnaSP 6 (Rozas et al. 2017). Pro alignment sekvencí byl použit program MAFFT version 7 software (Katoh & Toh 2008). Konkrétně se jednalo o progresivní metodu G-INS-1. Získané haplotypy byly použity pro konstrukci fylogenetického stromu pomocí metody ML (Maximum Likelihood). Fylogenetická analýza byla provedena pomocí programu MEGA X (Kumar et al. 2018). Jako nejlepší byl vybrán model GTR+G+I (Nei & Kumar 2000) s nejnižší hodnotou parametru BIC (Bayesian Information Criterion). Pro tvorbu fylogenetického stromu byl použit rovněž program MEGA X. Byl sestaven konsenzus strom na základě 500 replikátů (parametr „bootstrap“).

4.3.3.2 Porovnání sekvenční variability studovaných genů s databází NCBI

Získaná sekvence studované skupiny mitochondriálních genů mandelinky bramborové byla porovnána s databází NCBI a to konkrétně s publikovanými sekvenčními daty *Leptinotarsa decemlineata* (Grapputo et al. 2005; Crossley et al. 2018; Crossley et al. 2019). Pro porovnání haplotypů byly použity takové sekvence, které byly spolehlivě a jednoznačně osekvenovány, a které byly v databázi NCBI charakterizovány pouze nukleotidy ATCG. Jinými slovy, sekvenční záznamy s nejednoznačně detekovanými nukleotidy (N, R) byly z hodnocení vyloučeny. Na základě alignmentu bylo zjištěno, že část námi zjištěné sekvence o délce 544 bp lze srovnat s 93 sekvencemi publikovaných haplotypů mandelinky bramborové. Pro vyhodnocení variability haplotypů byl použit program DnaSP 6 (Rozas et al. 2017), který byl použit pro stanovení celkového počtu haplotypů a haplotypové diverzity (Hd).

4.4 Navržení markerovacího systému pro identifikaci pohlaví u mandelinky bramborové

4.4.1 Bioinformatická analýza molekulárních dat předcházející návržení markerovacích systémů

Pro návržení markerovacího systému bylo založeno na hypotéze, že geny lokalizované na gonozomu X u samic vykazují podvojně založení. To znamená, že tyto geny mají dvě alely. Naopak u samců jsou tyto geny založeny hemizygotně a mají alelu pouze jednu. Pro návržení markerovacího systému bylo tudíž nezbytné vybrat gen, který je lokalizován právě na gonozomu X. Takovýmto genem je gen *LdVssc1*.

Polymorfismy tohoto genu jsou sledovány v souvislosti s rezistencí mandelinky bramborové k pyrethroidům a to konkrétně k účinné látce imidoclopridu. Tento gen byl řadou autorů lokalizován právě na gonozomu X (Hawthorne 2000; Clark et al. 2001; Kim et al. 2005;). Clark et al. (2001) jako první publikoval primerový pár *LdVssc1F* (CGAGTACTCTGTGGAGAATGG) a *LdVssc1R* (CCGACACTAGTGATCACCTTT), který amplifikuje část výše uvedeného genu. V mezinárodní nukleotidové databázi NCBI byla identifikovaná sekvence, která je výše uvedenou dvojicí primerů ohraničena. Jedná se o sekvenci HQ589184.1 (Rinkevich et al. 2012). Na základě této sekvence bylo zjištěno, že výše uvedená dvojice primerů amplifikuje produkt o velikosti 349 bp.

Tato sekvence byla použita pro vyhledání v celogenomických datech mandelinky bramborové. U mandelinky bramborové byl publikován a v NCBI databázi uveden assembling genomu *Ldec_2.0* – WGS Projekt AYNB02. Tento referenční genom sestavili Murali et al. (2017). Jedná se o sekvenci samičky mandelinky bramborové rezistentní k imidoclopridu. V této sekvenci jsou identifikovány a predikovány jednotlivé geny. Jednotlivé „scaffold“ sekvence ale nejsou lokalizovány na jednotlivých chromozomech mandelinky bramborové. Proto bylo provedeno vyhledání sekvence amplikonu ohraničeného primery *LdVssc1F* a *LdVssc1R* (Rinkevich et al. 2012) v celogenomické sekvenci *Ldec_2.0*. Tento amplikon byl lokalizován ve „scaffold“ sekvenci NW_019291534.1 a to v pozici nukleotidů 21343 – 21691 (Obrázek 5). V rámci „scaffold“ sekvence NW_019291534.1 bylo zjištěno, že gen *LdVssc1* je lokalizován v pozici nukleotidů 7950 - 68019. U tohoto genu existuje několik transkripčních variant. Pomocí programu Primer3 Input 0.4.0 Program (Rozen & Skaletsky 2000) byly navrženy dva primerové páry. První dvojicí byly *Ld_Vssc_F1* (TTTCCAGGGACTTGCAAATAGGT) a *Ld_Vssc_R1* (ATGAAGATAAAGACCACCGCAAT) amplifikující intronovou sekvenci genu *LdVssc1* o velikosti 243 bp. Tento amplikon je v diplomové práci označen písmenem A. Druhou dvojicí byly primery *Ld_Vssc_F5* (GAGGGTGGTAAGAGTGGCAAAAGT) a *Ld_Vssc_R5* (AGAATCATGGATTGTCCGAAGGTT), která amplifikovala 243 bp velký fragment exonové části genu *LdVssc1*. Tento amplikon je v diplomové práci označen písmenem E.

V celogenomické sekvenci mandelinky bramborové byl identifikována „scaffold“ sekvence NW_019294185.1, která obsahuje gen *Rhod* kódující rhodopsin, který je u brouků lokalizován na autozomálním páru. Gen *Rhod* se v dané „scaffold“ sekvenci nachází v pozici

nukleotidů 801–11242. Byla navržena dvojice primerů Ld_Rhod_F2 (GAGAAATCCATGCGGGATCAG) a Ld_Rhod_R2 (GTTGTAAACGGCGTTAGCCTTTG), která amplifikuje produkt o velikosti 243 bp v exonové části genu *Rhod*.

Vzhledem k tomu, že výše uvedené primerové páry byly navrženy s cílem relativní kvantifikace templátové DNA, bylo při navrhování primerů nezbytné dodržet následující zásady:

- Délka primerů musí být dostatečně dlouhá (přibližně 24 bp) z důvodu zajištění vysoké specifčnosti jejich nasedání.
- Hodnota Tm u všech primerů lokalizovaných v gonozomálním i autozomálním genu musí být přibližně stejná (přibližně 64 °C) z důvodu současné amplifikace při relativní kvantifikaci templátové DNA.
- Pro relativní kvantifikaci templátové DNA je optimální, aby velikosti amplikonů gonozomálního i autozomálního genu byly přibližně stejné. V případech navržených dvojic primerů byla ve všech případech velikost amplikonů zcela identická (243 bp).

Leptinotarsa decemlineata strain lmidoclopid resistant unplaced genomic scaffold, Ldec_2.0 scaffold2248

Sequence ID: [NW_019291534.1](#) Length: 74435 Number of Matches: 1

Range 1: 21343 to 21691 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
640 bits(346)	0.0	348/349(99%)	0/349(0%)	Plus/Minus
Query 1	CGAGTACTCTGTGGAGAAATGGATTGAATCAATGTGGGACTGTATGTTGGTTGGAGATGTA	60		
Sbjct 21691	CGAGTACTCTGTGGAGAAATGGATTGAATCAATGTGGGACTGTATGTTGGTTGGAGATGTA	21632		
Query 61	TCCTGTATCCCATTTTTCTAGCCACAGTTGTTATTGGCAATCTGTTGTGAGTATATTA	120		
Sbjct 21631	TCCTGTATCCCATTTTTCTAGCCACAGTTGTTATTGGCAATTTGTTGTGAGTATATTA	21572		
Query 121	CCACTttttatcaaagaaaatatacttATCTTGCCATAAACGCATCCGATGTCATCATGTT	180		
Sbjct 21571	CCACTTTTATCAAAGAAAATATACTTATCTTGCCATAAACGCATCCGATGTCATCATGTT	21512		
Query 181	CATTTGTGATTAAGAAAgcattttataatataacagTTATTTTAAAATGCTACCATT	240		
Sbjct 21511	CATTTGTGATTAAGAAAAGCATTTTATAATATATACAGTTATTTTAAAATGCTACCATT	21452		
Query 241	CTATCAATGTTGTCTCGAGTTGGCCTAATATGACTATATATTATTAATGGAAAATGACC	300		
Sbjct 21451	CTATCAATGTTGTCTCGAGTTGGCCTAATATGACTATATATTATTAATGGAAAATGACC	21392		
Query 301	ATGTTCAAGTCactaaattattttcagaaagggTGATCACTAGTGTCCG	349		
Sbjct 21391	ATGTTCAAGTCATAAATTTTTCAGAAAGGGTGATCACTAGTGTCCG	21343		

Obrázek 5 Identifikace publikované částečné sekvence genu *LdVssc1* v sekvenci NW_019291534.1

4.4.2 Identifikace pohlaví na základě relativní kvantifikace DNA pomocí Ratio ΔCt

Relativní kvantifikace templátové DNA, od které je odvozena identifikace pohlaví, byla provedena pomocí metody hodnotící Ratio ΔCt (Rao et al. 2013).

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gonozomální gen}} - Ct_{\text{autozomální gen}}$$
$$\text{Ratio } \Delta Ct = 2^{-\Delta Ct}$$

V optimálním případě, kdy eficiency amplifikací autozomálního i gonozomálního genu jsou u obou pohlaví rovny dvěma, potom hodnoty Ratio ΔCt budou u samic rovny 1,00 a u samců 0,50. Jelikož při navrhování primerů není možné odhadnout a zaručit shodné eficiency amplifikací, je mnohem vyšší pravděpodobnost, že eficiency amplifikací autozomálních a gonozomálních genů budou odlišné a tudíž hodnoty Ratio ΔCt nebudou výše uvedených optimálních hodnot. Pokud bude navržený markerovací systém fungovat správně, bude i v tomto případě hodnota Ratio ΔCt u samce na přibližně 50% úrovni Ratio ΔCt samičky.

4.4.3 Podmínky amplifikace navržených markerovacích systémů

Během řešené diplomové práce byly navrženy dva markerovací systémy, které byly založeny na porovnání kvantity gonozomálního amplikonu A (primery Ld_Vssc_F1 a Ld_Vssc_R1) s autozomálním amplikonem L (primery Ld_Rhod_F2 a Ld_Rhod_R2). Druhý markerovací systém porovnával kvantifikaci gonozomálního amplikonu E (Ld_Vssc_F5 a Ld_Vssc_R5) rovněž s autozomálním amplikonem L. Primery použité pro získání těchto amplikonů byly popsány v předcházející části metodiky.

Veškeré analýzy byly provedeny pomocí přístrojového vybavení i kitů firmy Roche. Amplifikační reakce měla objem 10 μl . Množství templátové genomické DNA bylo 20 ng, koncentrace F i R primerů byla rovna 0,5 μM . Pro amplifikaci byl použit 1 \times FastStart Essential DNA Green Master (Roche). Pro amplifikaci byl použit profil uvedený na obrázku 6.

LightCycler® Nano Instrument Protocol

The following procedure is optimized for use with the LightCycler® Nano Instrument.

Run Editor					
Detection Format	Reaction Volume [μl]				
Settings: Intercalating Dye, Normal Quality	20				
Programs					
	Temp. [$^{\circ}\text{C}$]	Ramp [$^{\circ}\text{C}/\text{s}$]	Hold [s]	Acquire	Cycles
Pre-Incubation	95	4	600 ⁽²⁾	-	-
3-Step	95	5	20 ⁽¹⁾⁽³⁾	-	-
Amplification	60	4	20 ⁽¹⁾⁽³⁾	-	-
	primer dependent ⁽⁴⁾				
	72	4	20 ⁽¹⁾⁽³⁾⁽⁵⁾	Yes	45
Melting	95	4	10	-	-
	65	4	60	-	-
	95	0.1	1	Yes	-

Obrázek 6 Teplotní profil amplifikační reakce navržených markerových systémů (Zdroj: Manuál pro použití 1 \times FastStart Essential DNA Green Master - Roche)

Teplota annealingu byla rovna 64 °C. Amplifikace probíhala v termocykleru LightCycler® Nano (Roche). Každý analyzovaný jedinec byl hodnocen v podobě tří technických replikátů, přičemž hodnoty Ct autozomálních i gonozomálních genů použité pro výpočet Ratio Δ Ct odpovídaly aritmetickým průměrům těchto tří technických replikátů.

Specifičnost ampliconů byla hodnocena na základě elektroforetické separace v 2% agarózovém gelu v 1×TBE pufru. Současně byla provedena Tm analýza ampliconů pomocí softwaru řídicího termocykler (Roche).

4.4.4 Statistické vyhodnocení schopnosti markerů diskriminovat jedince samičího a samčího pohlaví

Výše uvedený molekulárně genetický postup byl aplikován na soubor referenčních adultních jedinců se známým pohlavím. Jednalo se o soubor patnácti samic a patnácti samců. Současně bylo hodnoceno padesát náhodně odebraných larev L4. Adultní jedinci i larvy pocházeli ze sběru uskutečněného v srpnu 2019 na Pokusném a demonstračním pozemku ČZU v Praze Z výše uvedeného popisu experimentu je patrné, že bylo získáno celkem 65 hodnot Ratio Δ Ct pro marker typu A×L a rovněž 65 hodnot pro marker typu E×L. Schopnost markerů rozlišit pohlaví byla hodnocena pomocí vícerozměrné analýzy – diskriminační analýzy. Jako groupovací proměnná byla použita charakteristika jedince z pohledu jeho pohlaví. Jako nezávisle proměnné byly použity hodnoty Ratio Δ Ct markerovacích systémů A×L a E×L. Pro hodnocení byly použity dvě diskriminační analýzy. V první diskriminační analýze se k vzorkům L4 larev přistupovalo jako k anonymní skupině bez predikce pohlaví a analýza vyhodnocovala pouze hodnoty jejich Ratio Δ Ct. Ve druhé diskriminační analýze byly hodnoty Ratio Δ Ct použity pro predikci pohlaví a každá larva vstupovala do analýzy s již predikovaným pohlavím. U obou vstupních diskriminačních analýz navazovalo následné vyhodnocení pomocí kanonické analýzy. Kanonická skóre byla hodnocena formou bodového grafu.

Systém určení pohlaví u mandelinky je teoretickou zárukou, že poměr pohlaví v potomstvech by teoreticky měl být roven 1:1. Podíl mezi predikovanými samičkami a samečkami byl porovnán pomocí neparametrického χ^2 testu s teoreticky očekávaným poměrem 1:1. Všechny statistické analýzy byly provedeny pomocí programu Dell Statistica version 13.

