

Jihočeská universita v Českých Budějovicích  
Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

**Charakteristika mitochondriálního genomu korovnice *Dreyfusia prelli*  
(Adelgidae)**

**Anna Kuřátková**

Školitel: PaedDr. Martina Žurovcová, PhD.

Školitel specialista: Ing. Jan Havelka, PhD.

České Budějovice

2009

## **Bakalářská práce**

Kuřátková, A., 2009. Charakteristika mitochondriálního genomu korovnice *Dreyfusia prelli* (Adelgidae). [Characteristics of the mitochondrial genome of the adelgid *Dreyfusia prelli* (Adelgidae). Bc.Thesis, in Czech.] Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic, 38 pp.

## **Annotation**

My research was about mitochondrial genome of the adelgid *Dreyfusia prelli*. The aim was to find suitable molecular marker for diversification of species within family *Adelgidae*. The protein-coding genes were used for creating of phylogenetic tree to solve the relationship among *Aphididae/Adelgidae/Phylloxeridae*.

Tato práce byla financována GA AVČR, číslo grantu IAA600960705, ze záměru Entomologického ústavu Z 50070508 a Přírodovědecké fakulty JU.

Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění pozdějších předpisů souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou universitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pouze s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích, 6. 5. 2009

.....

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat své školitelce Martině Žurovcové za odborné vedení, dohled a cenné rady a informace poskytnuté v průběhu mé práce, ing. Janu Havelkovi za poskytnutí analyzovaného materiálu. Dále bych ráda poděkovala Lucce Kučerové za pomoc nejen v mých laboratorních začátcích, ale i za konzultace ohledně počítačového zpracování dat a kolektivu celé naší laboratoře za přátelskou atmosféru a podporu. Zvlášť ráda bych poděkovala své rodině a přátelům za velkou trpělivost a podporu po celou dobu studia.

# Obsah

1. ÚVOD.....	1
1.1 MtDNA a její využití jako molekulárního markeru.....	1
1.2 Mitochondriální DNA.....	3
1.3 Korovnice ( <i>Adelgidae</i> ).....	4
1.4 <i>Dreyfusia prelli</i> .....	5
2. CÍLE PRÁCE.....	7
3. MATERIÁL A METODY .....	8
3.1 Materiál.....	8
3.2 Extrakce DNA .....	8
3.2.1 Izolace pomocí Invisorb® Spin Tissue Mini Kit (Invitek).....	8
3.2.2 Izolace pomocí ZR Genomic DNA II Kit™ (Zymo Research).....	9
3.2.3 Izolace pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen).....	9
3.2.4 Izolace pomocí „Squishing buffer“ (Gloor et al., 1993).....	9
3.2.5 Extrakce čisté mitochondriální DNA .....	9
3.3 Primery .....	11
3.4 PCR.....	12
3.5 Gelová elektroforeza.....	13
3.6 Purifikace DNA .....	14
3.6.1 DNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research).....	14
3.6.2 Přečištění pomocí ExoSAP-IT® (USB; Dugan et al., 2002).....	15
3.7 Sekvence DNA.....	15
3.7.1 Přečištění Sephadexem.....	15
3.7.2 Zpracování sekvenční reakce .....	16
3.8 Zpracování sekvencí.....	16
4. VÝSLEDKY .....	17
4.1 Uchovávání vzorků.....	17
4.2 Izolace DNA .....	17
4.3 Mitochondriální genom .....	17
4.3.1 Jednotlivé fragmenty .....	17
4.3.2 Mitochondriální genom .....	18
4.3.2.1 tRNA .....	20
4.3.2.2 Geny kódující proteiny.....	22
4.3.2.3 Ribozomální RNA.....	22
4.4 Mezi druhové srovnání <i>D. prelli</i> s příbuznými druhy.....	23
5. DISKUZE.....	24
5.1 Uchovávání vzorků.....	24
5.2 Izolace DNA .....	24
5.3 Vliv různých podmínek na účinnost PCR amplifikace.....	24
5.4 Mitochondriální genom <i>D. prelli</i> .....	25
5.4.1 Popis mitochondriálního genomu <i>D. prelli</i> .....	25
5.4.2 tRNA .....	26
5.4.3 Protein kódující geny.....	26
5.4.4 Ribozomální RNA.....	27
5.4.5 A+T oblast a oblast „repeats“.....	27
5.5 Mezi druhové srovnání <i>D. prelli</i> s příbuznými druhy.....	28
6. ZÁVĚR .....	29
7. LITERATURA.....	30
8. PŘÍLOHY .....	35

# 1. ÚVOD

## 1.1 MtDNA a její využití jako molekulárního markeru

Mitochondriální DNA je pravděpodobně nejrozšířenějším markerem pro řešení vztahů fylogenetických, fylogeografických, taxonomických i populačně-genetických. Různé lokusy mtDNA jsou široce používány v uvedených studiích již téměř 30 let (Simon et al., 1994). K popularitě mtDNA zřejmě přispívají její vlastnosti jako je malá velikost genomu, relativně rychlá evoluční proměnlivost, maternální dědičnost a nepřítomnost rekombinace (Powers et al., 1989). Z nich dále vyplývá relativně lehká izolace a amplifikace DNA, neboť mtDNA je v buňce četnější než nukleární, a proto i snadněji detekovatelná ve starších vzorcích (Caterino et al., 2000, Loxdale and Lushai, 1998).

Nejlépe prostudovaným kmenem v oblasti mtDNA jsou členovci (*Arthropoda*). Sekvence genomu mtDNA mouchy octomilky *Drosophila yakuba* byla první mezi bezobratlými (Clay and Wolstenholme, 1985, de Bruijn, 1983), a dodnes se používá jako referenční sekvence, k jejímuž pořadí nukleotidů jsou vztahovány nově získané mitochondriální genomy.

Rychlý vývoj molekulárních technik v poslední době umožňuje využití i celých mitochondriálních genomů – tzv. genomika. V posledních 10 letech prudce vzrostl počet kompletně osekvenovaných mitochondriálních genomů (Boore et al., 2005), jenom členovců je dnes publikováno již 244 (genomová databáze NCBI).

Kromě srovnávání sekvencí jednotlivých genů se využívá i jejich pořadí v mitochondrii (Kambhampati and Smith, 1995, Thaoet al., 2004, Simon et al., 1994, Boore et al., 1995, Boore and Brown, 1998). Srovnání upořádání genů v mtDNA má výjimečné výhody pro rekonstrukci specifických mnohobuněčných vývojových větví, a to z následujících důvodů:

- obsah genů je téměř neměnný,
- velké množství potenciálních uspořádání dělá sblížení nepravidelným a proto je pravděpodobně uspořádání genů sdíleno jen jako výsledek společného předka,
- všechny geny běžně nalezené v mtDNA živočichů mají homologické geny i v mtDNA protist, rostlin a hub,

- stabilita genového uspořádání je lépe vysvětlená vzácností v novém uspořádání, které se selekcí sbližování stává nepravděpodobnějším,
- genové uspořádání obvykle zůstává nezměněno po dlouhá období evolučního času, takže si mohou udržet signál starých obecných předků (Boore and Brown, 1998, Boore, 1999).

Starší práce dělané na třídě *Insecta* naznačují značnou konzervovanost pořadí genů přes širokou škálu různých taxonomických skupin. Geny pro tRNA mění pořadí častěji než ostatní mitochondriální geny (Kambhampati and Smith 1995, Thao et al., 2004). Na základě porovnání celých nebo téměř celých mitochondriálních genomů bylo dokázáno, že koryši (*Crustacea*) a šestinozí (*Hexapoda*) jsou parafyletickou skupinou (Cook et al., 2005). Ke stejnému závěru došel i Carapelli et al. (2007) na základě srovnání mitochondriálních genů kódujících proteiny.

Výše uvedené studie, zabývající se hlubokými fylogenetickými vztahy, se však soustředí především na evolučně významné druhy, např. u chvostoskoků (*Collembola*) bylo osekvenováno již 9 mitochondrií (Carapelli et al., 2007). Naproti tomu druhy ekonomicky významné zůstávají opomíjeny, ačkoliv i zde by tento přístup napomohl zpřesnění taxonomických vztahů, což je důležitým předpokladem pro jejich další poznání.

Příkladem takto opomíjeného taxonu je i podřád mšicosaví (*Sternorrhyncha*), zahrnující rostlinné škůdce jako červci, mery, molice a mšice. Celkem zde bylo studováno 9 kompletních mitochondriálních genomů, z toho však většina (6) patří do skupiny molic. Zatím jedinou práci zabývající se mitochondriálním genomem mšice publikoval Thao et al. (2004). Zjistili, že mšice *S. graminum* nemá ve svém mitochondriálním genomu tRNA-S1, která se u ostatních organismů, které byly zahrnuty do výzkumu (*Psylloidea*, *Aleyrodidae*, *Aphididae*), vyskytuje. Mery (*Psylloidea*), mšice (*Aphididae*) a mnoho molic (*Aleyrodidae*) mají mtDNA, která má pořadí genů podobající se původnímu navrženému pořadí genů u hmyzu. Pořadí tRNA-Cys a tRNA-Tyr a je stejné u mšic a mer, zatímco u molic jsou tyto tRNA v opačném pořadí (Thao et al., 2004). Mitochondriální genom *Acyrtosiphon pisum* není samostatně publikován, neboť je součástí probíhajícího genomového projektu. Neúplná

sekvence mitochondrie *Daktulosphaira vitifoliae* je rovněž zveřejněna pouze v databázi GenBank bez dalších podrobnějších analýz.

## 1.2 Mitochondriální DNA

Mitochondrie jsou energii produkující organely eukaryotických buněk, které hrají zásadní roli v buněčném metabolismu, apoptóze, nemoci a stárnutí buněk (Brand, 1997, Kroemer et al., 1998, Graeber and Muller, 1998, Wei, 1998). Jsou místem oxidativní fosforylace, která je zásadní pro tvorbu ATP (Boore, 1999). Mitochondrie se vyvinuly z endosymbiotické  $\alpha$ -Proteobakterie před víc než jednou miliardou let. Mají vlastní genetický systém, který je pozůstatkem po genomu endosymbionta.

Mitochondriální DNA živočichů je kruhová, extrachromozomální molekula (Thao et al., 2004, Wilson et al., 1985, Boore, 1999), její délka je 14 – 42 kbp (Wolstenholme, 1992, Wilson et al., 1985). MtDNA obsahuje 37 genů – 13 z nich kóduje proteiny (mezi nimi tři podjednotky cytochrom oxidázy – COI, COII, COIII, dva kódují podjednotky ATP syntázy - ATP6, ATP8, sedm podjednotky NADH dehydrogenázy - ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6, jeden cytochrom oxidázu *b* - *Cytb*), 1 gen kóduje velkou ribozomální RNA podjednotku (16S) a jeden malou ribozomální RNA podjednotku (12S), 22 genů kóduje transferové RNA (leucin a serin jsou kódovány dvěma geny, ostatní aminokyseliny jedním genem). Tyto geny vybavují mtDNA jejím vlastním systémem pro replikaci DNA, transkripci, zpracování mRNA a přepis do proteinů. V některých mtDNA jsou všechny geny přepisovány z jednoho řetězce, zatímco v jiných jsou geny rozloženy na řetězce dva (Boore, 1999). Pořadí genů je v rámci kmenů v podstatě stejné, ale mezi kmeny je určitá variabilita (Thao et al., 2004, Boore, 1999).