5 Výsledky

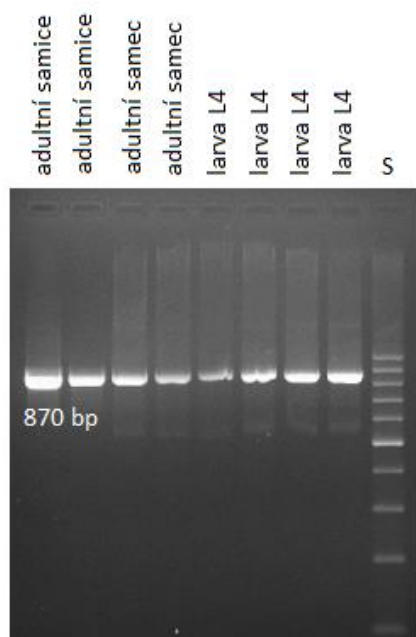
5.1 Kvantita a kvalita izolované DNA

Použitý kit NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel), byl schopný izolovat genomickou DNA z adultních jedinců i larev. Cílem diplomové práce nebylo statistické hodnocení rozdílů mezi výtěžnostmi DNA z adultních jedinců a larev. Ze stanovených hodnot výtěžností vizuálně nevyplývaly výrazné diference mezi adultními jedinci a larvami. Průměrná výtěžnost DNA bez ohledu na vývojové stádium byla 460 ng DNA z jedné izolace ($V_k = 5,5 \%$). Parametr A260/A280 dosahoval průměrné hodnoty 1,98 ($V_k = 6,1 \%$). Parametr A260/A230 měl průměrnou hodnotu 2,05 ($V_k = 6,7 \%$). Elektroforetickou separací v 1% agarózovém gelu byla potvrzena vysokomolekularita u všech analyzovaných vzorků.

5.2 Sekvence vybrané oblasti mitochondriální DNA mandelinky bramborové

5.2.1 Velikost ampliconů primární sekvenace a ampliconů druhově specifické sekvenace

Amplicony získané za použití degenerovaných i druhově specifických primerů byly elektroforeticky separovány. U všech dvojic primerů, které jsou blíže popsány v tabulce 4, bylo na základě porovnání s velikostním standardem potvrzeno, že velikost ampliconů je v plné shodě s očekávanou velikostí. Obrázek 7 demonstruje velikost ampliconů druhově specifických primerů seq:F9 – seq:R9.



S - Thermo Scientific™ GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder

Obrázek 7 Elektroforeogram ampliconů specifických primerů seq:F9 - seq:R9

Na tomto obrázku je rovněž demonstrováno, že velikost ampliconů není ovlivněna pohlavím adultního jedince ani amplifikací DNA izolované z L4 larev, která může být teoreticky kontaminovaná pozřenou potravou.

5.2.2 Finální sekvence studované oblasti mitochondriální DNA

Na obrázku 8 je uvedena finální sekvence studované oblasti mitochondriální DNA. Tato sekvence byla získána u třech adultních samic a třech adultních samců z Pokusného a demonstračního pozemku ČZU v Praze.

>Leptinotarsa decemlineata_haplotyp_1_ČZU_v_Praze

```
5'ACTTGACAAAATTAAGCCCAATAGTTATTTAATGTATAGGCTTAATACAATTAATTTTTGGTTTTATCATTATCTCTTCAGCAATGGT
TAGAGGAATTCAGGTTTAAACCAAATTAGATTGCGAAAAATTTAGCTTATCTCCATTAACCACATAGCTTGAATATTAGCTAGAATTC
TGATATAAAAAATAATTTGATTTTGATATTTCTGTATTTATTTCTTAATTTTAGTAAATATTATTGTCATATTAGAAAATTTCCAAATTTTTA
CCTAAAACAATTTAATTTCTATAAATCAAATAAATTAATAAAATTTTTATTCTAAATTTTTAATTTAGGTGGTTGCCCCCTTT
TTAGGGTTTCTCCCTAAATGGTTAATTTCAAATAATTTGATTGAAAATAATTTTTTTTTGTAATTTTATCTTAATTATCTTTACATTAATTC
CGCTTTTTTTTTACATACGAATAACTTTTTCAACGTTGACATTTTTTCAGAATGAATTTATTTCTCTATTCCAACATACATTGAAAATTTGAAT
TATTTTATAAATAGATTTACTTTAGCTGGACTATTAGTTTGTACTAGAAATCTTAGAATTTTCTAAGGATTTAAGTTAGCTTAAACTTTCAA
CCTTCAAAGTTGACAACAGATTTTTTACTAAGCCTTAAAAATTTTTACCTTTAAATTTGCAATTTAAAAATCATTATTGACTATAAGACTGG
AAGAAAATTTAATTTTCGTAATAAATTTACAATTTATTGCCTATTCTCAGCCATTCCACCGAACAAATGATTATTTCTACTAATCATAAAGA
CATTGGAACTTTATTTTTATTTTGGTGTGGAGCTGGAATATTAGTACTTCTTAAAGAATCTAATTCGGGCAGAAATTAGGGAATCCTG
GTACTTTAATTTGGCAATGATCAAATTTATAATGTTATTGTTACCGCTCATGCTTTTGAATAATTTTTTTATAGTTATGCCAATTATAATTG
GGGGATTTGGTAATTGGTTAGTCCCTTAAATATTAGGGGCTCCTGATATGGCCTTCCCTCGAATAAACAATATAAGATTCTGACTTCTACC
CCCTCTCTTTTATTCTTAATTATAAGATCCATTGTTGAGAGAGGAGTCGGAACAGGATGAACAGTTTACCCTCTCTATCATCTAATATTG
CACATAGAGGATCTTCTGTAGATTTAGCTATTTTTAGTTTACATTTAGCAGGAGTTTCTCTATTTTAGGAGCTATTAATTTTACTACTG
TTATGAATATACATCCTGTAAGAATAAAATTAGATCAAATACCCCTTTTCTCTGGGCAGTCATAATTACTGCTATTCTCCTCCTTTTATCAT
TACCTGTTTTAGCTGGGGCTATTACTACTTTTAACTGACCGTAATCTTAATACTTCTTTTTTGACCCTTCAAGAGGAGGAGACCCTATT
CTATACCAACATTTATTTTGGTTCACCCGAAGTATATATTCTTACTACCTGGATTTGGAATAATTTCCCATATTATTAGTCAA
GAAAGAAGAAAAAAGAAAGCTTTTGGAACTTAGGAATAATTTATGCTATAATAGCAATTTGGACTTTTAGGTTTCAATTTTGGAGCTCAT
CACATATTTACTATTGGAATAGACGTAGATACACGAGCTTATTTACTTCTGCAACAATAATTATTGCTGTGCCTACTGGAATTAAGTTTT
CAGATGACTAGCCACTTTCCATGGCACTCAAATTTCAAATAACCCAGCTACTCTATGATCCTTAGGATTTGTATTTCTTTTCACTGTTGGTG
GACTAACAGGTGTAATTTAGCCAATTCCTCAATTGATATCATCCTTCATGATACTTATTATGTTGTTGCCATTTTCACTACGTATTGCTA
TGGGGGCTGTATTTGCAATTTAGCAGGACTAGTACATTGATCCATTATTCACAGGACTAACTTTAAATAATAAATATTTAAAAATTC
GTTTTTACTATATTTATTGGTGTAAATTTAACATTTTTCCGCAACACTTCTTAGGCCTAAGAGGTATACCTCGTCGTTATTGGATTACC
CGATAGATTTACTCTATGAAATATTATTTTCTATTGGATCTTAAATTTCTTAGTAAGAGTAATTTCTTTTTATTTATCCTGTGAGAATC
ATTACCCCTTCAACGAAAAATTTAGGGGCTTTAACTTAAATTCATCTATTGAATGGCTTCAAATTTCCCCCTGCTGAACATGGTTACT
CAGAATTACCTTATTTAACTTCTAAGTTCTAATATGGCAGATTAGTGCCTGGATTTAAACCCCATTTATAAAGTTTAACTTTTTTTAGAA
ATGATGACTTGAAAACTATAACTTCAAGATAGGGCTTACCTTAAATAGAGCAATTGACTTATTTTATGACCATACATTAATAATTTT
AATTATTACAGTATTAGTAGGTCAATTGATACTTAGATTATTTTAAATAAATTTCCCATCGATTTACTTGAAGGACAGACTATTG
AAATTTTGAACATTTTACCCACAATCTTAAATTTTTATTGCTATTCCTGTTACGTTTAAATTTATTTTTAGATGAAATTAATAATCC
TAGGATTAATAAACAATTGGACATCAATGATATTGATCTTATGAATACTCTGATTTTAAAAATATTGAATTTGACTCTTATATATTAC
CTACTAGAGAGCTAAATAAATCAATTTTTCGCTTTTATAGATGTTGATAATCGGGTGGTAGTACCTTTTAACTCCCAAGTCCGTATGCTGGT
AACTGCAGCTGATGTTATTCTTCTGAACAATTCCTCATTAGGTGTAAAAATTTGATGCAACACCTGGGCGTCTAAATCAAATTAGATTT
TTACTTAAATCGTTCTGGGTATTTTTTGGTCAATGTTCTGAAATTTGTTGGTGAATCACAGATTTTATACCTATTGTTATAGAAAGAATCTCT
CCATCTTATTTTTTAAATGAGTTTTTAAATAACTAAAGAATCATTAGATGGCCGATAATAAGCAATGGAATTTTAAACATTTTATAGTA
TATTTTACTTCTAATGAAAAATTTAGTAAAAAATAACATTAACCTGTCAAGTTAAATTTATTATAATTATTAATTTTAAATCCCTCAAATA
ATACCTTAAATGATTGACTTTATTTTTTCTTATTTTTTATTCTTTTTATTTAATGTCCTAAATTTATTTTATTTTACAATACTAAA
CCCTGAAAAATTAACAAAAAATAAATTAATCTTGAATGATAATAAATCTATTTTTCATC 3'
```

Obrázek 8 Finální sekvence studované oblasti mitochondriální DNA

Naprosto identická sekvence byla získána rovněž u celkového počtu 28 adultních jedinců pocházejících z různých lokalit České a Slovenské republiky (Tabulka 1). Vzhledem k tomu, že všechny sekvenované vzorky vykazovaly 100% identitu, je námi získaný jediný haplotyp označován jako ČZU v Praze – haplotyp 1.

5.2.3 Anotace genů lokalizovaných na studované části mitochondriální DNA

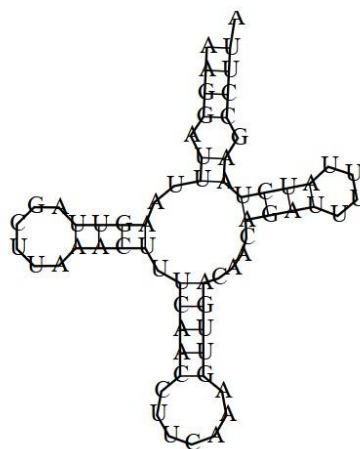
Získaná finální sekvence o celkové délce 3395 bp byla analyzována programem MITOS WebServer (“MITOS Web Server”). Tento program identifikoval, že v sekvenci se nachází část genu *nad2*, kompletní geny *trnW*, *trnC*, *trnY*, *mtCOI*, *trnL*, *mtCOII*, *trnK*, *trnD* a částečná sekvence genu *atp8*. Konkrétní pozice výše uvedených genů včetně vlákn, ze kterých jsou tyto geny transkribované, jsou uvedeny obrázku 9. Program MITOS WebServer byl rovněž použit pro ověření prostorových konformací molekul tRNA, u kterých byla předpokládána struktura jetelového listu. Ve všech případech byla tato struktura potvrzena a na obrázku 10 je prezentovaná vzorová struktura *trnW*.

Name	Start	Stop	Strand	Length	Structure
<i>nad2</i>	7	555	+	549	
<i>trnW</i> (tga)	629	693	+	65	svg ps
<i>trnC</i> (tgc)	686	747	-	62	svg ps
<i>trnY</i> (tac)	748	809	-	62	svg ps
<i>cox1</i>	802	2328	+	1527	
<i>trnL2</i> (tta)	2345	2409	+	65	svg ps
<i>cox2</i>	2431	3087	+	657	
<i>trnK</i> (aaa)	3098	3163	+	66	svg ps
<i>trnD</i> (gac)	3163	3227	+	65	svg ps
<i>atp8</i>	3228	3380	+	153	

■ tRNA gene ■ rRNA gene ■ protein coding gene



Obrázek 9 Konkrétní pozice genů na studované části mitochondriální DNA



Obrázek 10 Predikovaná struktura molekuly tRNA kódované genem *trnW*

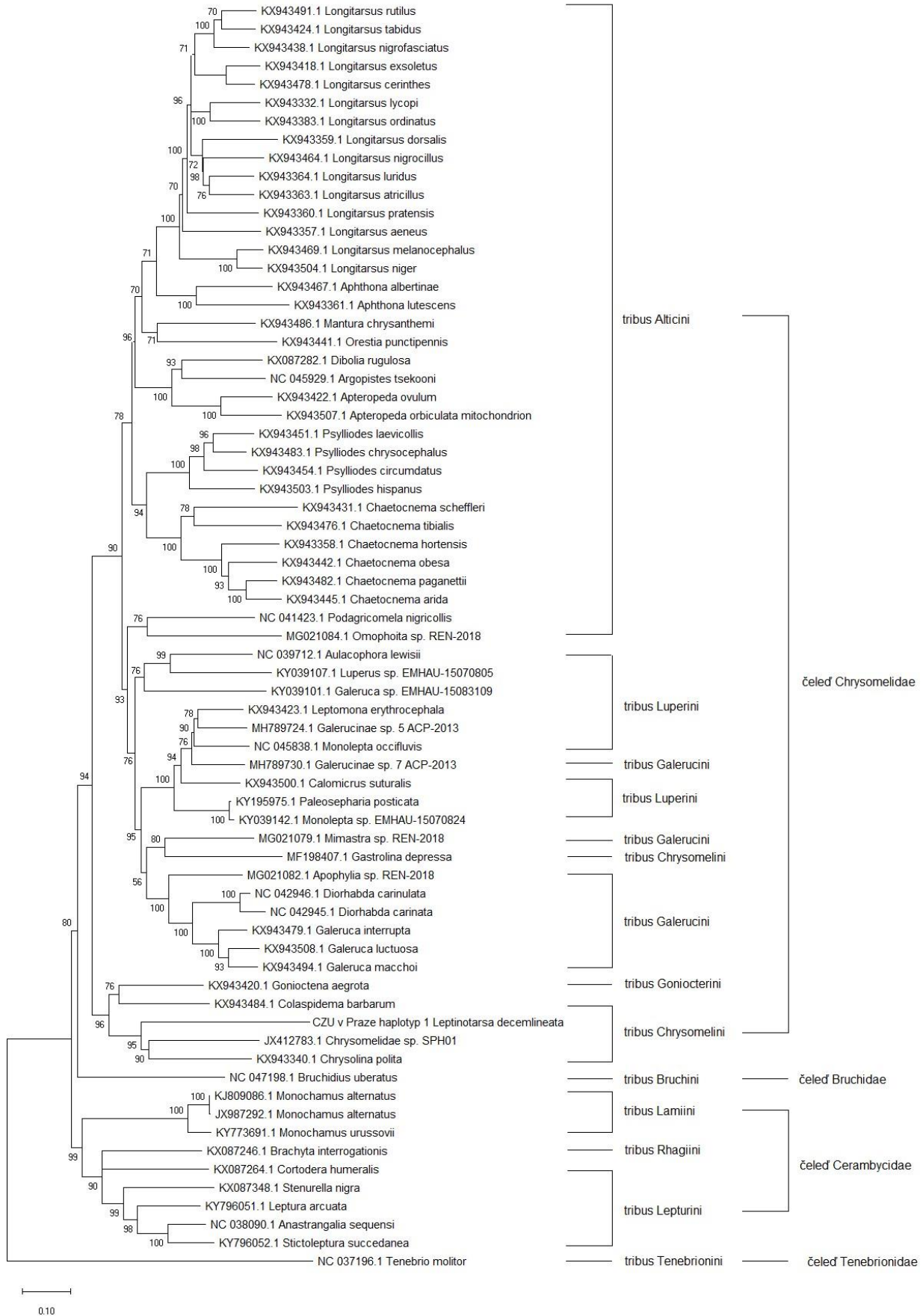
5.2.4 Fylogenetická analýza

V tabulce 8 jsou uvedeny testované modely pro ML analýzu. Z této tabulky je patrné, že nejnižší BIC skóre bylo stanoveno u modelu GTR+G+I. Tento model byl aplikován při tvorbě fylogenetického stromu. Sekvence odpovídající gapům (mezerám) byly u alignmentovaných sekvencí odstraněny s cílem získat skutečné reprodukovatelné výsledky. Vlastní analýza vedoucí k tvorbě stromu byla provedena v 500 replikátech. Výsledný fylogenetický strom je zobrazen na obrázku 11. Hodnoty „bootstrapů“ jsou uvedeny u všech nodů, které byly u stromu vytvořeny. Z obrázku 11 je patrné, že nejnižší hodnota „bootstrapu“ byla 70. Tato hodnota je obecně považována za limitní pro spolehlivé odlišení dvou větví. Vzhledem k tomu, že u žádného z nodů nebyla zjištěna hodnota „bootstrapu“ nižší než 70, nebylo nutné provádět slučování nejednoznačně odlišitelných větví stromu. Hodnocený soubor druhů uvedený ve fylogenetickém stromu představoval zástupce čtyř čeledí: Chrysomelidae, Cerambycidae, Bruchidae a Tenebrionidae.

Bližší taxonomické členění bylo provedeno na základě tribů, které představují detailnější taxonomickou jednotku než podčeleď. Zařazení jednotlivých druhů do příslušných tribů je rovněž graficky znázorněno na obrázku 11.

Tabulka 8 Přehled testovaných modelů pro Maximum Likelihood (ML) analýzu

Model	Parameters	BIC	AICc	lnL	(+I)	(+G)	R	f(A)	f(T)	f(C)	f(G)	r(AT)	r(AC)	r(AG)	r(TA)	r(TC)	r(TG)	r(CA)	r(CT)	r(CG)	r(GA)	r(GT)	r(GC)
GTR+G+I	145	158216.639	156717.697	-78213.756	0.35	0.63	1.91	0.345	0.401	0.138	0.116	0.088	0.015	0.033	0.076	0.156	0.003	0.038	0.452	0.014	0.099	0.009	0.017
GTR+G	144	158772.489	157283.884	-78497.850	n/a	0.30	2.16	0.345	0.401	0.138	0.116	0.080	0.015	0.029	0.068	0.165	0.002	0.038	0.478	0.013	0.088	0.008	0.016
TN93+G+I	142	159704.964	158237.031	-78976.427	0.36	0.69	1.23	0.345	0.401	0.138	0.116	0.079	0.027	0.038	0.068	0.117	0.023	0.068	0.340	0.023	0.113	0.079	0.027
TN93+G	141	160620.790	159163.193	-79440.509	n/a	0.33	1.12	0.345	0.401	0.138	0.116	0.083	0.029	0.038	0.071	0.111	0.024	0.071	0.322	0.024	0.114	0.083	0.029
HKY+G+I	141	160755.573	159297.976	-79507.900	0.37	0.73	1.18	0.345	0.401	0.138	0.116	0.079	0.027	0.070	0.068	0.084	0.023	0.068	0.243	0.023	0.209	0.079	0.027
T92+G+I	139	161479.484	160042.560	-79882.195	0.37	0.72	1.16	0.373	0.373	0.127	0.127	0.074	0.025	0.077	0.074	0.077	0.025	0.074	0.226	0.025	0.226	0.074	0.025
HKY+G	140	161674.653	160227.393	-79973.610	n/a	0.34	1.08	0.345	0.401	0.138	0.116	0.083	0.029	0.068	0.072	0.081	0.024	0.072	0.235	0.024	0.201	0.083	0.029
T92+G	138	162421.599	160995.012	-80359.422	n/a	0.34	1.07	0.373	0.373	0.127	0.127	0.077	0.026	0.074	0.077	0.074	0.026	0.077	0.218	0.026	0.218	0.077	0.026
GTR+I	144	168959.698	167471.093	-83591.455	0.41	n/a	1.20	0.345	0.401	0.138	0.116	0.124	0.021	0.045	0.106	0.121	0.004	0.053	0.351	0.013	0.134	0.013	0.015
TN93+I	141	171095.921	169638.324	-84678.074	0.41	n/a	0.96	0.345	0.401	0.138	0.116	0.091	0.031	0.040	0.078	0.100	0.026	0.078	0.289	0.026	0.120	0.091	0.031
K2+G+I	138	171457.850	170031.263	-84877.547	0.37	0.89	1.53	0.250	0.250	0.250	0.250	0.049	0.049	0.151	0.049	0.151	0.049	0.049	0.151	0.049	0.151	0.049	0.049
JC+G+I	137	171548.659	170132.408	-84929.121	0.37	0.97	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
K2+G	137	171770.607	170354.355	-85040.095	n/a	0.36	1.41	0.250	0.250	0.250	0.250	0.052	0.052	0.146	0.052	0.146	0.052	0.052	0.146	0.052	0.146	0.052	0.052
JC+G	136	172123.984	170718.069	-85222.953	n/a	0.36	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
HKY+I	140	172199.250	170751.990	-85235.908	0.41	n/a	0.93	0.345	0.401	0.138	0.116	0.091	0.031	0.064	0.078	0.076	0.026	0.078	0.220	0.026	0.189	0.091	0.031
T92+I	138	172994.227	171567.640	-85645.736	0.41	n/a	0.92	0.373	0.373	0.127	0.127	0.084	0.029	0.070	0.084	0.070	0.029	0.084	0.205	0.029	0.205	0.084	0.029
K2+I	137	179979.997	178563.746	-89144.790	0.41	n/a	1.22	0.250	0.250	0.250	0.250	0.056	0.056	0.137	0.056	0.137	0.056	0.056	0.137	0.056	0.137	0.056	0.056
JC+I	136	180399.211	178993.296	-89360.567	0.41	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083
GTR	143	188907.051	187428.781	-93571.300	n/a	n/a	0.83	0.345	0.401	0.138	0.116	0.153	0.023	0.043	0.131	0.099	0.004	0.058	0.288	0.027	0.127	0.014	0.033
TN93	140	192022.475	190575.215	-95147.521	n/a	n/a	0.91	0.345	0.401	0.138	0.116	0.093	0.032	0.040	0.080	0.097	0.027	0.080	0.280	0.027	0.119	0.093	0.032
HKY	139	193026.555	191589.631	-95655.730	n/a	n/a	0.87	0.345	0.401	0.138	0.116	0.094	0.032	0.061	0.081	0.073	0.027	0.081	0.213	0.027	0.183	0.094	0.032
T92	137	193850.331	192434.080	-96079.957	n/a	n/a	0.87	0.373	0.373	0.127	0.127	0.087	0.030	0.068	0.087	0.068	0.030	0.087	0.199	0.030	0.199	0.087	0.030
K2	136	197919.589	196513.674	-98120.756	n/a	n/a	1.18	0.250	0.250	0.250	0.250	0.057	0.057	0.135	0.057	0.135	0.057	0.057	0.135	0.057	0.135	0.057	0.057
JC	135	198333.433	196937.855	-98333.847	n/a	n/a	0.50	0.250	0.250	0.250	0.250	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083	0.083



Obrázek 11 Fylogenetický strom vytvořený na základě GTR+G+I modelu

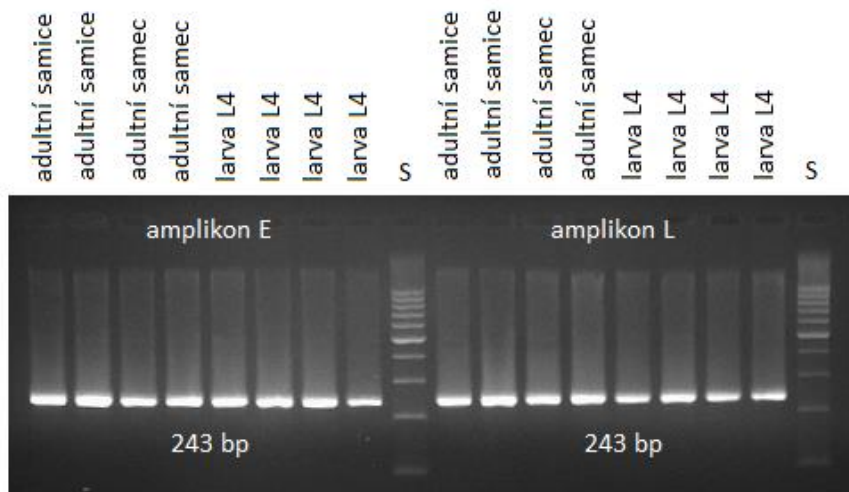
5.2.5 Haplotypová analýza

V předchozí části kapitoly výsledky již bylo zmíněno, že z hlediska sekvenované části mtDNA 3395 bp byla u všech hodnocených zástupců zjištěna zcela identická sekvence, která byla označena jako haplotyp 1. Doposud publikované informace o mitochondriálním genomu mandelinky bramborové vycházejí z 544 bp regionu, na základě kterého jsou definované jednotlivé haplotypy. Vzhledem k tomu, že při řešení diplomové práce byla získána výrazně delší osekvenovaná část mtDNA, bylo nutné pro haplotypovou analýzu použít pouze již publikovanou oblast o velikosti 544 bp. Pomocí alingmentu v nukleotidové databázi NCBI bylo zjištěno, že tento 544 bp dlouhý fragment mtDNA vykazoval sekvenční homologii s 93 odlišnými sekvencemi – haplotypy. Pomocí programu DnaSP 6 (Rozas et al. 2017), bylo odhaleno, že námi detekovaný haplotyp vykazoval 100% sekvenční identitu s haplotypy uvedenými pod čísly AJ884950.1 (Grapputo et al. 2005), MK605457.1 (Crossley et al. 2019), MK605452.1 (Crossley et al. 2019) a KY607432.1 (Crossley et al. 2018). Původ genotypů, se kterými získaný sekvenovaný amplikon vykazoval 100% homologii, budou diskutovány v kapitole Diskuze. Hodnota haplotypové diverzity (H_d) byla pro kolekci hodnocených dat rovna 0,9924. V příloze I diplomové práce jsou uvedeny všechny haplotypy, které byly analyzovány v mnou provedené *in silico* studii.

5.3 Vývoj molekulárních markerů pro identifikaci pohlaví mandelinky bramborové

5.3.1 Průběh amplifikace a specifita navržených primerových dvojic

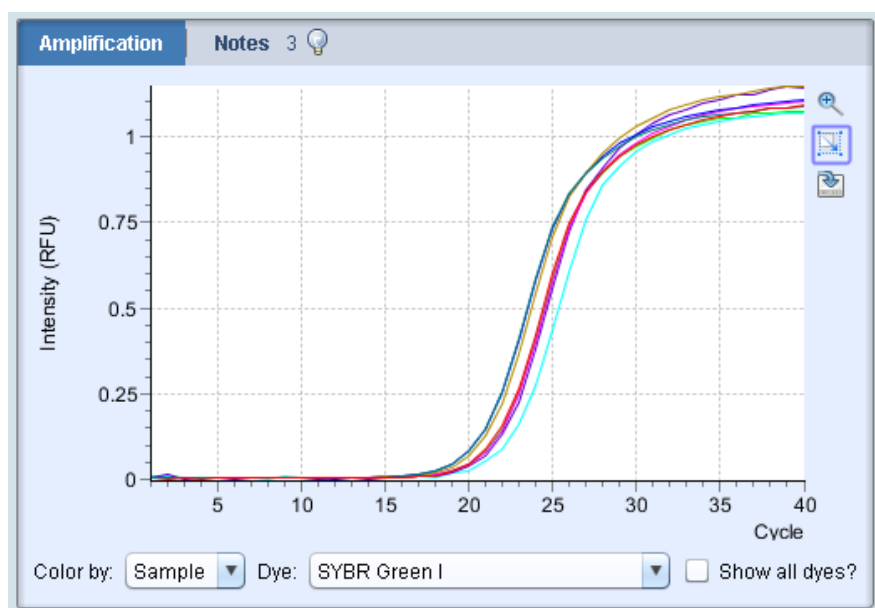
Elektroforetickou separací a porovnáním s velikostním standardem bylo potvrzeno, že velikosti amplikonů A, E a L studovaného gonozomálního a autozomálního genu odpovídají očekávané velikosti 243 bp. Na obrázku 12 je uveden vzorový elektroforeogram zachycující separaci amplikonů E a L u adultních jedinců i larev L4 generace. Z obrázku je patrné, že výsledkem PCR reakce je jediný produkt bez nespécifických amplifikací a to i přesto, že templátová DNA byla získána z larev a tudíž musela být částečně kontaminována DNA z natrávené potravy. Shodný výsledek byl získán i u amplikonu A. Tyto výsledky svědčí o tom, že jsou navržené primery vysoce specifické a nenasedají na genomickou DNA bramboru ani na genomickou DNA mikrobiomu mandelinky.