Mitochondriální DNA hmyzu má obvyklé geny i jejich pořadí, zvláštním rysem je však struktura předpokládaného počátku replikace neboli tzv. „control region“ (Thao et al., 2004, Clay and Wolstenholme, 1985, Crozier & Crozier, 1993, Mitchel et. al., 1993, Boore, 1999, Shadel and Clayton, 1997, Clayton, 1982, Vila and Björklund, 2004, Wolstenholme, 1992, Zhang and Hewitt, 1997). Tato nekódující oblast je u hmyzu extrémně bohatá na adenin a thymin (odpovídá více než 85 %), a proto je označována také jako A+T oblast. Obsahuje buď přímé repetice, převrácené repetice nebo dlouhou

řadu T, A, nebo TA, popřípadě jakoukoli kombinaci těchto možností. Doposud nejvyšší pozorované hodnoty jsou 96 % (např. *Drosophila melanogaster*). Velikost A+T oblasti hmyzu se značně mění. Např. u mouchy octomilky *D. yakuba* má 1077 bp, zatímco u *D. melanogaster* má tatáž oblast 4601 bp.

Charakteristickým znakem mšic je existence druhé nekódující oblasti, která se nazývá „repeat region“. Složení bazí i struktura je velmi podobná oblasti A+T, její umístění je však variabilní v rámci úseku ND3-ND5 (Zhang and Hewitt, 1997). U *Daktulosphairya vitifoliae* nebyl tento fragment osekvenován.

### 1.3 Korovnice (*Adelgidae*)

Korovnice (*Adelgidae*, *Aphidini*, *Sternorrhyncha*) jsou malá skupina hmyzu uvnitř nadčeledi mšice (*Aphidoidea*, *Hemiptera*). Je známo asi 70 druhů (Havill and Footitt, 2007), z nichž v České republice se jich vyskytuje 17 (Havelka, osobní komunikace). Fosilní nálezy korovnic jsou vzácné, některé nálezy pochází z období Pliocénu a Pleistocénu (Heie and Wegierek, 1998), fosilní hálka byla nalezena v Japonsku a je z období Pleistocénu (Kokawa, 1961).

Ačkoli jsou korovnice velkými škůdci našich jehličnatých porostů, nikdo se zatím jejich genetikou do velké míry nezabýval.

Mšice korovnice žijí pouze na jehličnanech. Pomocí styletů na bodci se přisávají do rostlinného pletiva, sají rostlinné šťávy a tím dochází k tvorbě hálek (Heie, 1987, Kapitola, 2003). V životním cyklu korovnic se střídá mnoho generací, jde o tzv. multigenerativní životní cyklus. Ten může být holocyklický (střídání dvou hostitelů) nebo anoholocyklický (jen jeden hostitel).

Není přesně známo, jestli sesterskou skupinou mšic korovnic (*Adelgidae*) jsou mšice (*Aphididae*) nebo phylloxery (*Phylloxeridae*). Je obecně přijímáno, že skupiny *Adelgidae* a *Phylloxeridae* sdílejí více společných obecných předků než se skupinou *Aphididae* (Heie, 1987). Tento vztah nebyl vyřešen ani v předešlých studiích (Cook et al., 2002, von Dohlen and Moran, 1995). Právě snaha o vyřešení tohoto vztahu byla jedním z důvodů pro tuto práci. Jako porovnávací organismy jsem použila mšici *Schizaphis graminum* (mšice obilná; GenBank NC\_006158), mšici *Acyrtosiphon*



*pisum* (kyjatka hrachová, GenBank FJ411411) a phylloxeru *Daktulosphaira vitigoliae* (mšička révokaz, DQ021446).

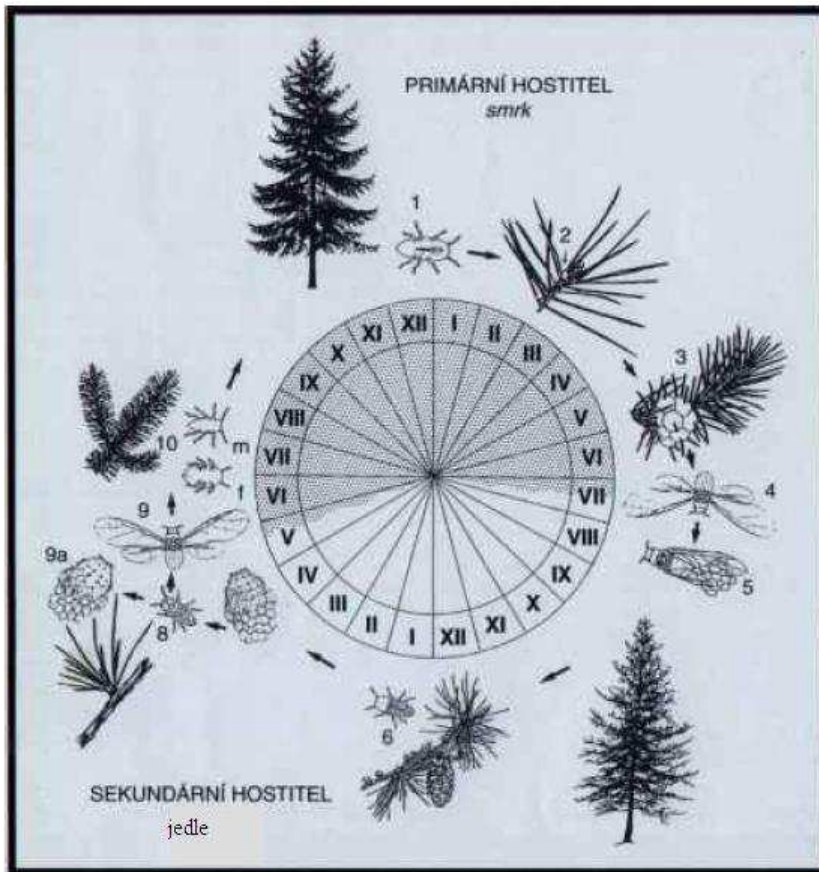
#### 1.4 *Dreyfusia prelli*

*Dreyfusia prelli* Grossmann 1935 (bez českého druhového jména) pochází původem z Kavkazského pohoří (Francke-Grossmann, 1937a, Francke-Grossmann, 1937b). V České republice je však hojná, a lze velmi dobře morfologicky odlišit od jiných druhů korovnic.

*Dreyfusia prelli* má dvouletý holocyklický životní cyklus, jejím primárním hostitelem je smrk (*Picea sp.*), sekundárním hostitelem je jedle (*Abies sp.*) (Francke-Grossmann, 1937a, Francke-Grossmann, 1937b, Kapitola, P. 2003). Samci se vyskytují jen velmi krátce a jen v jedné generaci celého životního cyklu (Kapitola, P., 2003).

Životní cyklus korovnice *Dreyfusia prelli* (schematický náčrt je na obrázku 1., Blackman and Eastop, 1994, upraveno) začíná na konci léta nebo na začátku podzimu na smrku, kde se vylíhnou larvy zakladatelek (zakladatelka – *fundatrix*), přisají se na nový výhon, kde ve formě nymf přezimují. Na jaře se dále vyvíjí v bezkřídlé samice. Sání rostlinné šťávy indukuje tvorbu šišticevitě hálky. V hálce se *fundatrix* dovyvine přes 3 instary. Dospělá *fundatrix* naklade velké množství vajíček. Z nich se líhnou budoucí obyvatelé hálky – *gallicolae*. Larvy *gallicolae* sají zpočátku na jehlicích a tím podporují tvorbu hálky, do jejíchž komůrek se později uzavírají. Vývoj v hálce trvá několik měsíců. Z uschlé hálky vylezou uprostřed léta *gallicolae* a dovyvinou se v okřídlené jedince – *migrantes alatae*, kteří přelétají na sekundárního hostitele – jedli. Na sekundárním hostiteli se usadí na jehlicích a nakladou vajíčka. Z vajíček se vylíhnou *sistentes* (j.č. *sistens*), jejich larvy v 1. nebo 2. instaru přezimují (*neosistens*). *Sistentes* na jaře dalšího roku dospějí a nakladou shluk mnoha vajíček, ze kterých se líhnou *progredientes*. Jejich larvy se vyvinou v bezkřídlé i okřídlené samice. Bezkrídle mohou během léta plodit několik dalších generací. Část jarních až letních generací můžou tvořit i *sistentes* v 1. instaru, které se přisají a přes léto setrvávají v klidovém stadiu. Okřídlené samice *progredientes* – *alatae sexuparae* se přesunou na primárního hostitele – smrk, usadí se na jehlicích a nakladou vajíčka. Z těchto vajíček se vylíhne generace *sexuales* – bezkrídle samci a samice. Každá oplodněná samice naklade v létě jedno vajíčko a z něj

se vylíhne *fundatrix* (Lampel, 1968, Steffan, 1972, Carter, 1971, Eichhorn 1989, Blackman and Eastop, 1994, Havill et al., 2007, Kapitola, 2003).



**Obrázek 1:** Schematický náčrt životního cyklu korovnice *Dreyfusia prelli*.

1 – larva fundatrix na primárním hostiteli, 2 – fundatrix, 3 – hálka na smrku (uvnitř gallicolae), 4 – dospělá gallicola přelétá na sekundárního hostitele, 5 – alatae gallicolae, 6 – larva sistens v 1. instaru, 7 – dospělá sistens, 8 – larva progrediens, 9 – okřídlená sexupara přelétá na primárního hostitele, 9a – bezkřídlá progrediens (zakládá další generaci na sekundárním hostiteli), 10 – sexuales (samec – m, samice)

## 2. CÍLE PRÁCE

- 1) Osekvenovat mitochondriální genom vybrané korovnice *Drefusia prelli*.
- 2) Porovnat strukturu mitochondriálního genomu *D. prelli* s mitochondriálními genomy mšic *S. graminum*, *A. pisum* a phylloxery *D. vitifoliae*, a stanovit jejich fylogenetické vztahy.

### 3. MATERIÁL A METODY

#### 3.1 Materiál

V práci byly použity korovnice *Dreyfusia prelli*, které byly nasbírány a určeny Ing. Janem Havelkou. Vzorky byly uchovávány buď ve 100% etanolu (pokud byly sběry prováděny na vzdálenějších lokalitách bez možnosti zamražení) nebo zamražené v  $-82^{\circ}\text{C}$ . Podrobnosti o jednotlivých vzorcích jsou uvedeny v Tabulce 1.