S - Thermo Scientific™ GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder

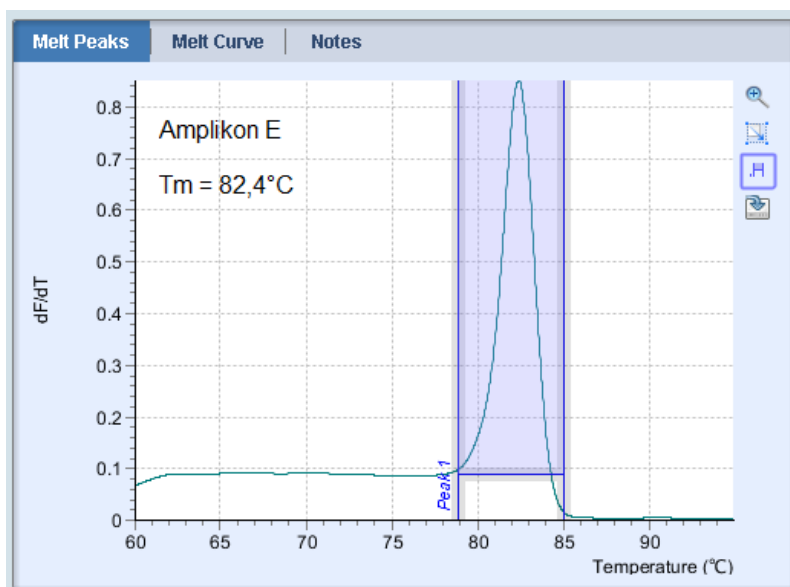
Obrázek 12 vzorový elektroforeogram s amplikony E a L

Amplifikační křivky, které na obrázku 13 odpovídají amplifikaci gonozomálního ampliconu E mají standardní průběh. Jejich tvar přechod do exponenciální fáze svědčí o správně navržené amplifikační reakci i o vhodném množství templátové DNA v reakci.



Obrázek 13 Amplifikační křivky vyjadřující průběh syntézy ampliconu E

Analýza teploty tání byla rovněž použita pro vyhodnocení specifičnosti amplifikace. Z obrázku 14, na kterém je znázorněno hodnocení ampliconu E, je patrné, že křivka má tvar jednoho osově symetrického píku, který odpovídá specifické amplifikaci. Obdobné výsledky byly zjištěny i u ampliconů A a L.



Obrázek 14 Analýza teploty tání u amplikonu E

5.3.2 Identifikace pohlaví pomocí navržených markerovacích systémů u adultních jedinců

Soubor patnácti dospělých a patnácti samců byl použit pro ověření dostatečné citlivosti a spolehlivosti markerovacích systémů A×L a E×L. V tabulce 9 jsou uvedeny hodnoty Ratio ΔCt pro oba markerovací systémy.

Tabulka 9 Hodnoty Ratio ΔCt pro markerovací systémy A×L a E×L u třiceti adultních jedinců pocházejících z Pokusného a demonstračního pozemku ČZU v Praze

Jedinec		Ratio		Jedinec		Ratio	
		A×L	E×L			A×L	E×L
1	adultní ♀	5,306	7,413	16	adultní ♂	2,609	3,715
2	adultní ♀	5,411	7,603	17	adultní ♂	2,801	3,663
3	adultní ♀	5,901	7,201	18	adultní ♂	2,305	3,614
4	adultní ♀	5,811	7,345	19	adultní ♂	2,666	3,814
5	adultní ♀	5,365	7,321	20	adultní ♂	2,108	3,901
6	adultní ♀	5,478	7,501	21	adultní ♂	2,901	3,204
7	adultní ♀	5,369	7,607	22	adultní ♂	2,478	3,211
8	adultní ♀	5,905	7,201	23	adultní ♂	2,562	3,255
9	adultní ♀	5,612	7,113	24	adultní ♂	2,399	3,801
10	adultní ♀	5,552	7,296	25	adultní ♂	2,801	3,745
11	adultní ♀	5,608	7,401	26	adultní ♂	2,715	3,768
12	adultní ♀	5,533	7,774	27	adultní ♂	2,709	3,699
13	adultní ♀	5,307	7,805	28	adultní ♂	2,788	3,689
14	adultní ♀	5,801	7,611	29	adultní ♂	2,695	3,754
15	adultní ♀	5,204	7,341	30	adultní ♂	2,814	3,457

Z výše uvedené tabulky vyplývá, že průměrná hodnota Ratio Δ Ct pro markerovací systém A×L byla u samic rovna 5, 544 a u samců byla 2, 623. Tento výsledek je možné charakterizovat i v relativních hodnotách, kdy samci dosahovali 47,32 % hodnoty Ratio Δ Ct samic. Z tabulky 9 rovněž vyplývá, že průměrná hodnota Ratio Δ Ct pro markerovací systém E×L byla u samic rovna 7, 436 a u samců 3, 619. Tento výsledek je rovněž možné charakterizovat i v relativních hodnotách, kdy samci dosahovali 48,68 % hodnoty Ratio Δ Ct samic.

5.3.3 Identifikace pohlaví pomocí navržených markerovacích systémů u larev L4

V následující tabulce 10 jsou uvedeny setříděné hodnoty Ratio Δ Ct markerovacích systémů A×L a E×L u padesáti náhodně sesbíraných larev L4 generace. Predikce pohlaví larev byla provedena na základě výsledků hodnocení referenčního souboru adultních samic a samců (Tabulka 9).

Tabulka 10 setříděné hodnoty Ratio Δ Ct obou markerovacích systémů u L4 larev, hodnoty jsou setříděny na základě pohlaví referenčního souboru adultních jedinců

Jedinec		Ratio		Jedinec		Ratio	
		A×L	E×L			A×L	E×L
1	larva L4 ♀	5,711	7,505	29	larva L4 ♂	2,814	3,258
2	larva L4 ♀	5,209	7,109	30	larva L4 ♂	2,901	3,887
3	larva L4 ♀	5,465	7,233	31	larva L4 ♂	2,754	3,765
4	larva L4 ♀	5,443	7,458	32	larva L4 ♂	2,777	3,608
5	larva L4 ♀	5,901	7,489	33	larva L4 ♂	2,308	3,689
6	larva L4 ♀	5,789	7,801	34	larva L4 ♂	2,412	3,714
7	larva L4 ♀	5,663	7,741	35	larva L4 ♂	2,506	3,801
8	larva L4 ♀	5,201	7,258	36	larva L4 ♂	2,907	3,204
9	larva L4 ♀	5,118	7,901	37	larva L4 ♂	2,811	3,607
10	larva L4 ♀	5,991	7,466	38	larva L4 ♂	2,444	3,554
11	larva L4 ♀	5,784	7,508	39	larva L4 ♂	2,654	3,841
12	larva L4 ♀	5,479	7,612	40	larva L4 ♂	2,747	3,771
13	larva L4 ♀	5,555	7,815	41	larva L4 ♂	2,901	3,659
14	larva L4 ♀	5,364	7,208	42	larva L4 ♂	2,999	3,401
15	larva L4 ♀	5,471	7,139	43	larva L4 ♂	2,306	3,203
16	larva L4 ♀	5,109	7,321	44	larva L4 ♂	2,407	3,499
17	larva L4 ♀	5,897	7,256	45	larva L4 ♂	2,219	3,719
18	larva L4 ♀	5,777	7,304	46	larva L4 ♂	2,555	3,618
19	larva L4 ♀	5,411	7,499	47	larva L4 ♂	2,501	3,625
20	larva L4 ♀	5,428	7,401	48	larva L4 ♂	2,443	3,704
21	larva L4 ♀	5,631	7,852	49	larva L4 ♂	2,407	3,778
22	larva L4 ♀	5,325	7,199	50	larva L4 ♂	2,513	3,699
23	larva L4 ♀	5,603	7,205				
24	larva L4 ♀	5,558	7,401				
25	larva L4 ♀	5,401	7,526				
26	larva L4 ♀	5,418	7,601				
27	larva L4 ♀	5,351	7,444				
28	larva L4 ♀	5,534	7,429				

5.3.4 Výsledky statistické analýzy diskriminačních schopností navržených markerovacích systémů

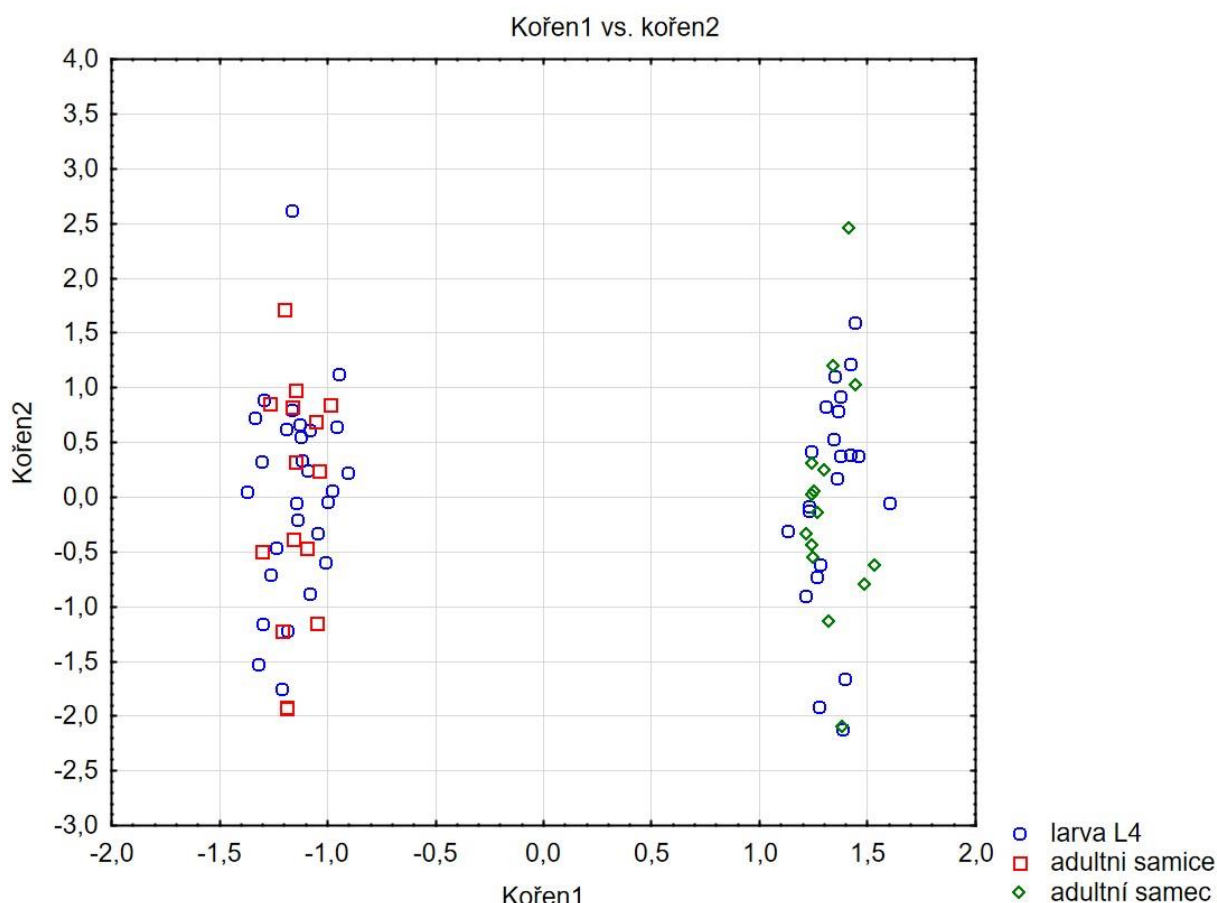
V případě, že vstupními daty pro diskriminační analýzu byly hodnoty Ratio Δ Ct larev L4 bez zadání jejich predikovaného pohlaví, analýza nepotvrdila statisticky významný vliv obou použitých markerovacích systémů. Tato analýza hodnotila data uvedená v tabulkách 9 a 10. Souhrnné výsledky této diskriminační analýzy jsou uvedeny v tabulce 11.

Tabulka 1 Souhrn výsledků diskriminační analýzy hodnotící larvy bez predikce jejich pohlaví

N=80	Výsledky diskriminační funkční analýzy (pohlaví) Počet prom. v modelu: 2; grupovací: Jedinec (3 skup) Wilk. lambda: ,62198 přibliž F (4,152)=10,183 p< ,0000					
	Wilk. (Lambda)	Parc. (Lambda)	F na vj ((2,76))	p-hodn.	Toler.	1-toler. (R ²)
Ratio A x L	0,626022	0,993547	0,246810	0,781913	0,059236	0,940764
Ratio E x L	0,628086	0,990283	0,372860	0,690014	0,059236	0,940764

Z tabulky 11 vyplývá, že ani jeden z markerovacích systémů neprokázal statisticky významnou schopnost diskriminovat jedince samičího a samčího pohlaví. Příčinou tohoto výsledku je fakt, že grupovací faktor larva obsahoval jedince samčího i samičího pohlaví a hodnoty Ratio Δ Ct u obou markerovacích systémů byly nekonzistentní. Hodnota parametru Wilkova lambda byla pro tuto analýzu rovna 0,62198. Přes statistickou neprůkaznost výsledků diskriminační analýzy byla získána data shlukována do dvou klastrů, jak je patrné z grafického výstupu kanonické analýzy (Graf 1)

Graf 1 Bodový graf kanonických skóre pro diskriminaci pohlaví u larev bez predikovaného pohlaví



Ve druhé variantě diskriminační analýzy byla vstupní data larev doplněna jejich predikovaným pohlavím na základě hodnot Ratio Δ Ct obou markerovacích systémů. Výsledky této analýzy jsou shrnuty v tabulce 12.