**Tabulka 1.** Seznam živočichů použitých pro extrakci DNA

Číslo epruvety	Lokalita sběru	Datum	Hostitelská rostlina		Mšice		Stadium vývoje, forma	Způsob uchování
			Genus	Species	Genus	Species		
10398	Buchlovice	17.7.2007	<i>Picea</i>	<i>orientalis</i>	<i>Dreyfusia</i>	<i>prelli</i>	alata gallicola	$-82^{\circ}\text{C}$
10399	Buchlovice	17.7.2007	<i>Picea</i>	<i>orientalis</i>	<i>Dreyfusia</i>	<i>prelli</i>	alata gallicola	$-82^{\circ}\text{C}$
11161	Buchlovice	4.7.2008	<i>Picea</i>	<i>orientalis</i>	<i>Dreyfusia</i>	<i>prelli</i>	alata gallicola	$-82^{\circ}\text{C}$
11162	Buchlovice	4.7.2008	<i>Picea</i>	<i>orientalis</i>	<i>Drayfusia</i>	<i>prelli</i>	alata gallicola	$-82^{\circ}\text{C}$
2634	Lednice	28.6.2007	<i>Picea</i>	<i>orientalis</i>	<i>Dreyfusia</i>	<i>prelli</i>	alata gallicola	ethanol

Během všech laboratorních prací byly používány aerosolové špičky, abychom zamezili kontaminaci vzorků mezi sebou nebo cizorodou DNA.

#### 3.2 Extrakce DNA

Vzorky, které byly uchovány v etanolu, byly před extrakcí nechány na filtračním papíře v pokojové teplotě, dokud se všechen etanol zcela neodpařil. Vzorky uchovávané v  $-82^{\circ}\text{C}$  byly pro extrakci použity ihned po vyjmutí z mrazáku.

DNA jsem izolovala pěti různými metodami extrakce. Vždy bylo použito 3-5 klonálních jedinců z jedné hálky, pouze v případě extrakce čisté mitochondriální DNA bylo použito klonálních 24 jedinců z jedné hálky.

##### 3.2.1 Izolace pomocí Invisorb<sup>®</sup> Spin Tissue Mini Kit (Invitex)

Izolace byla provedena dle návodu výrobce, byly provedeny pouze dvě drobné změny. V případě, že byla lyze dělána 12 hodin, bylo po dvou hodinách po započítání

přidáno dalších 40 µl proteinasy K. Vymývání DNA z membrány sloupečku bylo provedeno dvakrát. V prvním případě bylo použito 100 µl „Elution buffer D“, podruhé byla DNA vymývána do objemu 50 µl „Elution buffer D“. První frakce byla uchovávána v +4°C, druhá v -20°C.

### **3.2.2 Izolace pomocí ZR Genomic DNA II Kit™ (Zymo Research)**

Izolace byla provedena dle návodu výrobce, pouze vymývání DNA z membrány sloupečku bylo provedeno dvakrát. V obou případech bylo použito 20 µl „elution buffer“. První frakce byla uchovávána v +4°C, druhá v -20°C.

### **3.2.3 Izolace pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)**

Izolace byla provedena dle návodu výrobce, pouze vymývání DNA z membrány sloupečku bylo provedeno dvakrát. Poprvé v objemu 100 µl pufru AE, podruhé v objemu 50 µl pufru AE.

### **3.2.4 Izolace pomocí „Squishing buffer“ (Gloor et al., 1993)**

Izolace byla provedena pomocí „Squishing buffer“ o následujícím složení: 10mM Tris-Cl pH 8,2, 1mM EDTA, 25mM NaCl, po zhomogenisování vzorku se přidává 10 µl proteinázy K o koncentraci 10 mg/ml na 1 ml „Squishing buffer.“ Pokud byly vzorky uchovávány v etanolu, byl etanol odsát a vzorek byl hydratován v 20 µl pufru AE (Qiagen; 10mM Tris-Cl, 0,5mM EDTA; pH 9,0) po dobu dvaceti minut. Poté byl pufr AE odsát. Vzorek byl dále dán do 0,5 ml mikrozkuhavky, bylo přidáno 50 µl čerstvého „Squishing buffer“. Pomocí zatavené 200µl špičky bez filtru byl vzorek zhomogenizován, byl přidán 1 µl proteinázy K. Mikrozkuhavka byla inkubována 30 minut na 37°C a poté byla proteináza K degradována povařením na 95°C po 5-10 minut. Vzorek byl následně zcentrifugován, aby zbytky organismů klesly ke dnu mikrozkuhavky. Vzorek byl následně uchováván v +4°C.

### **3.2.5 Extrakce čisté mitochondriální DNA**

Pro extrakci čisté mitochondriální DNA podle (Tamura and Aotsuka, 1988) jsem použila roztoky, jejichž složení je uvedeno v Tabulce 3.

**Tabulka 3:** Složení roztoků pro extrakci mtDNA

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

Kromě roztoku NaOH+SDS a Tris-HCl pufru byly všechny roztoky před začátkem extrakce vyklávané.

Vlastní extrakce probíhala dle následujícího protokolu:

1. Do 1,5ml mikroskopické kumavky bylo dáno 50 mg jedinců a přidáno 500 µl vychlazeného homogenizačního pufru. Pomocí sterilního homogenizátoru byla vytvořena suspenze, do které bylo přidáno dalších 500 µl vychlazeného homogenizačního pufru.
2. Mikroskopická kumavka se suspenzí byla centrifugována jednu minutu při 12 000 g 4°C. Supernatant byl přenesen do nové 1,5ml mikroskopické kumavky a centrifugován deset minut při 12 000 g 4°C.
3. Supernatant byl vylit a pelet byl rozsuspendován v 50 µl pufru Tris-EDTA.
4. Bylo přidáno 100 µl čerstvě připraveného roztoku NaOH+SDS. Směs byla mírně zvortexována. Mikroskopická kumavka byla ponechána 5 minut na ledu.
5. Bylo přidáno 75 µl ledově vychlazené směsi octanu draselného. Směs byla opět lehce zvortexována a nechána stát 5 minut na ledu.

6. Směs byla centrifugována pět minut při 12 000 g 4°C. Supernatant byl odsát a bylo přidáno stejné množství směsi fenol-chloroform-isopropylalkoholu. Vše bylo řádně zvortexováno.
7. Směs byla centrifugována dvě minuty při 12 000 g při pokojové teplotě. Vodní fáze byla přenesena do čisté mikrozkušavky a byly přidány dva objemy absolutního etanolu.
8. Směs byla zvortexována a v pokojové teplotě ponechána stát 15 minut.
9. Směs byla opět centrifugována při 12 000 g a pokojové teplotě.
10. Byl přidán 1 ml 70% etanolu a obsah mikrozkušavky byl mírně zvortexován, poté byl vzorek vysušen ve vakuové centrifuze Eppendorf Concentrator 5310 v pokojové teplotě.
11. Nakonec bylo přidáno 50 µl Tris-HCl roztoku a 1 µl RNázy. Takto vyizolovaná mitochondriální DNA byla uchovávána v -20°C.

### 3.3 Primery

Pro amplifikaci jednotlivých úseků mitochondriálního genomu byly použity jednak primery převzaté z prací Simon *et al.* (1994, 2006) a Folmer *et al.* (1994), jednak byly navrženy z dostupných sekvencí mšice *Schizaphis graminum* (mšice obilná; NC\_006158), phylloxery *Dactuloshaira vitifoliae* (mšička révokaz, DQ021446) nebo mšice *Acyrtosiphon pisum* (kyjatka hrachová, FJ4111411) a posléze i z námi osekvenovaných úseků (tzv. primer walking).

**Tabulka 4:** Primery použité pro amplifikaci mtDNA.

Pozice primeru je určena číslem, které se vztahuje k sekvenci *Drosophila yakuba*.

Název primeru	Sekvence primeru 5'→3'	Směr
LCO <sup>1</sup> 1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	F
AdelCytbF1 <sup>6</sup>	TATGTATTACCATGAGGACAAATATCA	F
N5-J-7077 <sup>2</sup>	TTAAATCCTTWGARTAAAAYCC	F
AphidCO2-f1 <sup>4</sup>	CAATGCTCAGAAATTTGTGG	F
12Safor1 <sup>5</sup>	TTTCATACAAGTCCTCAAT	F
AdelCOIIF1 <sup>3</sup>	GCAGAAACCAATGCAATGAAC	F
N1-J-12585b <sup>2</sup>	GGACCCTTACGAAATTGAACATAACCT	F
AdelLCOend-for <sup>5</sup>	ACATATAGCAGGAATTCATCA	F

AdelCytBf2 <sup>5</sup>	GCAAATCCAATAATTACTCC	F
SR-J-14233 <sup>2</sup>	AAGAGCGACGGGCGATGTGT	F
HCO 2198 <sup>1</sup>	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	R
AdelCytbR1 <sup>6</sup>	AAAAATATCATTCTGGTTGAATATGA	R
N5-N-7793 <sup>2</sup>	TTAGGTTGRGATGGNYTAGG	R
12Sarev1 <sup>5</sup>	TTGGCAGAAAATAAATGTGTT	R
AphidCO3rev <sup>4</sup>	TTGGTGGTCAATTTAATCCTA	R
SR-N-14745b <sup>2</sup>	CCAGCAGYYGCGGTTATAC	R
AdelATP8rev1 <sup>5</sup>	GTTTATTGGTGATATTTGTGG	R
LR-N-13398 <sup>2</sup>	CGCCTGTTTAACAAAAACAT	R
AdelCOIR1 <sup>3</sup>	CGTCCRGGGAATTGCATCTATT	R

<sup>1</sup> Folmer et al., 1994

<sup>2</sup> Simon et al., 1994, 2006

<sup>3</sup> Havill et al., 2006a

<sup>4</sup> navrženy podle získaných sekvencí, Žurovcová (nepublikováno)

<sup>5</sup> navrženy podle získaných sekvencí *D. prelli*, Žurovcová a Kuřátková (nepublikováno)

<sup>6</sup> Havill et al., 2006b

### 3.4 PCR

Požadované fragmenty DNA byly amplifikovány pomocí metody polymerasové řetězové reakce. K tomuto účelu byly použity termocykléry Eppendorf Master Cycler a Bioer XP Cycler.

Jedna PCR reakce měla objem 12,5 µl a obsahovala tyto složky (dle návodu TaKaRa Ex *Taq*): 7,075-7,7µl ddH<sub>2</sub>O, 1,25 µl 10x Buffer, 1,0 µl dNTP (2,5mM od každého), 0,75 µl primer forward (5µM), 0,75 µl primer reverse (5µM), 1,0 µl templátové DNA (100 ng/µl), 0,05-0,625 µl polymeráza.

Při optimalizaci PCR reakce byly použity následující polymerázy: TaKaRa Ex *Taq*, TaKaRa LA *Taq*, LA DNA polymerases Mix (Top-Bio s.r.o.), *Taq* DNA polymerasa Unis (Top-Bio s.r.o.), Combi PPP Master Mix (Top-Bio s.r.o.). Podle potřeby byly přidávány enhancer BSA (bovine serum albumin, Fermentas) nebo různé koncentrace MgCl<sub>2</sub>. Reakce byly míchány na ledu a polymeráza byla přidávána jako poslední složka.

Standardní PCR profil se skládal z těchto kroků: úvodní denaturace 2 minuty při 94°C, pak následovalo 35-40 cyklů 94°C 1 minuta, 47-55°C 30-45 sekund, 68-72°C 45 sekund-2 minuty, nakonec probíhala závěrečná elongace při 72°C 2 minuty.

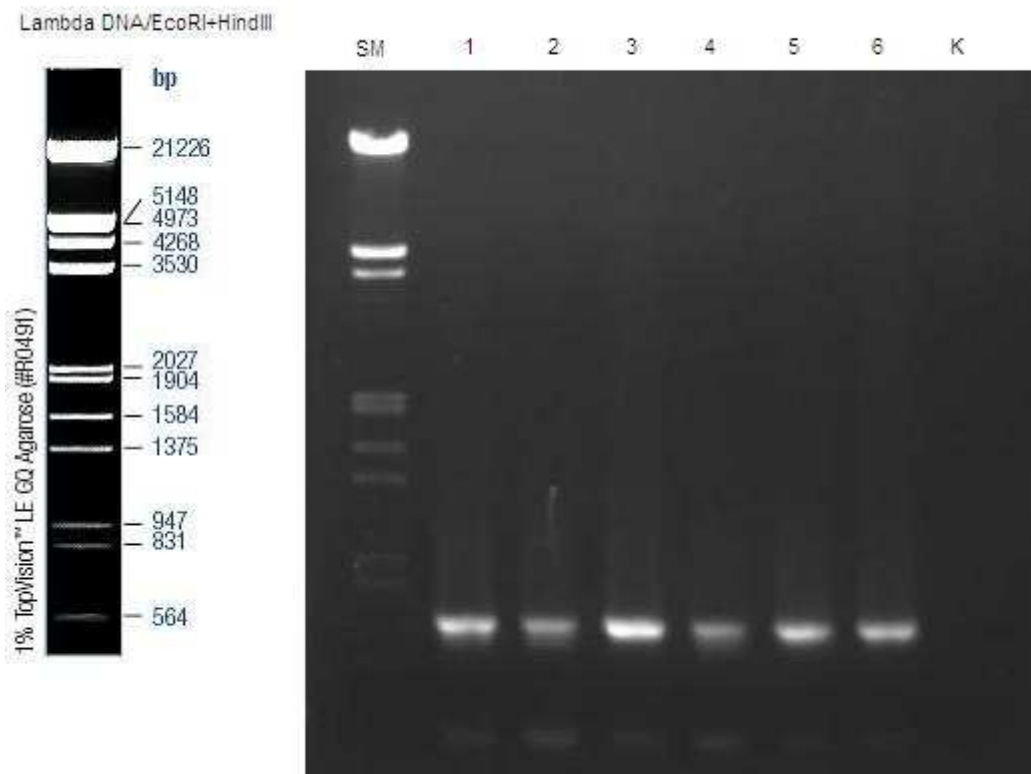


V případě, že požadovaný fragment nevycházel standardním PCR profilem ani po změně annealingové teploty, přidání různých enhancerů nebo zvýšení koncentrace  $MgCl_2$ , bylo použito tzv. „step-up“ PCR. „Step-up“ PCR profil vypadá takto: počáteční denaturace 94°C po 2 minuty, poté 5-7 cyklů: denaturace 30 sekund na 94°C, annealing 30-45 sekund na 37°C, elongace 45 sekund-2 minuty na 68°C, poté následuje 30 cyklů za následujících podmínek: denaturace 30 sekund na 94°C, annealing 30-45 sekund na 47-55°C, elongace 45 sekund-2 minuty na 72°C. Závěrečná elongace trvá 2 minuty při 72°C.

### **3.5 Gelová elektroforesa**

PCR produkt byl kontrolován elektroforeticky na 1% agarózovém gelu. Gel byl připraven z agarózy (SeaKem<sup>®</sup> LE Agarose (Cambrex)) a 1x TAE pufru (zásobní roztok 50x TAE pufr: 242 g Tris, 57,1 ml ledové kyseliny octové, 100 ml EDTA, do 1 litru doplnit  $dH_2O$ , pH 8,0). Směs agarózy a 1x TAE pufru byla rozpuštěna v mikrovlnné troubě. Po zchlazení gelu na přibližně 45°C do něj bylo přidáno 10  $\mu$ l ethidiumbromidu (5  $\mu$ g/ml) na 100 ml gelu a gel byl následně nalit do připravené vaničky s hřebínky. Tuhnutí gelu probíhalo při pokojové teplotě přibližně 45 minut. Na připravený gel byly nanášeny 3  $\mu$ l PCR produktu promíchány s 2,5  $\mu$ l nanášecího pufru (300  $\mu$ l 100% glycerol, 700  $\mu$ l  $ddH_2O$ , 0,5 mg bromfenolové modři).

Elektroforesa standardně probíhala při pokojové teplotě a napětí 120 V. Poté byla DNA vizualizována na UV transluminátoru (White/Ultraviolet Transilluminator). Velikost fragmentů byla odhadnuta pomocí velikostního markeru Lambda DNA/EcoRI+HindIII (Fermentas). Na obrázku 2. je fotografie úspěšné PCR.



**Obrázek 2.** Elektroforeogram úspěšné PCR. Použity primery LCO 1490 a HCO 2198. SM – velikostní marker Lambda DNA/EcoRI+HindIII, 1-6 vzorky *D. prelli*, K – kontrolní reakce bez DNA.

### 3.6 Purifikace DNA

Pro přečištění PCR produktu jsem používala následující dvě metody. Enzymatické čištění jsem uplatnila u PCR produktů o vysoké koncentraci a čistotě. Čištění pomocí sloupečku jsem použila u PCR produktů slabších, kde bylo nutno dosáhnout sekvenovatelného množství DNA pomocí PCR reakce o velkém objemu (obvykle 50  $\mu$ l) a následném „zkonzentrování“ použitím menšího elučního objemu v posledním kroku.

#### 3.6.1 DNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research)

Tato metoda byla provedena podle návodu výrobce

### 3.6.2 Přečištění pomocí ExoSAP-IT<sup>®</sup> (USB; Dugan *et al.*, 2002)

K přečištění byla použita směs enzymů ExoSAP-IT<sup>®</sup> (USB). Do 10  $\mu$ l PCR reakce bylo na ledu přidáno 1,5  $\mu$ l směsi ExoSAP. Následně probíhala v termocykléru inkubace vzorku 30 minut na 37°C a 15 minut na 87°C. Produkt byl poté použit pro sekvenci a zamražen.

## 3.7 Sekvenace DNA

Sekvenační reakce byla míchána pomocí kitu BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Na jednu sekvenční reakci o objemu 10  $\mu$ l byly použity tyto složky: 1,5  $\mu$ l 5x sekvenačního pufru, 0,5  $\mu$ l primeru (5 $\mu$ M), 1  $\mu$ l sekvenční směsi, 1-3  $\mu$ l přečištěného PCR produktu (podle koncentrace DNA), ddH<sub>2</sub>O do celkového objemu 10  $\mu$ l.

Směs byla dána do termocykléru na následující program: úvodní denaturace 2 minuty na 96°C, pak 25 cyklů: denaturace 15 sekund na 96°C, annealing 20 sekund na 50°C, elongace 4 minuty na 60°C.

### 3.7.1 Přečištění Sephadexem

Sephadex<sup>®</sup> G-50 Superfine (Sigma-Aldrich) byl ponechán hydratovat v poměru 0,025 g Sephadexu : 400  $\mu$ l MilliQ H<sub>2</sub>O na jeden vzorek. Hydratace probíhala minimálně 45 minut při 4°C.

Ze 100 $\mu$ l aerosolových špiček byly vyrobeny sloupečky tak, že byla špička seříznuta asi 0,5 cm pod filtrem, poté byly sloupečky dány do 0,5ml mikrozkupek. Na takto připravený sloupeček bylo nanášeno 150  $\mu$ l řádně promíchané suspenze Sephadexu. Voda byla protlačena dudlíkem a vylita z mikrozkupek. Tento krok byl ještě jednou opakován. Na sloupeček bylo nanášeno 100  $\mu$ l řádně promíchané suspenze Sephadexu a sloupeček byl stočen v centrifuzi při 1000 g 2 minuty. Voda z mikrozkupek byla vylita a na sloupeček byl nanášen PCR produkt a centrifugován při 1000 g 2 minuty. Přečištěná sekvenční reakce byla vysušena ve vakuové centrifuzi Eppendorf Concentrator 5310 při pokojové teplotě (asi 30 minut).

### 3.7.2 Zpracování sekvenční reakce

Hotová sekvenční reakce byla zpracována na přístroji ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems) v laboratoři genomiky na Ústavu molekulární biologie rostlin, BC AV ČR.

### 3.8 Zpracování sekvencí

Sekvence byly pro kontrolu identifikovány pomocí databáze NCBI BlastSearch (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). V programu SeqManII z programového balíku DNASTAR ver. 4.0 (DNASTAR, Inc.) byly vytvořeny konsenzuální sekvence. Alignmenty byly vytvořeny metodou ClustalW v programu Mega verze 4 (Tamura et al., 2007), podle potřeby byly dále upraveny.

Statistika sekvencí byla provedena z kódujících sekvencí pomocí programu Mega verze 4. Dendrogram byl vytvořen pomocí modelu Kimura-2-parametr (použita volba „Pairwise deletion“, bootstrap 2000 opakování). Jako outgroup pro zakořenění dendrogramu byla použita molice *Aleurodicus dugesii* (Aleyrodidae, Hemiptera).

Transferové RNA byly analyzovány pomocí programu tRNAscan-SE (Lowe and Eddy, 1997) s nastavením cove score cutoff = 1 a tRNA Isotype prediction: Invertebrate Mito. Proterin kódující sekvence byly identifikovány pomocí programu DOGMA (Wyman et al., 2004). V případě neúspěchu uvedených programů byly sekvence porovnány s údaji phylloxery *D. vitifoliae* a mšic *S. graminum* a *A. pisum*.

## **4. VÝSLEDKY**

### **4.1 Uchovávání vzorků**

Vzorky před extrakcí byly uchovávány buď ve 100% etanolu, nebo byly hluboce zmražené (-82°C). Ze vzorků z etanolu se nepodařilo úspěšně vyextrahovat DNA, proto byly již na začátku práce plně nahrazeny mraženým materiálem.

### **4.2 Izolace DNA**

Izolaci DNA jsem prováděla pěti různými metodami. Z počátku byly používány komerční kity a „Squishing buffer“, v závěrečné fázi jsem použila extrakci čisté mtDNA.

Nejnižší výtěžnost při následné PCR amplifikaci měla extrakce pomocí „Squishing buffer“.

Extrakce čisté mtDNA a pomocí komerčních kitů byly naopak úspěšné. Pomocí DNA získané při použití těchto metod jsem dosahovala ve všech případech velmi podobných výsledků.

### **4.3 Mitochondriální genom**

#### **4.3.1 Jednotlivé fragmenty**

Pomocí různých kombinací primerů jsem získala úseky dlouhé 0,5 kbp – 2 kbp. K sekvenci jsem dávala ty z nich, které byly dle předpokladu správně velké a neměly žádné přidružené fragmenty. Podmínky amplifikace jednotlivých úseků jsou uvedeny v Tabulce 5. Těchto 10 úseků bylo oboustranně osekvenováno.