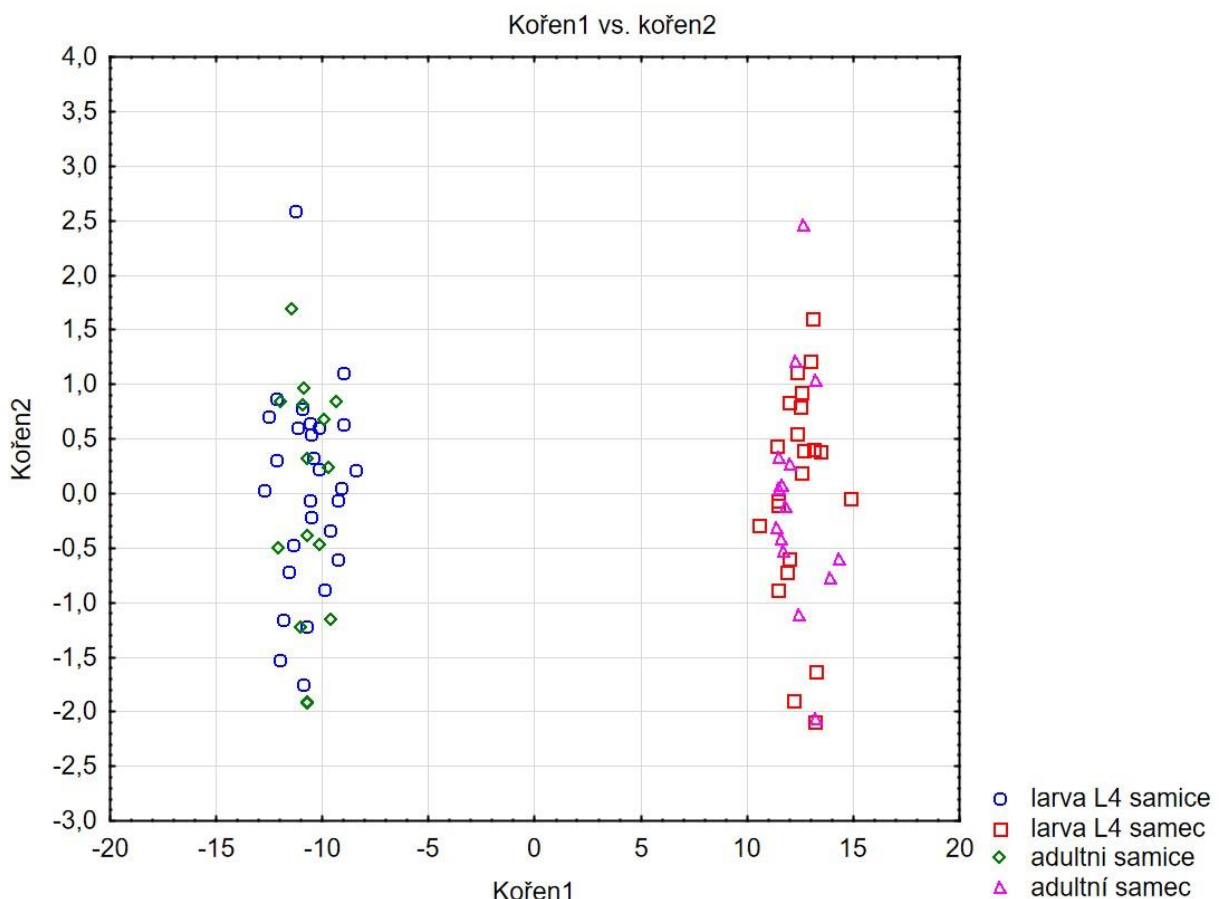
Tabulka 12 Souhrn výsledků diskriminační analýzy hodnotící larvy s predikovaným pohlavím

N=80	Výsledky diskriminační funkční analýzy (pohlaví) Počet prom. v modelu: 2; grupovací: Jedinec (4 skup) Wilk. lambda: ,00714 přibliž F (6,150)=270,84 p<0,0000					1-toler. (R ²)
	Wilk. (Lambda)	Parc. (Lambda)	F na vj ((3,75))	p-hodn.	Toler.	
Ratio A x L	0,011772	0,606609	16,21272	0,000000	0,991657	0,008343
Ratio E x L	0,022907	0,311753	55,19159	0,000000	0,991657	0,008343

Hodnota Wilkovy lambdy pro druhý model diskriminační analýzy byla rovna 0,00714. Z údajů uvedených v tabulce 12 je patrné, že hodnota Wilkovy lambdy byla pro oba dva markerovací systémy menší než 0,05. Proto oba dva markerovací systémy statisticky významně diskriminují jedince samičího a samčího pohlaví.

Graf 2 dokumentuje výsledky kanonické analýzy u druhé varianty diskriminační analýzy.

Graf 2 Bodový graf kanonických skóre pro diskriminaci pohlaví u larev s predikovaným pohlavím



Z porovnání grafu 1 a 2 vyplývá, že distribuce jednotlivých adultních jedinců i larev do jasně oddělených klastrů je v obou případech identická. Vzhledem k tomu, že druhý typ diskriminační analýzy definoval pohlaví u larev, je z grafů patrné, že larvy samičího pohlaví

byly přiřazeny do klastru tvořeného adultními samičkami. Stejný výsledek byl zjištěn i pro larvy samčího pohlaví a adultní samečky.

Pomocí obou dvou markerovacích systémů bylo predikováno 28 larev samčího pohlaví a 22 larev samčího pohlaví (Tabulka 10). Tento štěpný poměr byl porovnán neparametrickým χ^2 testem s teoreticky očekávaným poměrem 25 larev samčího pohlaví ku 25 larvám samčího pohlaví. Hodnota χ^2 testu byla 0,36, $p=0,5478$. Z p hodnoty vyplývá, že je výrazně větší než 0,05 a proto je možné považovat nalezený štěpný poměr mezi samičími a samčími larvami za shodný s teoreticky očekávaným štěpným poměrem 1:1.

6 Diskuze

6.1 Izolace DNA u mandelinky bramborové

Při řešení diplomové práce byl zvolený výchozí biologický materiál určený k izolaci DNA dvojího typu. Zaprvé byla u adultních jedinců *L. decemlineata* zvolena část těla tvořená hlavou a hrudí včetně končetin. Biologický materiál byl takto vybrán z toho důvodu, že tato část těla je teoreticky minimálně kontaminována konzumovanou potravou. Zadruhé byla u larev L4 generace zvolena přibližně jedna třetina celého těla včetně hlavy a části zadečku. V tomto případě výchozí biologický materiál obsahoval i různě natrávenou potravu. Jedinci byli usmrceni v 75% ethanolu a před izolací uchováni v mrazicím boxu při teplotě -20 °C, odebrání zvolených částí těla bylo provedeno před vlastní izolací pomocí skalpelu. Izzo et al. (2018) použili stejný postup, jen místo 70% ethanolu použili 95%. Przybylska et al. (2014) připravili materiál k izolaci rozdrčením celých jedinců v tekutém dusíku. Grapputo et al. (2005) skladovali brouky v 90% ethanolu. Crossley et al. (2017) drtili brouky v ATL pufru.

Ze studia vědecké literatury vyplývá, že téměř všichni autoři (Grapputo et al. 2005; Boman et al. 2008; Przybylska et al. 2014; Krawczyk et al. 2015; Crossley et al. 2017; Crossley et al. 2019) využili pro izolaci DNA komerčně vyráběné kity. Při řešení této diplomové práce byl k izolaci DNA rovněž zvolen komerčně vyráběný kit NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel). Tento kit použili i Krawczyk et al. (2015). Ostatní autoři při výzkumu používali DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) (Grapputo et al. 2005; Przybylska et al. 2014; Crossley et al. 2017; Izzo et al. 2018). Clark et al. (2001) použili pro izolaci DNAzol™ (ThermoFisher SCIENTIFIC). Sidorenko a Berezovskaya (2001) použili k izolaci fenol-chloroformovou extrakci s následnou precipitací ethanolom.

Kvantita a kvalita izolované genomické DNA byla hodnocena pomocí UV spektrofotometrické metody – NanoPhotometr /Implen). Vysokomolekularita extrahované DNA byla ověřena pomocí gelové elektroforézy – SubCell (BioRad). Pro fragmentaci byl použit 1% agarózový gel v 1× TBE pufru. 1% agarózový gel použili i Krawczyk et al. (2015) s tím rozdílem, že místo 1× TBE pufru použili 0,5× SB pufr. Lorite et al. (2013) použili 2% agarózový gel. Ostatní autoři tuto metodu nepopisují. Genomická DNA byla vizualizována ethidium bromidem. Krawczyk et al. (2015) k vizualizaci použili Midori Green (Nippon Genetics). Ostatní autoři metodu vizualizace neuvádějí.

Uvedené výsledky potvrdily, že je NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel) vhodný pro izolaci DNA z uvedeného biologického materiálu. Extrakce DNA pomocí izolační sady je většinou autorů využívána z důvodu, že výrazně urychluje izolaci DNA, při současném zachování stabilních podmínek během celé izolace. Tím je výrazně minimalizováno riziko možné kontaminace vzorků. Kvalita extrahované DNA byla prokázána tím, že vzniklé izoláty DNA fungovaly u všech vzorků jako bezproblémový PCR templát.

6.2 Analýza vybrané oblasti mitochondriálního genomu

Mitochondriální genom mandelinky bramborové, respektive jeho sekvence nebyla doposud kompletně a samostatně publikována. Nejvíce zkoumanou oblastí mitochondriální DNA je gen *mtCOII*, který se používá i pro bar coding (Herbert et al. 2003a,b). To je důvodem, proč je právě tento úsek mitochondriální DNA nejčastěji využíván pro hodnocení variability mitochondriálního genomu mandelinky (Grapputo et al. 2005; Przybylska et al. 2014; Crossley et al. 2017; Crossley et al. 2019).

Cílem této diplomové práce bylo získat sekvenci mitochondriální DNA obsahující tyto geny: část genu *nad2*, kompletní geny *trnW*, *trnC*, *trnY*, *mtCOI*, *trnL*, *mtCOII*, *trnK*, *trnD* a část genu *atp8*. Doposud publikované sekvence zveřejněné v mezinárodní databázi NCBI zmapovaly pouze úsek mitochondriální DNA, která zahrnuje neúplnou sekvenci genu *mtCOI*, kompletní sekvenci genu *trnL* a neúplnou sekvenci genu *mtCOII* (Grapputo et al. 2005; Przybylska et al. 2014; Crossley et al. 2019). Aby bylo možné vybranou část mitochondriálního genomu osekvenovat, bylo nejprve nezbytné navrhnout degenerované primery podle vytvořené konsenzus sekvence. Pro navržení degenerovaných primerů jsme využili skutečnosti, že u vybraných zástupců čeledi Chrysomelidae byly publikovány řadou autorů (Kitamura et al. 2008; Gómez-Rodríguez et al. 2015; Hunter et al. 2016a,b; Dierckxsens et al. 2017; Kastally & Mardulyn 2017; Song et al. 2017; Niel et al. 2018) sekvence námi studovaných genů. Po alignmentu těchto sekvencí pomocí programu MAFFT version 7 (Kato & Toh 2008) a následném použití programu BioEdit version 7.2.5 (Hall 1999) jsme u těchto genů identifikovali vysokou sekvenci homologii, tudíž byly tyto oblasti vhodné pro navržení degenerovaných primerů, k čemuž jsme použili program Primer3 Input 0.4.0 Program (Rozen & Skaletsky 2000). Tyto degenerované primery jsme následně úspěšně použili a získali primární sekvenci data u adultního jedince pocházejícího z Pokusného a demonstračního pozemku ČZU v Praze. Stejnou metodiku navržení primerů použili i Przybylska et al. (2014). Grapputo et al. (2005) použil pro amplifikaci 577 bp fragmentu mitochondriální DNA již publikované primery. Další autoři (Crossley et al. 2017; Crossley et al. 2019) způsob navržení primerů neuvádějí.

Primární sekvencí vybrané oblasti mtDNA byla získána data, která umožnila pomocí programu Primer3 Input 0.4.0 Program (Rozen & Skaletsky 2000) navrhnout druhově specifické primerové páry. Těchto pět primerových dvojic amplifikovalo fragmenty o předpokládané velikosti. Tento výsledek je dle mého názoru důkazem toho, že stanovení primární sekvence studované oblasti mtDNA bylo provedeno správně. Je možné konstatovat, že zvolená strategie založená na degenerovaných konsenzus primerech, se ukázala jako vhodná pro osekvenování části mtDNA u druhu, který nemá známou sekvenci studované oblasti DNA.

Získaná finální sekvence o celkové délce 3395 bp byla analyzována programem MITOS WebServer ("MITOS Web Server"), který identifikoval, že se v sekvenci nachází část genu

nad2, kompletní geny *trnW*, *trnC*, *trnY*, *mtCOI*, *trnL*, *mtCOII*, *trnK*, *trnD* a částečná sekvence genu *atp8*. I tento výsledek je důkazem toho, že získaná sekvence mtDNA mandelinky bramborové z hlediska lokalizace výše uvedených genů odpovídá typické struktuře mitochondriálního genomu brouků. Identickou strukturu genů v dané oblasti popsali u tribu Chrysomelini například Wang a Tang (2018).

6.3 Haplotypová analýza

Autoři, kteří publikovali sekvence úseku mtDNA obsahující částečnou sekvenci genu *mtCOI*, celou sekvence *trnL* a částečnou sekvenci genu *mtCOII* (Grapputo et al. 2005; Przybylska et al. 2014; Crossley et al. 2019) v porovnání s námi osekvenovali jen velmi krátký úsek mitochondriálního genomu. Konkrétně šlo o velikost 577 bp u Grapputo et al. (2005), 643 bp u Przybylska et al. (2014) a 544 bp u Crossley et al. (2019). Námi osekvenovaná část mitochondriálního genomu mandelinky bramborové má velikost 3395 bp a zahrnuje část genu *nad2*, kompletní geny *trnW*, *trnC*, *trnY*, *mtCOI*, *trnL*, *mtCOII*, *trnK*, *trnD* a částečnou sekvenci genu *atp8*.

Důvodem, proč jsem se v diplomové práci zaměřila na vytvoření sekvence mnohem delší, než uvádějí Grapputo et al. (2005), Przybylska et al. (2014), Crossley et al. (2019), byl předpoklad, že ve výrazně delší sekvenci je mnohem vyšší pravděpodobnost nalezení SNP, které by mohly být důkazem genetické variability mitochondriálního genomu mandelinky bramborové v České a Slovenské republice. Tato hypotéza se však nepotvrdila. Přestože jsem pro analýzy použila jedince ze vzdálených lokalit České a Slovenské republiky (Tabulka 1), nebyl nalezen žádný sekvenční polymorfismus. Lze tudíž předpokládat, že skutečně platí závěry, které vyslovili Grapputo et al. (2005), že evropské subpopulace mandelinky bramborové jsou z hlediska mitochondriální DNA uniformní. To, že byla získána sekvence mitochondriální DNA o velikosti 3395 bp, byl dle mého názoru velice důležitý výsledek a to zejména pro provedení fylogenetické analýzy. Ta bude diskutována v samostatné podkapitole diplomové práce.

Pro hodnocení haplotypové variability mandelinky bramborové v Evropě a v Americe však tento výsledek bohužel nepřinesl příliš dalších nových informací. Co je toho příčinou? Ve své práci jsem sice podala důkaz o tom, že české a slovenské subpopulace mandelinky bramborové představují z hlediska 3395 bp sekvence jediný identický haplotyp, ale pokud budu chtít porovnat tato výrazně robustnější molekulární data s doposud publikovanými informacemi o haplotypech mandelinky bramborové, tak je nezbytné redukovat získaná sekvenční data na pouze ty oblasti mitochondriálního genomu, které byly již publikovány. Proto bylo nezbytné získaná data redukovat na oblast o velikosti 544 bp, kterou použili pro popis haplotypů Grapputo et al. (2005) a Crossley et al. (2018) a Crossley et al. (2019). Z hlediska doposud publikovaných haplotypů mandelinky bramborové tudíž nemohl být potenciál mnou získané sekvence plně využit. Přesto mohu jednoznačně konstatovat, že alespoň porovnatelná část mnou získané sekvence o velikosti 544 bp vykazovala plnou sekvenční identitu s haplotypy uvedenými v mezinárodní nukleotidové databázi NCBI pod

číslly AJ884950.1 (Grapputo et al. 2005), MK605457.1 (Crossley et al. 2019), MK605452.1 (Crossley et al. 2019) a KY607432.1 (Crossley et al. 2018). Tyto výše uvedené publikované haplotypy jsou charakteristické tím, že jsou považovány za jediné v Evropě se vyskytující. V diskuzi bych ráda uvedla i další dle mého názoru důležitý fakt, na základě kterého byly vybrány světové haplotypy pro mnou provedenou haplotypovou analýzu.