**Tabulka 5:** Podmínky amplifikace jednotlivých úseků

Úsek	Část genu/genů	Primery	Annealing		Elongace		BSA ano/ne	Polymeráza
			teplota	čas	teplota	čas		
1	COX1	LCO 1490	47°C	35 s	72°C	45 s	ano	LA
		HCO 2198						
2	Cytb	AdelCytbF1	50°C	45 s	72°C	45 s	ne	Ex <i>Taq</i>
		AdelCytbR1						
3	16S rRNA	N1-J-12585b	51°C	45 s	72°C	1 min	ne	Ex <i>Taq</i>
		LR-N-13398						
4	COX2	AdelCOIIF1	55°C	45 s	68°C	1 min 30 s	ano	Unis
		AdelATP8rev1						
5	12S rRNA, 16S rRNA	12Safor1	51°C	45 s	68°C	2 min	ano	LA
		SR-N-14745b						
6	ATP8, ATP6, COX2	AphidCO2-f1	51°C	30 s	68°C	1 min 30 s	ano	LA
		AphidCO3rev						
7	Cytb, ND1	AdelCytbfor2	53°C	45 s	68°C	2 min	ne	LA
		12Sarev1						
8	ND5	N5-J-7077	53°C	45 s	72°C	1 min 30 s	ano	Ex <i>Taq</i>
		N5-N-7793						
9	COX1, COX2	AdelLCOend-for	53°C	40 s	72°C	1 min 30 s	ano	LA
		AdelATP8rev1						
10	12S rRNA	SR-J-14233	55°C	35 s	72°C	1 min 30 s	ano	Unis
		SR-N-14745b						

#### 4.3.2 Mitochondriální genom

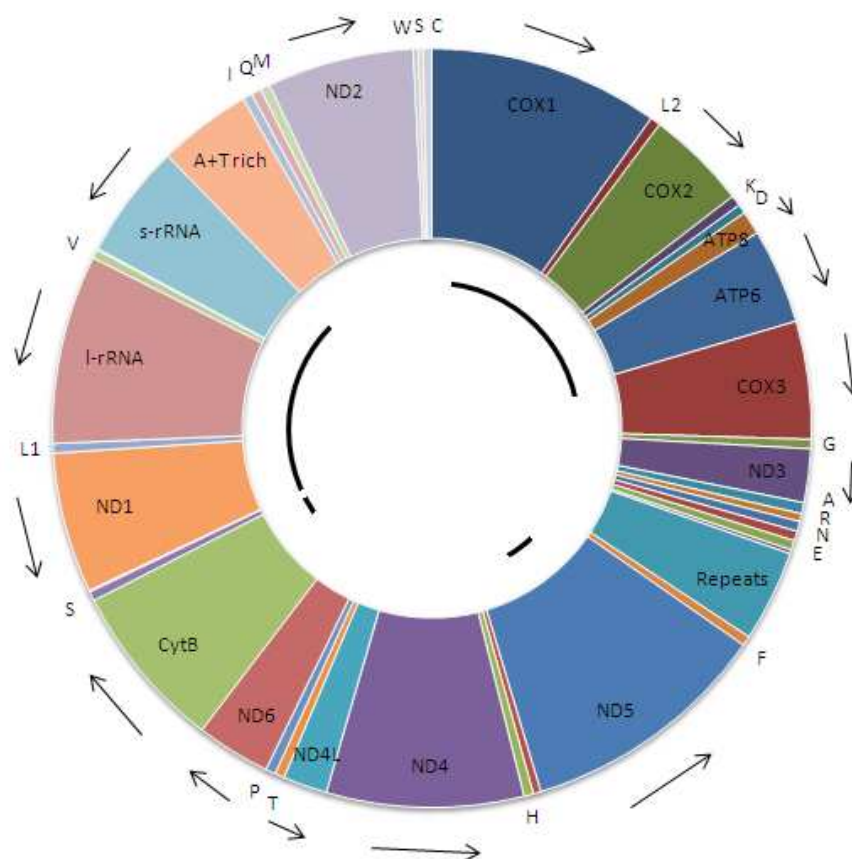
Z předpokládaného počtu 15 kbp se nám podařilo osekvenovat celkem 7258 bp. Získané sekvence jsou ve dvou větších fragmentech dlouhých 3624 bp a 2556 bp a dvou menších zahrnujících pouze kousky jednotlivých genů (711 bp a 394 bp), poloha všech našich fragmentů na genomu *S. graminum* je zakreslená na obrázku 3. V těchto úsecích jsme identifikovali 5 genů pro transferovou RNA, 2 geny pro ribozomální RNA a 8 genů kódujících proteiny. Na hlavním (tzv. J-strand) řetězci je kódováno 10 genů (COX1, COX2, COX3, ATP8, ATP6, Cytb, tRNA-Leu, tRNA-Asp, tRNA-Lys, tRNA-Ser). Na vedlejším (tzv. N-strand) řetězci je kódováno zbylých 5 genů (ND1, ND5, 12S rRNA, 16S rRNA, tRNA-Val). Pořadí jednotlivých genů, délka námi osekvenovaného fragmentu daného genu a pozice na J/N řetězci je v Tabulce 6.

**Tabulka 6:** Pořadí jednotlivých genů, délka námi osekvenovaného fragmentu daného genu a pozice na J/N řetězci.

Gen	Začátek	Konec	Délka	J/N
Fragment 1				
COX1 nc	1	1506	1506	J
tRNA-Leu	1537	1603	66	J
COX2	1607	2280	673	J
tRNA-Lys	2282	2355	73	J
tRNA-Asp	2418	2482	64	J
ATP8	2474	2642	168	J
ATP6	2629	3277	648	J
COX3 nc	3304	3624	320	J
Fragment 2				
ND5 nc	394	1	394	N
Fragment 3				
<i>Cytb nc</i>	1	711	711	J
Fragment 4				
tRNA-Ser	1	67	67	J
ND1	594	75	519	N
16S rRNA	1899	616	1283	N
tRNA-Val	1957	1894	63	N
12S rRNA nc	2556	1961	595	N

Obsah nukleotidů A+T v námi osekvenovaných fragmentech je 82,4 % (A 40%, C 10,4 %, G 7,2 %, T 42,4 %). V genech kódujících protein je obsah A + T 83,2 %, v tRNA 85,7 % a 84,2 % v rRNA. Obsah nukleotidů pro jednotlivé geny je v Tabulce 7, 8 a 9.

Obsah nukleotidů A + T je v sekvenci mšice *S. graminum* 85,4 % z celkového počtu 15 721 bp, v sekvenci mšice *A. pisum* je také 85,4 % z celkového počtu 16 971 bp a u phylloxery *D. vitifoliae* je 84,9 % z doposud osekvenovaných 12 349 bp. Obsah nukleotidů v genech pro jednotlivé referenční druhy mšic je v Příloze 1, 2 a 3.



**Obrázek 3:** Poloha námi osekvenovaných fragmentů na genomu *S. graminum*

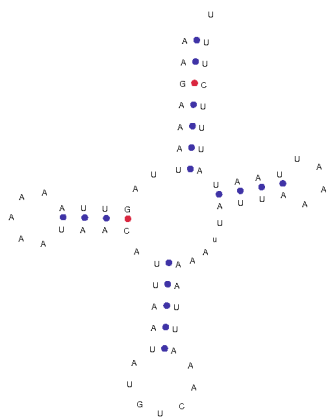
#### 4.3.2.1 tRNA

V získaných sekvencích jsme pomocí programu tRNAscan-SE (Lowe and Eddy, 1997) identifikovali 5 tRNA. Díky tomuto programu jsme také mohli určit předpokládanou sekundární strukturu a uspořádání do „trojlístkové“ struktury (viz Obrázek 4). Nukleotidové složení a antikodony jednotlivých tRNA jsou v Tabulce 7.

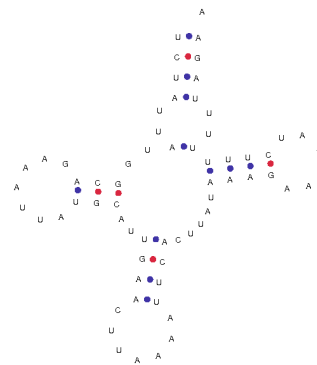
**Tabulka 7:** Nukleotidové složení jednotlivých tRNA a antikodony

tRNA	frekvence nukleotidů (%)				antikodon
	T (U)	C	A	G	
Leu	37	10,6	40,9	10,6	TAA
Lys	31,5	12,3	43,8	12,3	CTT
Asp	39,1	4,7	51,6	4,7	GTC
Ser	40,3	6	49,3	4,5	TGA
Val	44,4	6,3	41,3	7,9	TAC

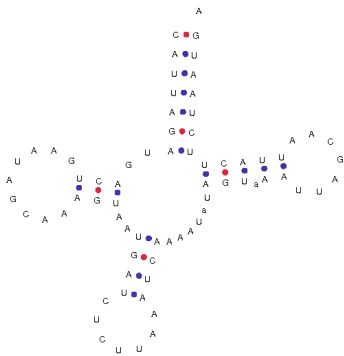




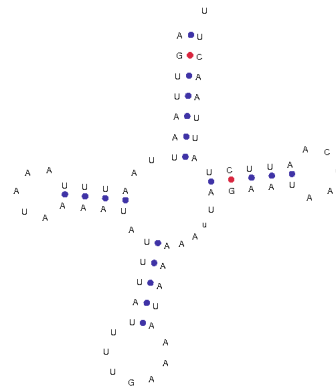
Asp



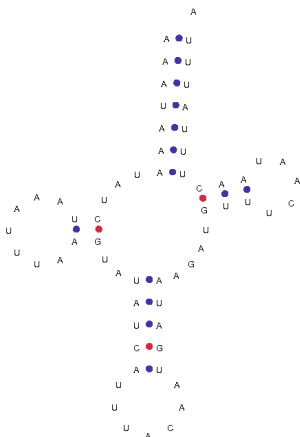
Leu



Lys



Ser



Val

**Obrázek 4:** Sekundární struktura tRNA (program tRNAscan-SE, Lowe and Eddy, 1997), antikodony jsou na „větvi“ orientované směrem dolů

#### 4.3.2.2 Geny kódující proteiny

Pomocí programu DOGMA (Wyman et al., 2004) bylo identifikováno osm genů kódující proteiny. Průměrný obsah A + T v námi osekvenovaných kódujících sekvencích je 83,16 %. Nukleotidové složení, iniciační a terminační kodony jednotlivých genů jsou v Tabulce 8.

**Tabulka 8:** Nukleotidové složení, iniciační a terminační kodony jednotlivých kódujících genů

Geny	Frekvence nukleotidů (%)				Iniciační kodon	Terminační kodon
	T (U)	C	A	G		
COX1	39,8	13,2	36,8	10,2	nc	TAA
COX2	40,3	10,7	41,7	7,3	ATA	TAA
COX3	41,7	10,1	43,1	5,2	ATG	nc
ATP6	44,4	11,7	39	4,8	ATA	TAA
ATP8	44,6	10,1	44,6	0,6	ATA	TAA
ND1	32,6	10,2	53	4,2	ATG	TAG
ND5	28,4	9,6	52,8	9,1	nc	nc
<i>Cytb</i>	45,8	10,5	36,7	7	nc	TAA
Průměr	39,7	10,7625	43,4625	6,05		

nc – neúplná sekvence

#### 4.3.2.3 Ribozomální RNA

Pomocí programu DOGMA (Wyman et al., 2004) a porovnáním se sekvencemi referenčních druhů jsme v námi získaných sekvencích identifikovali 2 geny pro ribozomální RNA, jeden pro velkou ribozomální podjednotku, druhý pro malou ribozomální podjednotku. Průměrný obsah A + T je 84,2 %. Nukleotidové složení genů je v Tabulce 9.

**Tabulka 9:** Nukleotidové složení genů rRNA

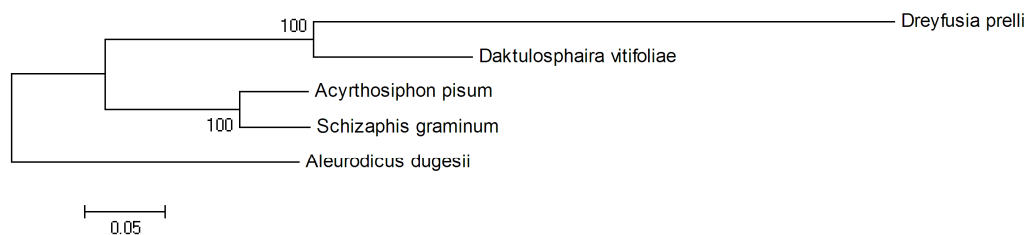
Geny	Frekvence nukleotidů (%)			
	T(U)	C	A	G
12S rRNA	43,3	7,1	39,1	10,5
16S rRNA	47,5	4,4	38,5	9,7
Průměr	45,4	5,75	38,8	10,1

#### 4.4 Mezidruhové srovnání *D. prelli* s příbuznými druhy

Z kódujících sekvencí byl vytvořen fylogenetický strom, který byl zakořeněn pomocí molice *Aleurodicus dugesii* (GenBank NC\_005939), která je nejbližším příbuzným druhem s osekvenovaným celým mitochondriálním genomem. Průměrné mezidruhové genetické vzdálenosti jsou uvedeny v Tabulce 10.

**Tabulka 10:** Průměrné mezidruhové genetické vzdálenosti

	<i>D. prelli</i>	<i>A. pisum</i>	<i>S. graminum</i>	<i>D. vitifoliae</i>
<i>D. prelli</i>		0.003	0.003	0.003
<i>A. pisum</i>	0.631		0.003	0.004
<i>S. gaminum</i>	0.631	0.086		0.004
<i>D. vitifoliae</i>	0.459	0.337	0.341	



**Obrázek 5:** Fylogenetický strom z kódujících oblastí (Neighbour-Joining, Kimura-2-parametr, Pairwise deletion, Bootstrap 2000x)

## **5. DISKUZE**

### **5.1 Uchovávání vzorků**

Ze vzorků uchovávaných před extrakcí ve 100% etanolu nebyla DNA úspěšně vyextrahována. Důvodem je pravděpodobně pronikání etanolu měkkými tkáněmi a tím urychlenou degradaci DNA.

### **5.2 Izolace DNA**

Bylo vyzkoušeno pět různých postupů izolace DNA. Izolací pomocí „Squishing buffer“ a komerčními kity jsme vyizolovali nejen mitochondriální, ale i jadernou DNA. Některé fragmenty se však ani po opakovaných pokusech nedařilo pomocí takto získané DNA úspěšně naamplifikovat a proto jsem v závěrečné fázi použila extrakci čisté mtDNA.

Extrakce pomocí „Squishing buffer“ byla nejméně úspěšná a takto vyextrahovaná DNA podléhala rychlé degradaci, proto nebyla vhodná pro další práci a bylo od ní ustoupeno. Při porovnání PCR produktů na gelu podle Lambda DNA/EcoRI HindIII Marker, jsem nezaznamenala mezi DNA vyextrahovanou pomocí různých kitů žádný rozdíl.

Podobně jako v předchozím případě nebyl zaznamenán rozdíl ani mezi čistou mitochondriální DNA a DNA vyizolovanou pomocí kitů. Důvodem by mohl být fakt, že mitochondriální DNA byla extrahována na úplném konci práce a nebyl čas pro její dostatečné prověření.

### **5.3 Vliv různých podmínek na účinnost PCR amplifikace**

Pro amplifikaci jednotlivých fragmentů byly zkoušeny různé podmínky. Základní PCR protokol byl bez použití BSA a pomocí Unis polymerázy. V případě neúspěšné amplifikace byly nejdříve změněny teplotní podmínky PCR reakce. BSA a různé koncentrace  $MgCl_2$  byly do reakce přidávány až v případě opakovaného

neúspěchu. V případě BSA bylo velmi často dosaženo lepších výsledků, ale změna koncentrace  $MgCl_2$  ke zlepšení nevedla.

Stejně jako BSA a  $MgCl_2$  byly pro optimalizaci reakce použity různé polymerázy. TaKaRa Ex *Taq*, TaKaRa LA *Taq*, LA DNA polymerases Mix mají lepší „proof-readingovou“ aktivitu (schopnost opravit chyby zařazením špatného nukleotidu během PCR amplifikace). TaKaRa LA *Taq* je mimo jiné speciálně vyvinuta pro tzv. „long PCR“ (PCR fragmentů delších než 15 kbp). Polymerázy s „proof-readingovou“ aktivitou se velmi často uplatnily u delších fragmentů. Combi PPP Master Mix byla zkoušena v případě, že žádná z výše uvedených polymeráz nebyla úspěšná. Tato směs kromě *Taq* polymerázy obsahuje protilátku, která zabraňuje zahájení nespecifické amplifikace před první denaturací, během níž se pak inaktivuje (jde o systém tzv. „hot-start“ PCR). Ani s touto polymerázou však nikdy nebylo dosaženo kladného výsledku.

## 5.4 Mitochondriální genom *D. prelli*

V současnosti není znám žádný kompletní mitochondriální genom mšice korovnice, v našem projektu jde tedy o první sekvenci z dané skupiny. Mšice *S. graminum* a *A. pisum* (*Aphididae*) a phylloxera *D. vitifoliae* (*Phylloxeridae*) byly vybrány, protože jsme chtěli zjistit jejich vzájemný fylogenetický vztah s *D. prelli* a zároveň jsou to jediné mšice, které mají zcela nebo alespoň částečně osekvenován mitochondriální genom.

### 5.4.1 Popis mitochondriálního genomu *D. prelli*

Podářilo se nám úspěšně naamplifikovat cca 50% z odhadované velikosti mitochondriálního genomu *D. prelli*. Protože předpokládáme, že nejbližším příbuzným *D. prelli* bude phylloxera *D. vitifoliae*, byly osekvenované fragmenty v případě potřeby porovnávány v první řadě s ní.

Zjistili jsme, že pořadí námi osekvenovaných genů je stejné jako u *D. vitifoliae*, *S. graminum* i *A. pisum*. Jedinou výjimkou je tRNA-Leu 1, která u všech příbuzných druhů leží mezi velkou a malou podjednotkou rRNA, ale u *D. prelli* nebyla v těchto místech nalezena.

Kromě genu ND1, který je u *D. prelli* o téměř polovinu kratší, jsou všechny celé námi osekvenované geny v podstatě stejně dlouhé.

Byly zjištěny celkem 4 přesahy, kdy do sebe zasahovaly čtecí rámce různých genů. U členovců se tento jev objevuje poměrně často (Boore, 1999) a *D. prelli* v tomto není výjimkou.

#### 5.4.2 tRNA

Při srovnání sekvencí tRNA *D. prelli* a příbuzných druhů byla zjištěná největší variabilita u tRNA-Leu (31,51 %) a nejnižší u tRNA Lys (5,48 %). Hodnoty variability tRNA jsou uvedeny v Tabulce 11.

**Tabulka 11:** Hodnoty variability tRNA v %

tRNA	Leu	Asp	Lys	Ser	Val
Počet variabilních míst v %	31,51	19,7	5,48	30,99	6,06

Není zcela jasné, zda je mezi 16S rRNA a 12S rRNA tRNA-Leu 1. Program tRNAscan-SE v daném fragmentu tRNA-Leu identifikoval, ale míra věrohodnosti byla velmi nízká. Při následném hledání této tRNA v celém fragmentu, byla její sekvence nalezena ve čtecím rámci 12S rRNA, což se nám nezdálo být věrohodné. Přesuny tRNA v mitochondriálním genomu jsou velmi časté a proto očekáváme, že tRNA bude nalezena v některém úseku, který se nám nepodařilo osekvenovat (Lang et al., 2004, Simon et al., 1994).

Při porovnání vzdálenosti tRNA-Lys a tRNA-Asp příbuzných mšic a *D. prelli*, bylo zjištěno, že u *D. prelli* vzdálenost mezi těmito dvěma tRNA je 63 bp, zatímco u všech ostatních porovnávaných navazují tyto tRNA přímo na sebe.

#### 5.4.3 Protein kódující geny

Podařilo se nám osekvenovat 4 geny celé a 4 geny částečně. Jejich pořadí je shodné s pořadím genů příbuzných druhů (Příloha 4).

Tam, kde to bylo možné, jsme určili iniciační a terminační kodony. Iniciační kodony byly u 3 genů ATA (COX2, ATP6, ATP8) a u dvou genů ATG (COX3, ND1). Terminační kodony 5 genů byly TAA (COX1, COX2, ATP6, Cytb, ATP8) a u jednoho

genu byl TAG (ND1). Při porovnání iniciačních a terminačních kodonů *D. prelli* s příbuznými mšicemi byly zjištěny tyto odchylky: *S. graminum* má iniciační kodon genu ATP6 ATT a terminační kodon genu Cytb TAG. U genu ND1 se *S. graminum* a *A. pisum* shodují v iniciačním kodonu ATT, *D. vitifoliae* má ATA a *D. prelli* jako jediná ATG. Terminační kodony téhož genu jsou u *S. graminum* a *A. pisum* TAA a u *D. vitifoliae* a *D. prelli* TAG. Těmito kodony obvykle začínají (iniciační kodony) nebo končí (terminační kodony) mitochondriální geny mnoho buněčných bezobratlých živočichů (Boore, 1999).

Zjistili jsme, že gen ND1 je u *D. prelli* výrazně kratší. Jeho délka je 519 bp, zatímco u *S. graminum* je 936 bp, u *A. pisum* také 936 bp a u *D. vitifoliae* 939 bp. Při porovnání sekvence celého contigu zahrnujícího geny ND1, 16S rRNA, tRNA-Val a 12S rRNA se sekvencemi genu ND1 ostatních mšic jsem zjistila, že tento gen by mohl i v případě *D. prelli* být stejně dlouhý, ale s neobvyklým překryvem 400 bp. Tuto hypotézu se mi podařilo vyvrátit, protože před iniciačním kodonem genu ND1 *D. prelli* se vyskytuje stop kodon. Další možnost, proč je tento gen kratší, byla, že se nám podařilo osekvenovat pseudogen genu ND1. Nicméně pravděpodobnost takového vysvětlení také není vysoká, protože jeden z primerů, kterým byl použit pro amplifikaci tohoto genu, leží v sousedním Cytb a tím pádem by pseudogen naamplifikován být neměl. Zda je skutečně tento gen kratší budeme s jistotou vědět, až se nám podaří dosekvenovat celý genom *D. prelli*.