V metodické části práce uvádím, že pro detekci haplotypů a pro hodnocení haplotypové diverzity byl použit program DnaSP 6 (Rozas et al. 2017). Tento program odhalil, že u některých publikovaných haplotypových sekvencí jsou prezentovány symboly degenerovaných nukleotidů jako je například R (A nebo G). Takovéto haplotypy byly z analýzy vyloučeny. Obecně je předpokládáno, že mitochondriální genom je děděn po matce a představuje teoreticky jedinou identickou sekvenci molekuly DNA (Hutchison et al. 1974; Giles et al. 1980). Co mohlo být příčinou takovéto variability publikovaných haplotypů? Jedním z možných vysvětlení je chybovost či kontaminace sekvenační reakce. Současně ale nelze vyloučit situaci, kdy sekvenovaný jedinec mohl být postižen *de novo* vzniklou kontaminací mitochondriálního genomu a mohlo dojít k jevu označovanému jako heteroplazmie (Rose et al. 2007). Vzhledem k tomu, že jsem si nemohla být jistá skutečnou příčinou tohoto jevu, byly tyto haplotypy z analýzy vyloučeny a v příloze I diplomové práce jsou uvedeny pouze haplotypy jejichž sekvence obsahuje standardní nukleotidy (A, T, G, C).

Z manuálního vyhodnocení všech sekvenovaných amplikonů mandelinek z České a Slovenské republiky jsem se se situací teoreticky možné heteroplazmie nesetkala. V diskuzi bych ráda zmínila jednu z dalších možných příčin, proč byly získány zcela identické 3395 bp dlouhé fragmenty mtDNA. Tímto faktorem je počet sekvenovaných individuí (34 jedinců). Grapputo et al. (2005) i Przybylska et al. (2014) hodnotili vyšší počty jedinců z mnohem vzdálenějších lokalit (vybrané státy Evropy a USA, a rovnoměrně rozmístěná místa v celém Polsku). Důvodem, proč ve své práci hodnotím české a slovenské subpopulace mandelinky bramborové (Tabulka 1) je napojení diplomové práce na grantový projekt, který je zaměřen právě na tyto lokality. Dalším z faktorů jsou i limitující finanční možnosti. Mnou provedená analýza byla zcela jistě finančně náročnější na získání sekvenčních dat o velikosti 3395 bp oproti výrazně kratším sekvencím, které vyhodnocovali Grapputo et al. (2005), Przybylska et al. (2014), Crossley et al. (2018), Crossley et al. (2019). Tito autoři získali sekvence s použitím jediného primerového páru. To znamená, sekvenovali jediný amplikon. Pro získání mých reprezentativních sekvencí o velikosti 3395 bp bylo nutné osekvenovat pět vzájemně se překrývajících amplikonů (Tabulka 7).

6.4 Fylogenetická analýza

Z fylogenetického stromu uvedeného na obrázku 11 vyplývá, že celá čeleď Chrysomelidae je monofyletická. Stejně závěry vyslovili rovněž Nie et al. (2019), kteří pro své analýzy také použili sekvence mitochondriálního genomu. Tito autoři rovněž vyslovili hypotézu, že podčeleď Alticinae je sesterská k podčeledi Galerucinae. Na fylogramu (Obrázek 11), neuvádím taxonomické členění do podčeledí, ale do tribů. Z fylogenetického

stromu je patrné, že tribus Alticini je sesterský vůči skupině tribů obsahující rovněž tribus Galerucini.

Čeď Bruchidae se ze stromu uvedeného na obrázku 11 jeví jako sesterská k čeledi Chrysomelidae. Čeď Cerambycidae je dle provedené analýzy sesterskou čeledí ke společnému předkovi, který dal vzniknout čeledím Chrysomelidae a Bruchidae. Z fylogenetického stromu je rovněž patrné, že řada tribů nevykazuje monofyletický charakter a jedná se zřejmě o syntetické taxonomické skupiny. Tento závěr se týká například tribu Alticini, do kterého jsou zařazeny druhy odvozené od dvou různých společných předků. Polyfyletický původ je z fylogramu patrný rovněž pro skupinu tribů Luperini, Galerucini a Chrysomelini. U tribu Chrysomelini je názorným příkladem druh *Gastrolina depressa*, která je taxonomicky zařazena do tribu Chrysomelini, ale z hlediska provedené fylogenetické analýzy vykazuje společného předka s tribem Galerucini. Tento výsledek potvrdili rovněž (Wang & Tang 2018).

Zajímavým zjištěním je, že obdobnou strukturu fylogenetického stromu čeledi Chrysomelidae zjistili Nie et al. (2019), přestože pro své analýzy použili odlišná molekulární data a vyhodnotili je odlišným způsobem. Vyhodnocovali sice sekvence mitochondriálního genomu, které ale rozdělili na sekvence kódující proteiny a sekvence kódující molekuly tRNA. Tato odlišná molekulární data byla Nie et al. (2019) hodnocena pomocí dvou odlišných datasetů. První dataset byl tvořen patnácti tRNA geny a pro tvorbu fylogenetického stromu byla použita metoda RAxML (Randomized Axelerated Maximum Likelihood). Druhý dataset představoval sadu třinácti genů kódujících polypeptidové řetězce. Fylogenetický strom byl sestaven na základě Bayesovské statistiky pomocí programu PhyloBayes.

Fylogenetický strom, který jsem konstruovala v rámci diplomové práce, na rozdíl od těchto autorů vyhodnocoval polymorfismy tRNA i strukturních genů současně. Přes zcela odlišný přístup k vyhodnocení dat byly získány fylogenetické stromy s obdobnou strukturou čeledi Chrysomelidae. Pro zajímavost Nie et al. (2019) použili jako outgroupové sekvence části mitochondriálního genomu brouků čeledi Cerambycidae, kteří v mé analýze fungovali jako hodnocené taxony. Přesto se v obou odlišných analýzách prokázalo, že čeď Cerambycidae je sesterská s čeledí Chrysomelidae. Z fylogenetického stromu (Obrázek 11) rovněž vyplývá, že z pohledu analyzovaných mitochondriálních genů se mandelince bramborové jeví jako nejpodobnější rod *Chrysolina*. Rod *Chrysolina* v sobě rovněž zahrnuje býložravé brouky schopné letu a s oválným tvarem těla. Jedná se o rod s kosmopolitním rozšířením v celém mírném pásmu Eurasie.

Garin et al. (1998) se rovněž věnovali variabilitě mitochondriální DNA rodu *Chrysolina* ale pouze na mezidruhové úrovni. Fylogenetický vztah s *L. decemlineata* bohužel nebyl těmito autory hodnocen. Přes mnou zjištěnou fylogenetickou podobnost mezi rody *Leptinotarsa* a *Chrysolina* je nutné upozornit na určité odlišnosti, které zmiňují např. Garin et al. (1998). Zaprvé se jedná o odlišnosti ve spektru hostitelských rostlin, dalším odlišným znakem je, že řada zástupců rodu *Chrysolina* je typická jednobarevnými metalicky zbarvenými krovkami.

6.5 Pohlavní dimorfismus mandelinky bramborové a možnosti identifikace pohlaví

U dospělců mandelinky bramborové je na základě morfologických rozdílů v utváření zadečku možné makroskopicky odlišit samičku od samečka, jak bylo popsáno v kapitole 3.3.3.1 Morfologické rozdíly mezi samečkem a samičkou, která vychází ze článku Khidhir a Mustafa (2018). Díky tomu bylo možné určit pohlaví adultních jedinců, a získat tak kolekce referenčních adultních jedinců se známým pohlavím. Spolehlivost této morfologické metody určení pohlaví byla ještě orientačně ověřena vypreparováním samčích a samičích gonád u vybraných jedinců. Vzhledem k tomu, že diplomová práce není primárně zaměřena na studium reprodukčních orgánů mandelinky bramborové, nebyly výsledky pitvy mrtvých samčích a samičích jedinců zařazeny do výsledků. Každopádně musím konstatovat, že přítomnost daného typu gonád byl v plné korelaci s hodnocením pohlaví podle metodiky publikované Khidhir a Mustafa (2018). Teoreticky sice bylo možné provést preparaci u každého z hodnocených jedinců, ale tento způsob by výrazně zvyšoval časové nároky na přípravu materiálu a současný zásah do intaktních jedinců by mohl rovněž zvýšit i riziko kontaminací během izolace DNA.

Navržený způsob identifikace pohlaví mandelinky s využitím relativní kvantifikace diploidně a hemizygotně založených genů je možné považovat za originální přístup. Při studiu dostupných publikovaných informací se mi nepodařilo nalézt žádný obdobně zaměřený vědecký článek, který by se věnoval molekulární identifikaci larev s morfologicky nerozlišeným pohlavím. Proto je velice obtížné z hlediska metodologického postupu diskutovat námi navržený protokol i jeho výsledky. Navržený postup vychází z obecného principu qRT-PCR (Šmarda et al. 2010; Perkins et al. 2012; Navarro et al. 2015; Domingues 2017), využívající interkalační barvivo SYBRGreen. Tato metoda je standardně používaná pro hodnocení exprese genů, kdy hodnota ΔCt porovnává expresi studovaného genu s expresí takzvaného housekeepingového genu. V této standardní metodě jsou jako templát používány molekuly cDNA.

V diplomové práci jsem tento obecný princip qRT-PCR aplikovala na relativní kvantifikaci genomické DNA u genů, které jsou v jaderném genomu mandelinky bramborové prezentovány dvěma alelami u samiček a jednou alelou u samečků. Výchozí hypotéza pro tuto experimentální část práce vycházela z frekventovaně publikovaných publikací o genu *LdVssc1*, byl řadou autorů (Hawthorne 2000; Clark et al. 2001; Kim et al. 2005) lokalizován na gonozomu X. Jako autozomální gen, který z hlediska výpočtu ΔCt plní funkci housekeepingového genu (Rao et al. 2013), byl vybrán gen kódující rhodopsin s předpokládanou autozomální lokací. Vzhledem k tomu, že při qRT-PCR dochází v rámci jednoho cyklu k amplifikaci jak studovaného genu, tak i housekeepingového genu, bylo zcela nezbytné primerové páry navrhnout tak, aby umožňovaly amplifikaci požadovaných produktů za identických podmínek. Proto již při navrhování primerů byly požadavky nastaveny tak, aby délka primerů, hodnota T_m i velikosti ampliconů byly co nejpodobnější.

Současně byla provedena i bioinformatická analýza, která potvrdila, že navrhované primerové páry nalézají jedinečné místo v genomu mandelinky, kde mohou hybridizovat s templátovou DNA. Tyto předpoklady byly ověřeny elektroforetickou separací a T_m analýzou, které indikovaly, že zvolený gen *LdVssc1* (Hawthorne 2000; Clark et al. 2001; Kim et al. 2005) by mohl být vhodným kandidátním genem pro navrhování markerovacích systémů. Obdobné výsledky potvrdily i vhodnost genu pro rhodopsin s podvojným založením u obou pohlaví. Lalam (2006), Perkins et al. (2012) uvádějí, že pro stanovování relativní exprese genů s využitím interkalačního barviva SYBRGreen je nezbytné, aby porovnávané geny vykazovaly identickou, nebo velice podobnou eficienci. Jelikož jsem se v diplomové práci nevěnovala expresi genů, ale snažila jsem se dokázat rozdíly v relativní kvantifikaci u genů s podvojným a hemizygotním založením, nebylo nutné optimalizovat celý protokol z hlediska identity eficiencí.

Pro volbu vhodného markerovacího systému bylo důležité, aby jedinci samčího pohlaví vykazovali přibližně 50% hodnoty Ratio ΔCt oproti jedincům samičího pohlaví. Současně bylo přihlédnuto k tomu, aby profil amplifikace dával vzniknout amplifikačním křivkám standardního tvaru a aby hodnoty Ct byly spolehlivě detekovatelné i při amplifikaci 20 ng templátové reakci o objemu 10 μ l. Při realizaci těchto experimentů jsem vycházela z obecných pravidel pro qRT-PCR, kdy je jeden vzorek amplifikován ve třech technických replikátech (Šmarda et al. 2010; Domingues 2017). Důvodem tohoto postupu bylo ověření, zdali je navržený protokol reprodukovatelný. Ve výsledkové části diplomové práce z důvodu větší přehlednosti neuvádím vstupní data ΔCt u jednotlivých vzorků a jejich technických replikátů. Variabilitu technických replikátů jsem statisticky nehodnotila, jelikož řídicí program termocykleru LightCycler® Nano (Roche) tuto možnost nenabízí. Na základě pouze vizuálního porovnání hrubých dat analýzy bylo možné konstatovat, že rozdíly mezi technickými replikáty byly minimální a tudíž bylo možné navržený protokol považovat za vysoce reprodukovatelný. Z tabulek 9 a 10 je patrná určitá variabilita hodnot Ratio ΔCt u obou markerovacích systémů i u obou pohlaví. Rozdíly mezi markerovacími systémy A×L a E×L jsou podle mého názoru způsobeny již výše diskutovanou eficiencí. Kolísání hodnot Ratio ΔCt v rámci jednoho pohlaví a jednoho markerovacího systému osobně považuji za nepříliš vysoké a domnívám se, že tento fakt lze vysvětlit kvalitní genomickou DNA, která byla získána za použití kitu NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel). Pro relativní kvantifikaci nukleových kyselin na základě SYBRGreen metody je vyrovnaná kvalita analyzovaných molekul DNA považována za zcela nezbytný předpoklad (Lalam 2006; Perkins et al. 2012). Mohu tudíž konstatovat, že zvolená metoda extrakce DNA byla provedena s použitím správného kitu a i to, že celý extrakční protokol proběhl reprodukovatelně. Domnívám se, že stáří analyzovaného biologického materiálu sehrálo rovněž důležitou roli pro izolaci kvalitní genomické DNA. DNA byla extrahovaná z hodnocených jedinců ve velice krátké době (dny až několik týdnů) po jejich sběru a usmrcení.