#### **5.4.4 Ribozomální RNA**

Identifikovali jsme obě předpokládané rRNA. Jsou v pořadí 16S rRNA, 12S rRNA, odděluje je od sebe tRNA-Val. Před 16S rRNA nebyla nalezena tRNA-Leu a tímto se také liší od příbuzných druhů.

#### **5.4.5 A+T oblast a oblast „repeats“**

PCR produkt předpokládané velikosti se nám podařilo úspěšně naamplifikovat a osekvenovat. Po vložení sekvence do databáze BLAST, však nebyla identifikována jako A+T oblast. Po ručním překontrolování se nám podařilo v oblasti 12S rRNA nalézt sekvenci primeru, kterým byla tato oblast naamplifikována, ale zbytek sekvence byl

k 12S rRNA nekompatibilní. Znamená to, že buď došlo k amplifikaci nespecifického produktu, nebo v důsledku vysokého obsahu nukleotidů A a T, které se navíc objevují v repetitích, jsou tyto oblasti velmi těžko amplifikovatelné. Tato oblast je problematické u celé řady druhů. neboť při nahlédnutí do databáze lze zjistit, že A+T oblast v publikovaných sekvencích často chybí. Obdobná situace nastala i při amplifikaci specifické oblasti „repeats“, která i v sekvenci mitochondriálního genomu *D. vitifoliae* chybí právě oblast „repeats“ včetně přiléhajících genů.

### 5.5 Mezidruhové srovnání *D. prelli* s příbuznými druhy

Fylogenetický strom byl vytvořen pouze z kódujících sekvencí. Zakořeněn byl pomocí molice *Aleurodicus dugesii*, která byla vybrána na základě práce Thao et al., 2004. V místech, kde nám chyběla sekvence, byla nahrazena řadou „N“. Vyhodnocení fylogenetického stromu bylo provedeno pomocí Kimura-2-parametr, protože tato metoda bere ohled na různou délku sekvencí, na transverzní a tranziční substituce.

Výsledkem naší analýzy je, že *D. prelli* je nejbližší příbuzná *D. vitifoliae* a tím se potvrdil náš předpoklad, že mšice *S. graminum* a *A. pisum* budou fylogeneticky vzdálenějšími druhy.

Při porovnání pořadí genů *Aleurodicus dugesii*, *Schizaphis graminum*, *Acyrtosiphon pisum*, *Daktulosphaira vitifoliae* a *Dreyfusia prelli* jsme našli zajímavé přestavby. V genomu *A. dugesii* došlo k přesunu tRNA-Ser2 mezi tRNA-Asp a tRNA-Glu. tRNA-Gln v jejím genomu chybí úplně. tRNA-Cys a tRNA-Tyr jsou vůči *A. pisum* a *S. graminum* v opačném pořadí. V genomu *S. graminum* nebyla tRNA-Ser2 vůbec nalezena. U *A. pisum* se vyskytují dva geny pro tRNA-Met, první je na obvyklém místě mezi tRNA-Gln a ND2 a druhý leží mezi 12S rRNA a tRNA-Ile. *D. vitifoliae* nemá gen pro tRNA-S2, ale vzhledem k jejímu neúplnému genomu nemůžeme určit, zda skutečně zcela chybí (jako u *S. graminum*), nebo se přesunul na jiné místo. U *D. prelli* jsme nenalezli gen pro tRNA-Leu na obvyklém místě. Zatím ale nemůžeme rozhodnout, zda v genomu chybí úplně, nebo se vyskytuje na jiném místě mitochondriálního genomu. Pořadí zbylých osekvenovaných genů odpovídá pořadí genů *S. graminum*, *A. pisum* i *D. vitifoliae*.



## 6. ZÁVĚR

Získali jsme přibližně 50 % mitochondriálního genomu *D. prelli*. Identifikovali jsme v něm celkem 15 genů – 5 pro tRNA, 8 pro kódování proteinů a 2 pro ribozomální podjednotky RNA. Pozice těchto genů se shodují se zjištěným pořadím genů v mitochondriálních genomech příbuzných druhů *D. vitifoliae*, *S. graminum* a *A. pisum*. Zjistili jsme, že charakteristika ND1 genu je odlišná od téhož genu ostatních srovnávaných druhů. Na základě fylogenetické analýzy kódujících oblastí, jsme předběžně potvrdili náš předpoklad, že *Adelgidae* jsou zřejmě fylogeneticky bližší skupině *Phylloxeridae*, zatímco *Aphididae* jsou taxonem vzdálenějším.

## 7. LITERATURA

- Blackman R. L., Eastop V. F., 1994.** Aphids on the world's trees: An identification and information guide. *Wallingford, UK: CAB Int.* 987 pp.
- Boore J. L., Collins T. M., Stanton D., Deahler L. L., Brown W. M., 1995.** Deducing the pattern of arthropod phylogeny from mitochondrial DNA rearrangements. *Nature* 376 (6536): 163- 165
- Boore J. L., Brown W. M., 1998a.** Mitochondrial gene order as a phylogenetic tool. *Current Opinion in Genetics & Development* 8: 668-674
- Boore J. L., 1999.** Animal Mitochondrial Genomes *Nucleic Acids Research* . Vol. 27 No.8 1767-1780
- Boore J. L., Macey J. R., Medina M., 2005.** Sequencing and comparing whole mitochondrial genomes of animals. *Molecular Evolution* 395: 311-348
- Boore J. L., Lavrov D. V., Brown W. M., 1998.** Gene translocation links insects and crustaceans. *Nature* 392: 667-668
- Börner C.V., 1907.** Systematik und Biologie der Chermiden. *Zool. Anz.*, 32: 412-28
- Brand M. D., 1997.** Regulation analysis of energy metabolism. *J. Exp. Biol.* 200: 193-202
- Carapelli A., Lio P., Nardi F, van der Wath E., Frati F., 2007.** Phylogenetic analysis of mitochondrial proterin coding genes confirms the reciprocal paraphyly of Hexapoda and Crustacea. *BMC Evolutionary Biology* 7 (suppl 2): S8
- Carter C. I., 1971.** Conifer Woolly Aphids (Adelgidae) in Britain. *Her Majesty's Stationery Off.* 51pp.
- Caterino M. S., Cho S., Sperling F. A. H., 2000.** The current state of insect molecular systematics: A thriving tower of Babel. *Annu. Rev. Entomol.*, 45: 1-54
- Clay D. O., Wolstenholme D. R., 1985.** The mitochondrial DNA molecule of *Drosophila yakuba*: Nucleotide/ sequence, gene organisation and genetic code. *J. Mol. Evol.* 22: 252-271
- Clayton D. A., 1982.** Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28: 693-705
- Cook Ch. E., Yue Q., Akam M., 2005.** Mitochondrial genomes suggest that hexapods and crustaceans are mutually paraphyletic. *Proc. R. Soc. B* 272: 1295-1304

- Cook L. G., Gullan P. J., Trueman H. E., 2002.** A preliminary phylogeny of the scale insects (Hemiptera: Sternorrhyncha: Coccoidea) based on nuclear small- subunit ribosomal DNA. *Mol. Phylog. Evol.* 25: 43-52
- Crozier R. H., Crozier Y. C., 1993.** The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organisation. *Genetics* 133: 97-117
- de Bruijn M. H. L. , 1983.** *Drosophila melanogaster* mitochondrial DNA a novel organisation and genetic code. *Nature* 304: 234-241
- von Dohlen C. D., Moran N. A., 1995.** Molecular phylogeny of the Homoptera: a paraphyletic taxon. *Journal of molecular evolution* 41: 211-223
- Dugan K. A., Lawrence H. S., Hares D. R., Fisher C. L., Budowle B., 2002.** An Improved method for post-PCR purification for mtDNA sequence analysis. *Journal of Forensic Science* 47 (4): 811-8
- Eichhorn O., 1989.** On the life cycle (heterogony) and host alternation of the Conifer woolly aphids *Sacciphantes* spp. (Hom., Adelgidae). *J. Appl. Entomol* 108: 44-53
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R., 1994.** DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299
- Francke-Grossmann H., 1937a.** Ökologie und Schadwirkung von *Dreyfusia prelli* Grossman. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz* 47: 497-516
- Francke-Grossmann H., 1937b.** Zur Morphologie der Tannenlaus *Dreyfusia prelli* Grossman und Iber Galle auf *Picea orientalis* Lk. *Z. Pflanzenkrankh. Pflanzenschutz* 47: 465-482
- Gloor G. B., Preston C. R., Johnson-Schlitz D. M., Nassif N. A., Phillis R. W., Benz W. K., Robertson H. M., Engels W. R., 1993.** Type I repressors of P element mobility. *Genetics*, 135: 81-95
- Graeber M. B., Muller U., 1998.** Recent developments in the molecular genetics of mitochondrial disorders. *J. Neurol. Sci.* 153: 251-263

- Havill N. P., Foottit R. G., von Dohlen C., 2006a.** Evolution of host specialization in the Adelgidae (Insecta: Hemiptera) inferred from molecular phylogenetics. *Mol. Phylog. Evol.*
- Havill N. P., Montgomery M. E., Yu G., Shiyake S., Caccone A., 2006b.** Mitochondrial DNA from Hemlock Woolly Adelgid (Hemiptera: Adelgidae) suggests cryptic speciation and pinpoints the source of the introduction to Eastern North America. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 99(2): 195-203
- Havill N. P., Foottit R. G., 2007.** Biology and evolution of Adelgid. *Annual Review of Entomology* 57: 325-349
- Heie O. E., 1987.** Paleontology and phylogeny. In Aphids: Their biology, natural enemies and control, ed. *AK Minks, P. Harrewin* 367-391.
- Heie O. E., Wegierek P., 1998.** A list of fossil aphids (Homoptera, Aphidinea). *Ann Upper Silesian mus. (Entomol)* 8-9: 159-192
- Kambhampati S., Smith P. T., 1995.** PCR primers for amplification of four insect mitochondrial gene fragments. *Insect Molecular Biology* 4(4): 233-236
- Kapitola P., 2003.** Lesnické práce – Příloha
- Kroemer G., Dallaporta B., Resche-Rigon M., 1998.** The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60: 619-647
- Kokava S., 1961.** Distribution and phytostratigraphy of *Menyanthes* remains in Japan. *J. Biol. Osaka City Univ.* 12: 123-51
- Lampel G., 1968.** Die Biologie des Blattlaus – generationsvechsels, *Jena. VEB Gustav Fischer*
- Lang B. F., Lavrov D. V., Burger G., 2004.** Mitochondrial genome, Evolution. *Encyklopedia of biological chamistry*, volume 2.
- Loxdale H. D, Lushai G., 1998.** Molecular markers in entomology. *Bulletin of entomological research* 88: 577-600.
- Lowe T. M., Eddy S. R., 1997.** tRNAscan-SE: A program for improved detection of transfer RNA genes in genomic semence. *Nucleic Acids Res.* 25: 955-964
- Mitchell S. E., Cockburn A. F., Seawright J. A., 1993.** The mitochondrial genome of *Anopheles quadrimaculatus* species A: Complete nucleotide sequence and genome organisation. *Genome* 36: 1058-1073