Pro statistické vyhodnocení schopnosti markerovacích systémů A×L a E×L odlišit jedince samčího a samičího pohlaví byla použita diskriminační analýza doplněná o kanonickou analýzu. Tyto analýzy multivariačních dat nacházejí široké využití v biologii

(Marhold & Suda 2001). Při statistickém zpracování jsem vycházela z předpokladu, že oba navržené markerovací systémy se mohou lišit z hlediska jejich citlivosti při rozlišování pohlaví. Ve výsledkových tabulkách 11 a 12 záměrně uvádím dva přístupy k volbě vstupních dat. První diskriminační analýza vychází z toho, že k larvám jsem přistupovala jako k individuím s morfologicky neodlišitelným pohlavím. Tento přístup v sobě reflektuje pouze morfologické stanovisko, ale z hlediska genetiky je chromozomálně pohlaví mandelinky bramborové založeno již v zygotě a tudíž genetické rozdíly mezi pohlavími musí existovat i na úrovni larev různých vývojových stádií. Této situaci odpovídají výsledky diskriminační analýzy. Groupovací proměnná larva musela nutně obsahovat data odpovídající Ratio Δ Ct samečků i samiček.

Pro analýzy jsem použila náhodně sesbírané larvy L4 generace na vrchních listových patrech bramboru. Jednalo se o porost raných odrůd brambor těsně před sklizní v srpnu 2019. Tomuto termínu odpovídal i stav rostlin, kdy zelené listy byly přítomné pouze na koncových částech lodyh. Lokalita pro odběr larev i dospělců byla vybrána záměrně a to z toho důvodu, že porost brambor nebyl ošetřován insekticidy. Ze srpnového termínu je patrné, že se muselo jednat o larvy druhé generace (Rod et al. 2005; Zahradník 2008). Absence insekticidní ochrany byla dle mého názoru i z důvodu, že nedošlo k selekci v rámci hodnocené subpopulace. Výsledky markerovacích systémů A×L a E×L, prokázaly, že kolekce 50 náhodně sesbíraných larev byla dostatečně velká pro podchycení larev s predikovaným samičím a samčím pohlavím. Přestože tato první diskriminační analýza nepotvrdila statistickou průkaznost ani jednoho z markerovacích systémů pro predikci pohlaví, kanonická analýza podala jasný důkaz o tom, že anonymní skupina larev (bez predikovaného pohlaví) byla distribuována do dvou vizuálně odlišných shluků, které odpovídají shlukům referenčních samičích a samčích genotypů.

Pro druhou diskriminační analýzu jsem záměrně využila výsledků markerovacích systémů. Předpokládám, že oba dva markerovací systémy jsou schopny jednoznačně odlišit jedince podle pohlaví, a proto jsem vstupní data larev kategorizovala na 2 skupiny (larvy samičky a larvy samečka). Takto zpracovaná vstupní data již vykazovala u groupovacích skupin (adultní samička, adultní sameček, larva samička a larva sameček) výrazně vyšší homogenitu. Diskriminační analýza potom jasně potvrdila, že oba markerovací systémy představovaly vyrovnaně citlivé diskriminační faktory pro odlišení pohlaví u mandelinky bramborové (Tabulky 9 a 10).

Ve výsledkové části diplomové práce záměrně uvádím i Graf 2, který je výsledkem druhého typu diskriminační analýzy. Rozložení jednotlivých bodů do dvou prostorově oddělených shluků je zcela identické jako u Grafu 1. Z Grafu 2 je však patrné, že nezbytná podmínka pro průkaznost diskriminační analýzy (uvádět larvy s predikovaným pohlavím) jasně rozdělila larvy samčího a samičího pohlaví, které přiřadila adekvátním způsobem k referenčním adultním jedincům. V předchozí části diskuze jsem se zmínila o velikosti vzorku hodnocené subpopulace (50 larev). Předpokládala jsem, že v takovémto vzorku podchytím larvy samčího a samičího pohlaví. Vzhledem k chromozomálnímu způsobu určení mandelinky bramborové (Hawthorne 2000) bylo možné očekávat, že v populaci na úrovni larev bude

poměr mezi samečkami a samičkami 1:1. Přestože sbírané larvy pocházely z trsů brambor různě od sebe vzdálených a zcela jistě se nejednalo o sourozence, bylo i v tomto randomizovaném vzorku statisticky potvrzeno, že poměr samičích a samčích larev byl na základě χ^2 testu považován za shodný s očekávaným poměrem 1:1. Domnívám se, že i tento výsledek demonstruje spolehlivost navržených markerovacích systémů. V závěru této části diskuze bych ráda uvedla, že byly navrženy dva markerovací systémy založené na exonovém a intronovém amplikonu genu *LdVssc1* (Hawthorne 2000; Clark et al. 2001; Kim et al. 2005). Oba dva markerovací systémy fungovaly jednoznačně a reprodukovatelně, proto jsem se již nezabývala navrhováním dalšího markerovacího systému umožňujícího predikovat pohlaví mandelinky. Vzhledem k tomu, že mnou provedená vyhledávací studie identifikovala v rámci celogenomického sekvenčního projektu AYNB02 (Murali et al. 2017) „scaffold“ sekvenci lokalizovanou na gonozomu X bylo by možné navrhnout i další markerovací systémy vycházející z jiných gonozomálně lokalizovaných genů, než byl gen *LdVssc1*.

7 Závěr

Závěry, které byly získány při řešení diplomové práce je možno formulovat jako odpovědi na vyslovené hypotézy:

- Bioinformatická analýza založená na alignmentu vybraných oblastí mtDNA brouků čeledi Chrysomelidae potvrdila, že v těchto oblastech lze nalézt úseky s poměrně vysokou sekvenční homologií. Tento výsledek byl aplikován při navrhování primerových párů pro prvotní sekvenaci. Degenerované primery bylo nezbytné použít pouze ve dvou případech. Primární amplikony byly úspěšně osekvenovány a daly vznik konsensus sekvenci pro navržení druhově specifických primerů. Na začátku řešení práce jsem předpokládala osekvenování pouze části *mtCOI* a *mtCOII*. Vzhledem k úspěšnosti prvních sekvenací byla oblast sekvenované mtDNA mandelinky rozšířena o další geny. Je možné konstatovat, že první hypotéza byla potvrzena.
- Druhá vědecká hypotéza předpokládala z důvodu efektu zakladatele nízkou vnitrodruhovou variabilitu studované oblasti mtDNA mandelinky. Tato hypotéza byla zcela jasně potvrzena. Přestože jsem pro hodnocení haplotypů použila sekvenci příbližně 2,9 krát delší než ostatní autoři, nepodařilo se mi zjistit v českých a slovenské subpopulaci žádné SNP. Mohu tudíž konstatovat, že z pohledu hodnocené části mtDNA všechny vzorky odpovídaly jednomu haplotypu, který byl shodný s publikovanými daty.
- Během řešení diplomové práce byla získána sekvence vybrané oblasti mtDNA mandelinky o velikosti 3395 bp. Tato sekvence byla použita pro in silico fylogenetickou analýzu hodnotící celkem 69 druhů brouků z různých čeledí. ML metoda (model GTR+G+I) potvrdila monofyletický původ čeledi Chrysomelidae. Byl zjištěn nesoulad mezi zařazením některých druhů do syntetické taxonomické jednotky tribus a výsledky molekulární analýzy. Sekvenčně nejvyšší podobnost byla u mandelinky bramborové zjištěna s rodem *Chrysomela*.
- Pro studium variability populací mandelinky na úrovni larev je důležité mít informace o jejich pohlaví. Vzhledem k tomu že larvy mandelinky nevykazují znaky pohlavního dimorfismu, byly navrženy dva markerovací systémy fungující na principu qRT-PCR. Jako gen lokalizovaný na gonozomu X byl navržen gen *LdVssc1* a referenčním autozomálním genem byl gen kódující rhodopsin. Statickými analýzami (diskriminační analýza a kanonická analýza) bylo prokázáno, že oba dva navržené markerovací systémy dokázaly statisticky významně odlišit jedince samičího a samčího pohlaví. Poměr mezi larvami samičího a samčího pohlaví odpovídal poměru 1:1. Tento výsledek byl potvrzen neparametrickým χ^2 testem.

Během řešení diplomové práce byly získány dva zcela originální výsledky. Prvním výsledkem je cíleně získané sekvence mtDNA, která nebyla doposud publikována. Domnívám se, mé pilotní výsledky by bylo vhodné do budoucna doplnit a získat kompletní sekvenci mtDN mandelinky včetně editace genů.

Druhým originálním výsledkem bylo navržení qRT-PCR markerovacích systémů pro identifikaci pohlaví. Domnívám se, že by bylo vhodné tento navržený protokol aplikovat i na další vývojové stupně larev a na genomickou DNA extrahovanou jinými postupy. Vhodné bybylo rovněž vyhodnotit možnost aplikace digitální kapičkové PCR pro absolutní kvantifikaci amplikonů. V současné době existují u hmyzu studie zaměřené na hodnocení exprese genů zodpovědných za diferenciaci gonád nebo za přechod jedinců do diapauzy. Myslím si, že by bylo zajímavé provést obdobné studie i u mandelinky bramborové.

8 Literatura

- Allendorf FW, Lundquist LL. 2003. Introduction: Population Biology, Evolution, and Control of Invasive Species. *Conservation Biology* **17**:24-30.
- Alyokhin A, Udalov M, Benkovskaya G. 2013. Part II Biology of Major Pests 2 The Colorado Potato Beetle. Pages 11-30 in Alyokhin A, Udalov M, Benkovskaya G, editors. *Insect pests of potato: global perspectives on biology and management*. Elsevier / Academic Press, Boston.
- Alyokhin A. 2009. Colorado Potato Beetle Management on Potatoes: Current Challenges and Future Prospects. *Fruit, Vegetable and Cereal Science and Biotechnology* **3**:10-19.
- Ballard JWO, Rand DM. 2005. The Population Biology of Mitochondrial DNA and Its Phylogenetic Implications. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **36**:621-642.
- Bartlett JMS, Stirling D. 2003. A short history of the polymerase chain reaction. Pages 3-6 in Bartlett JMS, Stirling D, editors. *Methods in Molecular Biology: PCR Protocols*. Humana Press, New Jersey.
- Boiteau G, Alyokhin A, Ferro DN. 2003. The Colorado potato beetle in movement. *The Canadian Entomologist* **135**:1-22.
- Boiteau G. 1992. Colorado Potato Beetle: Life Stages. Communication Branch, Agriculture Canada, Canada.
- Boman S. 2008. Ecological and Genetic Factors Contributing to Invasion Success: The Northern Spread of the Colorado Potato Beetle. Jyväskylä University Printing House, Jyväskylä.
- Cingel A, Savić J, Lazarević J, Ćosić T, Raspor M, Smigocki A, Ninković S. 2016. Extraordinary Adaptive Plasticity of Colorado Potato Beetle: "Ten-Striped Spearman" in the Era of Biotechnological Warfare. *International Journal of Molecular Sciences* **17**:1538.
- Clark JM, Lee SH, Kim HJ, Yoon KS, Zhang A. 2001. DNA-based genotyping techniques for the detection of point mutations associated with insecticide resistance in Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Pest Management Science* **57**:968-974.
- Clements J, Schoville S, Peterson N, Lan Q, Groves RL, Guedes RNC. 2016. Characterizing Molecular Mechanisms of Imidacloprid Resistance in Select Populations of *Leptinotarsa decemlineata* in the Central Sands Region of Wisconsin. *PLOS ONE* **11**:1-15.

- Crossley MS, Chen YH, Groves RL, Schoville SD. 2017. Landscape genomics of Colorado potato beetle provides evidence of polygenic adaptation to insecticides. *Molecular Ecology* **26**:6284-6300.
- Crossley MS, Chen YH, Groves RL, Schoville SD. 2018. *Leptinotarsa decemlineata* haplotype 49 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; tRNA-Leu gene, complete sequence; and cytochrome oxidase subunit II (COII) gene, partial cds; mitochondrial. Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KY607480.1/> (accessed July 2020).
- Crossley MS, Rondon SI, Schoville SD. 2019. Effects of contemporary agricultural land cover on Colorado potato beetle genetic differentiation in the Columbia Basin and Central Sands. *Ecology and Evolution* **9**:9385-9394.
- Dierckxsens N, Mardulyn P, Smits G. 2017. NOVOPlasty: de novo assembly of organelle genomes from whole genome data. *Nucleic Acids Research* **45**:18.
- Dlugosch KM, Parker IM. 2008. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology* **17**:431-449.
- Doležal P, Hausvater E. 2018. Mandelinka bramborová - nejvýznamnější škůdce bramborové natě. Agromanuál. Available from www.agromanual.cz/cz/clanky/ochrana-rostlin-a-pestovani/skudci/mandelinka-bramborova-nejvyznamnejsi-skudce-bramborove-nate (accessed June 2020).
- Domingues L. 2017. Principles of Genetic Engineering. Pages 81-127 in Pandey A, Teixeira JA, editors. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Foundations of Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier, Amsterdam.
- Dyall SD, Johnson PJ. 2000. Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and organelle biogenesis. *Current Opinion in Microbiology* **3**:404-411.
- Flegr J. 2007. Úvod do evoluční biologie. Academia, Praha.
- Garin CF, Juan C, Petitpierre E. 1999. Mitochondrial DNA Phylogeny and the Evolution of Host-Plant Use in Palearctic Chrysolina (Coleoptera, Chrysomelidae) Leaf Beetles. *Journal of Molecular Evolution* **48**:435-444.
- Gibson BW. 2005. The human mitochondrial proteome: oxidative stress, protein modifications and oxidative phosphorylation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **37**:927-934.
- Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace, DC. 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National academy of Sciences* **77**:6715-6719.

- Gómez-Rodríguez C, Crampton-Platt A, Timmermans MJTN, Baselga A, Vogler AP, Gilbert M. 2015. Validating the power of mitochondrial metagenomics for community ecology and phylogenetics of complex assemblages. *Methods in Ecology and Evolution* **6**:883-894.
- Grapputo A, Boman S, Lindström L, Lyytinen A, Mappes J. 2005. The voyage of an invasive species across continents: genetic diversity of North American and European Colorado potato beetle populations. *Molecular Ecology* **14**:4207-4219.
- Gray MW. 1999. Evolution of organellar genomes. *Current Opinion in Genetics & Development* **9**:678-687.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* **41**:95-98.
- Hare JD. 1990. Ecology and Management of the Colorado Potato Beetle. *Annual Review of Entomology* **35**:81-100.
- Hausvater E, Doležal P. 2014. Metodika integrované ochrany brambor proti mandelince bramborové (*Leptinotarsa decemlineata*). Výzkumný ústav bramborářský, Havlíčkův Brod.
- Hawthorne DJ. 2001. AFLP-Based Genetic Linkage Map of the Colorado Potato Beetle *Leptinotarsa decemlineata*: Sex Chromosomes and a Pyrethroid-Resistance Candidate Gene. *Genetics* **158**:695-700.
- Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, de Waard JR. 2003a. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. **270**:313-321.
- Hebert PD, Ratnasingham S, de Waard JR. 2003b. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* **270**:96-99.
- Holderegger R, Kamm U, Gugerli F. 2006. Adaptive vs. neutral genetic diversity: implications for landscape genetics. *Landscape Ecology* **21**:797-807.
- Holland MM, Parsons TJ. Mitochondrial DNA sequence analysis-validation and use for forensic casework. *Forensic Science Review* **11**:21-50.
- Hruban V, Majzlík I. 2002. Genové inženýrství. Pages 241-257 in *Obecná genetika*. Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha.
- Hunter A, Moriniere J, Tang P, Linard B, Crampton-Platt A, Vogler AP. 2016a. *Phratora vulgatissima* mitochondrion, partial genome. Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX087333.1> (accessed July 2020).

- Hunter A, Moriniere J, Tang P, Linard B, Crampton-Platt A, Vogler AP. 2016b. *Phratora vulgatissima* mitochondrion, partial genome. Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KX087333.1> (accessed July 2020).
- Hutchison, CA, Newbold JE, Potter SS, Edgell MH. 1974. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature* **251**:536-538.
- Chien A, Edgar DB, Trela JM. 1976. Deoxyribonucleic Acid Polymerase from the Extreme Thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology* **127**:1550-1557.
- Izzo VM, Chen YH, Schoville SD, Wang C, Hawthorne DJ. 2018. Origin of Pest Lineages of the Colorado Potato Beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Economic Entomology* **111**:868-878.
- Kastally C, Mardulyn P. 2017. Widespread co-occurrence of two distantly related mitochondrial genomes in individuals of the leaf beetle *Gonioctena intermedia*. *Biology Letters* **13**.
- Katoh K, Toh H. 2008. Improved accuracy of multiple ncRNA alignment by incorporating structural information into a MAFFT-based Framework. *BMC Bioinformatics* **9**:212.
- Kazda J, Jindra Z, Kabíček J, Prokinová E, Ryšánek P, Stejskal V. 2001. Choroby a škůdci polních plodin, ovoce a zeleniny. *Farmář*, Praha.
- Khidhir A-QS, Mustafa RA. 2018. Illustrate the morphologic characters of Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* say, 1824 (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies* **6**:456-462.
- Kim HJ, Hawthorne DJ, Peters T, Dively GP, Clark JM. 2005. Application of DNA-based genotyping techniques for the detection of *kdr*-like pyrethroid resistance in field populations of Colorado potato beetle. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **81**:85-96. Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048357504001129>.
- Kitamura N, Fujiyama S, Aotsuka T. 2008. Rapid Chromosomal Changes Inferred from Variation in Mitochondrial DNA Among Populations of the Leaf Beetle *Chrysolina aurichalcea* (Coleoptera: Chrysomelidae) in Japan. *Zoological Science* **25**:1111-1120.
- Krawczyk K, Szymańczyk M, Obrępańska-Stęplowska A. 2015. Prevalence of Endosymbionts in Polish Populations of *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of Insect Science* **15**:106.
- Labguide. 2014. Real-time PCR. Available from <https://labguide.cz/metody/real-time-pcr/> (accessed June 2020).
- Lalam N. 2006. Estimation of the reaction efficiency in polymerase chain reaction. *J Theor Biol.* **242**:947–953.

- Lorite P, Torres MI, Palomeque T. 2013. Characterization of two unrelated satellite DNA families in the Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Coleoptera, Chrysomelidae). *Bulletin of Entomological Research* **103**:538-546.
- Lyytinen A, Lindström L, Mappes J. 2008. Genetic variation in growth and development time under two selection regimes in *Leptinotarsa decemlineata*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **127**:157-167.
- Macholán M. 2014. *Základy fylogenetické analýzy*. Masarykova univerzita, Brno.
- Marhold K, Suda J. 2001. *ANALÝZA MULTIVARIAČNÍCH DAT V TAXONOMII (FENETICKÉ METODY)*. Praha.
- Maxam AM, Gilbert W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**:560-564.
- MITOS Web Server. Available at <http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/index.py> (accessed July 2020).
- Navarro E, Serrano-Heras G, Castaño MJ, Solera J. 2015. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta* **439**:231-250.
- NCBI: National Center for Biotechnology Information. Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (accessed July 2020).
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. 1975. THE BOTTLENECK EFFECT AND GENETIC VARIABILITY IN POPULATIONS. *Evolution* **29**:1-10.
- Nie R-E, Andújar C, Gómez-Rodríguez C, Bai M, Xue H-J, Tang M, Yang C-T, Tang P, Yang X-K, Vogler AP. 2019. The phylogeny of leaf beetles (Chrysomelidae) inferred from mitochondrial genomes. *Systematic Entomology* **45**:188-204.
- Nie R-E, Breeschoten T, Timmermans MJTN, Nadein K, Xue H-J, Bai M, Huang Y, Yang X-K, Vogler AP. 2018. The phylogeny of Galerucinae (Coleoptera: Chrysomelidae) and the performance of mitochondrial genomes in phylogenetic inference compared to nuclear rRNA genes. *Cladistics* **34**:113-130.
- Pakendorf, B, Stoneking, M. 2005. Mitochondrial DNA and human evolution. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* **6**:165-183.
- Perkins JR, Dawes JM, McMahon SB, Bennett DLH, Orengo C, Kohl M. 2012. Read qPCR and NormqPCR: R packages for the reading, quality checking and normalisation of RT-qPCR quantification cycle (Cq) data. *BMC Genomics* **296**: 1-8.

- Poole AM, Penny D. 2007. Evaluating hypotheses for the origin of eukaryotes. *Bioessays* **29**:74-84.
- Przybylska A, Budziszewska M, Klejdysz T, Nawrot J, Obrępańska-Stęplowska A. 2014. High Stability of a Mitochondrial Genetic Marker mtCOII in Polish Colorado Potato Beetle Populations. *American Journal of Potato Research* **91**:720-725.
- Public Data Portal - Specimen Record. Available at http://v3.boldsystems.org/index.php/Public_RecordView?processid=FBCOP312-13 (accessed July 2020).
- Radcliffe EB, Lagnaoui A. 2007. Insect Pests in Potato. Pages 543-567 in Vreugdenhil JB, Bradshaw J, Gebhardt C, Govers F, Taylor M, MacKerron D, Ross H, editors. *Potato Biology and Biotechnology*. Elsevier Science, Cambridge.
- Rasocha V, Hausvater E, Doležal P, Klofáčková P. 2009. Výskyt škůdců brambor a klimatické změny. *Bramborářství* **17**:10-12.
- Rasocha V, Hausvater E, Doležal P. 2008. Ochrana brambor proti mandelince bramborové, 3. aktualizované vydání. Výzkumný ústav bramborářský, Havlíčkův Brod.
- Richardson DM, Pyšek P, Rejmánek M, Barbour MG, Panetta FD, West CJ. 2000. Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and Distributions* **3**:14-93.
- Rinkevich FD, Su C, Lazo TA, Hawthorne DJ, Tingey WM, Naimov S, Scott JG. 2012. Multiple evolutionary origins of knockdown resistance (kdr) in pyrethroid-resistant Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **104**:192-200.
- Rod J, Hluchý M, Zavadil K, Prášil J, Somssich I, Zacharda M. 2005. *Obrazový atlas chorob a škůdců zeleniny střední Evropy*. Biocont Laboratory, Brno.
- Roopnarine, P. 2006. DNA barcoding: Today is too soon. The magazine of the California Academy of Sciences. Available from <http://researcharchive.calacademy.org/calwild/2006winter/stories/today.html> (accessed July 2020).
- Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sánchez-Gracia A. 2017. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular biology and evolution* **34**:3299-3302.
- Rozen S, Skaletsky H. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics methods and protocols* 365-386.

- Saccone C, DeCarla G, Gissi C, Pesole G, Reyes A. 1999. Evolutionary genomics in the Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* **238**:195-210.
- Sakai, AK, et al. 2001. The Population Biology of Invasive Species. *Annual Review of Ecology and Systematics* **32**:305-332.
- Sanger F, Coulson AR. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology* **3**:441-448.
- Sidorenko AP, Berezovskaya OP. 2001. Individual Polymorphism for RAPD Markers in Spring Generation of Colorado Potato Beetle *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Russian Journal of Genetics* **37**:1130-1133.
- Song N, Yin X, Zhao X, Chen J, Yin J. 2017. Reconstruction of mitogenomes by NGS and phylogenetic implications for leaf beetles. *Mitochondrial DNA Part A* **29**:1041-1050.
- Sutovsky, P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. 1999. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* **402**:371-372.
- Šefrová H. 2006. *Rostlinolékařská entomologie*. Konvoj, Brno.
- Šmarda, J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V, Koptíková J. 2010. *Metody molekulární biologie*. Masarykova univerzita, Brno.
- Wang Q, Tang G. 2017. Genomic and phylogenetic analysis of the complete mitochondrial DNA sequence of walnut leaf pest *Paleosepharia posticata* (Coleoptera: Chrysomeloidea). *Journal of Asia-Pacific Entomology* **20**:840-853.
- Wang Q, Tang G. 2018. The mitochondrial genomes of two walnut pests, *Gastrolina depressa depressa* and *G. depressa thoracica* (Coleoptera: Chrysomelidae), and phylogenetic analyses. *PeerJ* **6**.
- Weber D. 2003. Colorado beetle: pest on the move. *Pesticide Outlook* **14**:256-259.
- Zahradník J. 2008. *Brouci*. Aventinum, Praha.

9 Seznam použitých zkratek a symbolů

A	adenin
AFLP	délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů
ATL	lyzační pufr používaný při izolaci DNA
ATP	adenosintrifosfát
atp8	podjednotka 8 ATPázové pumpy
BIC	Bayesian Information Criterion
bp	base pair
C	cytosin
COI	podjednotka 1 cytochrom c oxidázy
COII	podjednotka 2 cytochrom c oxidázy
Ct	cycle of treshold
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
ČZU	Česká zemědělská univerzita
ddATP	dideoxyadenintrifosfát
ddCTP	dideoxycytosintrifosfát
ddGTP	dideoxyguanintrifosfát
ddNTP	dideoxynukleotidtrifosfát
ddTTP	dideoxythyminfosfát
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	kyselina ethilendiamintetraoctová
G	guanin
GTR+G+I	metoda pro vypracování fylogenetického stromu
ML	maximální pravděpodobnost (angl. maximum likelihood)
mt	mitochondriální
<i>nad2</i>	podjednotka 2 Nikotinamidadeninukleotid dehydrogenázy
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction
qRT-PCR	quantitative Real-time PCR
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SNP	Single Nucleotide Polymorfismus
T	thymin
TBE	Tris-borát-EDTA
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
trnC	tRNA - cystein
trnD	tRNA - kyselina asparágová
trnK	tRNA - lyzin
trnL	tRNA - leucin
trnW	tRNA - valin
trnY	tRNA – tyrozin

♀ symbol pro samičku

♂ symbol pro samečka

A260/A280 poměr absorbancí při vlnové délce 260 a 280 nanometrů

A260/230 poměr absorbancí při vlnové délce 260 a 230 nanometrů

V_k variační koeficient

10 Samostatné přílohy

Příloha I Přehled haplotypů madelinky bramborové

Následující haplotypy byly vytvořeny na základě variability 544bp dlouhé sekvence mtDNA mandelinky bramborové pomocí programu DnaSP 6 (Rozas et al. 2017). Autory haplotypů označených čísly databáze NCBI jsou Grapputo et al. (2005), Crossley et al. (2018) a Crossley et al. (2019). Haplotyp 1 CZU v Praze byl získán při řešení diplomové práce.

Hap_1: 6 [AJ884950.1 MK605457.1 MK605452.1 KY607432.1 AJ884950.1 Haplotyp 1 CZU v Praze	Hap_25: 1 [KY607489.1]	Hap_49: 1 [KY607457.1]
Hap_2: 1 [KY607513.1]	Hap_26: 1 [KY607488.1]	Hap_50: 1 [KY607456.1]
Hap_3: 1 [KY607512.1]	Hap_27: 1 [KY607487.1]	Hap_51: 2 [KY607455.1 AJ884951.1]
Hap_4: 1 [KY607511.1]	Hap_28: 1 [KY607486.1]	Hap_52: 2 [KY607454.1 AJ884952.1]
Hap_5: 1 [KY607510.1]	Hap_29: 1 [KY607485.1]	Hap_53: 2 [KY607453.1 AJ884953.1]
Hap_6: 1 [KY607509.1]	Hap_30: 1 [KY607484.1]	Hap_54: 2 [KY607446.1 AJ884960.1]
Hap_7: 1 [KY607508.1]	Hap_31: 1 [KY607483.1]	Hap_55: 2 [KY607445.1 AJ884961.1]
Hap_8: 1 [KY607507.1]	Hap_32: 1 [KY607482.1]	Hap_56: 2 [KY607444.1 AJ884962.1]
Hap_9: 1 [KY607506.1]	Hap_33: 1 [KY607481.1]	Hap_57: 2 [KY607443.1 AJ884963.1]
Hap_10: 1 [KY607505.1]	Hap_34: 1 [KY607480.1]	Hap_58: 2 [KY607442.1 AJ884964.1]
Hap_11: 1 [KY607504.1]	Hap_35: 1 [KY607479.1]	Hap_59: 2 [KY607441.1 AJ884965.1]
Hap_12: 1 [KY607503.1]	Hap_36: 1 [KY607478.1]	Hap_60: 2 [KY607440.1 AJ884966.1]
Hap_13: 1 [KY607502.1]	Hap_37: 1 [KY607475.1]	Hap_61: 2 [KY607439.1 AJ884967.1]
Hap_14: 1 [KY607501.1]	Hap_38: 1 [KY607474.1]	Hap_62: 2 [KY607438.1 AJ884968.1]
Hap_15: 1 [KY607500.1]	Hap_39: 1 [KY607473.1]	Hap_63: 2 [KY607437.1 AJ884969.1]
Hap_16: 1 [KY607499.1]	Hap_40: 1 [KY607471.1]	Hap_64: 1 [KY607436.1]
Hap_17: 1 [KY607498.1]	Hap_41: 1 [KY607470.1]	Hap_65: 1 [KY607433.1]
Hap_18: 1 [KY607496.1]	Hap_42: 1 [KY607469.1]	Hap_66: 2 [KY607452.1 AJ884954.1]
Hap_19: 1 [KY607495.1]	Hap_43: 1 [KY607468.1]	Hap_67: 2 [KY607451.1 AJ884955.1]
Hap_20: 1 [KY607494.1]	Hap_44: 1 [KY607467.1]	Hap_68: 2 [KY607450.1 AJ884956.1]
Hap_21: 1 [KY607493.1]	Hap_45: 1 [KY607466.1]	Hap_69: 2 [KY607449.1 AJ884957.1]
Hap_22: 1 [KY607492.1]	Hap_46: 1 [KY607464.1]	Hap_70: 2 [KY607448.1 AJ884958.1]
Hap_23: 1 [KY607491.1]	Hap_47: 1 [KY607463.1]	Hap_71: 2 [KY607447.1 AJ884959.1]
Hap_24: 1 [KY607490.1]	Hap_48: 1 [KY607462.1]	