- Powers T. O., Jensen S. G., Kindler S. D., Stryker C. J., Sandall L. J., 1989.** Mitochondrial DNA divergence among greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 82(3): 298-302
- Shadel G. S., Clayton D. A., 1997.** Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 409-435
- Simon Ch., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P., 1994.** Evolution, weighting, phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 651-701.
- Simon Ch., Buckley T. R., Frati F., Stewart J. B., Beckenbach A. T., 2006.** Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37: 545-579
- Steffan A. W., 1962.** Die eidonomischen und zytologischen Grundlagen bei der Entstehung anholozyklisch-parthenogenetischer Adelgidae-Species (Homoptera: Aphidina). *Z. Angew. Entomol.*, 65: 444-52
- Steffan A. W., 1963.** Zur systematischen und phylogenetischen Stellung der Agamospecies in den Adelgiden-Genera (Homoptera: Aphidoidea). *Verb. Dtsch. Zool. Gesell.*, 26: 640-55
- Steffan A. W., 1964.** Problems of the evolution and speciation in Adelgidae (Homoptera; Aphidoidea). *Can. Entomol.*, 96: 155-57
- Steffan A. W., 1972.** Unterordnung Aphidina, Blattläuse. In *Die Forstschädlinge Europas. Ein Handbuch in fünf Bänden*, ed. W Schwenke, pp. 162-386, *Hamburg: Parey*
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., 2007.** MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.*, 24: 1596-1599
- Tamura K., Aotsuka T., 1988.** Rapid Isolation Method of Animal Mitochondrial DNA by the Alkaline Lysis Procedure. *Biochemical Genetics*, Vol. 26, Nos. 11/12 815-819

- Thao M. L., Baumann L., Baumann P., 2004.** Organisation of the mitochondrial genomes of whiteflies, aphids and psyllids (Hemiptera, Sternorrhyncha). *BMC Evolutionary Biology* 4:25
- Vila M., Björklund M., 2004.** The Utility of the Neglected Mitochondrial Control Region of Evolutionary Studies in Lepidoptera (Insecta). *J. Mol. Evol.* 58:280-290
- Wei Y. H., 1998.** Oxidative stress and mitochondrial DNA mutations in human aging. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217: 53-63
- Wilson A. C., Cann R. L., Carr S. M., George M., Gullensten U. B., Helmbichowski K. M., Higuchy R. G., Palumbi S. R., Prager E. M., Sage R. D., Stoneking M., 1985.** Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biol. J. Lin. Soc.* 26: 375-400
- Wolstenholme D. R., 1992.** Animal mitochondrial DNA: Structure and Evolution. *International Review of Cytology* Vol. 141: 173-216
- Wyman S. K., Jansen R. K., Boore J. L., 2004.** Automatic annotation of organellar genomes with DOGMA. *Bioinformatics* 20(17): 3252-3255
- Zhang, D. X., Hewitt, G. M., 1997.** Insect Mitochondrial Control Region: A Review of its Structure, Evolution and Usefulness in Evolutionary Studies. *Biochem. Syst. Ecol.*, Vol 25, No. 2: 99-120.

## 8. PŘÍLOHY

**Příloha 1:** Nukleotidové složení mitochondriálního genomu mšice *S. graminum*

Gen	Frekvence nukleotidů (%)				Celkem bp
	T (U)	C	A	G	
COX1	41,5	13,3	34,4	10,8	1531
Leu	30,1	10,4	41,8	10,4	67
COX2	39,6	12,1	40,8	7,6	672
Lys	39,4	12,3	45,2	12,3	73
Asp	46,4	6,5	48,4	6,5	62
ATP8	42,3	12,5	44	1,2	168
ATP6	45,3	11,9	37,6	5,2	654
COX3	44	12,3	36,9	6,7	786
Gly	47,6	4,7	46,9	4,7	64
ND3	47,3	8,7	39,5	4,5	357
Ala	46,9	4,7	42,2	6,3	64
Arg	50	9,3	37	3,7	54
Asn	32,8	7,5	50,7	9	67
Glu	43,8	3,1	50,8	1,5	65
Phe	42,4	3	48,5	10,6	66
ND5	55,6	4,9	29,9	9,6	1671
His	34,4	0	44,4	7,9	63
ND4	55,7	4,9	29,3	10,1	1309
ND4L	55,3	3,8	33	7,9	291
Thr	41,9	3,2	53,2	4,8	62
Pro	42,9	6,1	42,4	9,1	66
ND6	46,1	6,9	42,2	4,8	495
CYTB	43,6	11	36,9	8,4	1116
Ser	38,7	3,1	46,2	4,6	65
ND1	53	5,7	31,5	9,8	936
Leu	37,3	3,1	36,9	12,3	65
16S rRNA	46,3	4,4	39,1	10,2	1259
Val	47,1	6,7	41,7	8,3	60
12S rRNA	42,7	5,9	41,4	10,1	766
Ile	47,7	7,8	40,6	17,2	64
Gln	44,6	4,5	36,4	12,1	66
Met	37,9	10,6	39,4	10,6	66
ND2	48,2	7,4	40,5	4	978
Trp	40,3	8,1	45,2	4,8	62

Ser	46,2	7,9	44,4	4,8	63
Cys	47	4,3	40,6	8,7	69
Tyr	43,3	4,5	43,3	11,9	67
Průměr	45,13913	5,556522	40,30435	8,808696	

**Příloha 2:** Nukleotidové složení mitochondriálního genomu mšice *A. pisum*

Gen	Frekvence nukleotidů (%)				Celkem
	T (U)	C	A	G	
COX1	41,7	13,3	34,7	10,3	1531
Leu2	38,2	8,8	42,6	10,3	68
COX2	40,6	11,5	40,3	7,6	672
Lys	30,1	12,3	45,2	12,3	73
Asp	42,9	6,3	42,9	7,9	63
ATP8	44,7	6,7	47,3	1,3	150
ATP6	43,5	13	38,4	5,1	648
COX3	43,5	11,5	38,7	6,4	786
Gly	42,9	4,8	47,6	4,8	63
ND3	48,5	7,8	39,2	4,5	357
Ala	43,8	4,7	45,3	6,3	64
Arg	38,8	9	46,3	6	67
Asn	35,5	7,7	47,7	9,2	65
Glu	46,9	3,1	48,4	1,6	64
Phe	40,4	3,1	46,2	10,8	65
ND5	55,5	5	30,5	8,9	1671
His	46	0	46	7,9	63
ND4	56,1	4,9	29,1	9,9	1309
ND4L	54	3,1	33,7	9,3	291
Thr	38,7	3,2	53,2	4,8	62
Pro	47	3	39,4	10,6	66
ND6	45,1	6,1	45,1	3,8	495
Cytb	43,7	11,3	37	8	1116
Ser	39,1	9,4	46,9	4,7	64
ND1	53,5	5,4	31,5	9,5	936
Leu1	46,2	3,1	38,5	12,3	65
16S rRNA	47,3	4,4	37,7	10,6	1259
Val	42,2	6,3	42,2	9,4	64
12S rRNA	43,5	5,7	40,4	10,3	767
Met	60	0	37,8	2,2	90
Ile	37,5	7,8	40,6	14,1	64
Gln	45,5	4,5	34,8	15,2	66



Met1	35,4	10,8	43,1	10,8	65
ND2	45,9	8	42,1	4	978
Trp	39,1	9,4	46,9	4,7	64
Ser 2	39,1	9,4	46,9	4,7	64
Cys	44,1	4,4	42,6	8,8	68
Tyr	40,9	4,5	40,9	13,6	66
Průměr	43,88	6,67	41,52	7,96	

**Příloha 3:** Nukleotidové složení genomu phylloxery *D. vitifoliae*

Gen	Frekvence nukleotidů (%)				Délka
	T (U)	C	A	G	
His	46,9	0	43,8	9,4	64
ND4	56,4	5,2	28,9	9,5	1314
ND4L	51,7	4,1	34,4	9,9	294
Thr	44,6	3,1	47,7	4,6	65
Pro	42,9	4,3	41,4	11,4	70
ND6	47,4	6,7	41,7	4,3	492
CytB	45	10,5	36,4	8,1	1113
Ser	41,8	4,5	49,3	4,5	67
ND1	52,9	5,5	31	10,5	939
Leu 1	41,5	3,1	44,6	10,8	65
16S	47,8	4,6	37,8	9,9	1269
Val	43,8	6,3	43,8	6,3	64
12S	43,7	6,1	40,7	9,4	766
Ile	40,9	6,1	37,9	15,2	66
Gln	43,9	3	40,9	12,1	66
Met	39,4	12,1	39,4	9,1	66
ND2	47	8	40,5	4,5	984
Trp	38,8	7,5	49,3	4,5	67
Cys	45,2	4,1	43,8	6,8	73
Tyr	44,8	4,5	37,3	13,4	67
COX1	40,6	12,5	36,5	10,4	1533
Leu2	39,4	10,6	39,4	10,6	66
COX2	39,4	11,3	41,5	7,7	672
Lys	31,1	12,3	43,8	12,3	73
Asp	37,9	4,5	53	4,5	66
ATP8	46,8	7,6	43,9	1,8	171
ATP6	43,9	11,5	39,6	4,9	651
COX3	43,1	10,8	40,2	5,9	408
Průměr	43,89286	6,8	41,01786	8,296429	

**Příloha 4:** Porovnání pořadí mitochondriálních genů *Aleurodicus dugesii*, *Schizaphis graminum*, *Acyrtosiphon pisum*, *Dreyfusia prelli*. Překřížené linky znázorňují přesunuté lokusy.

*A. dugesii*

COX1 L2 COX2 K D ATP8 ATP6 COX3 G ND3 A R N S2 E F- ND5- H- ND4- ND4L- T P- ND6 CYTB S ND1- L- RNL- V- RNS- I M ND2 W Y- C-

*S. graminum*

COX1 L2 COX2 K D ATP8 ATP6 COX3 G ND3 A R N E F- ND5- H- ND4- ND4L- T P- ND6 CYTB S ND1- L- RNL- V- RNS- I Q- M ND2 W C- Y-

*A. pisum*

COX1 L2 COX2 K D ATP8 ATP6 COX3 G ND3 A R N E F- ND5- H- ND4- ND4L- T P- ND6 CYTB S ND1- L- RNL- V- RNS- M I Q- M ND2 W S2 C- Y-

*D. vitifoliae*

COX1 L2 COX2 K D ATP8 ATP6 COX3 G ND3 A R N E F- ND5- H- ND4- ND4L- T P- ND6 CYTB S ND1- L- RNL- V- RNS- I Q- M ND2 W C- Y-

*D. prelli*

COX1 L2 COX2 K D ATP8 ATP6 COX3 G ND3 A R N E F- ND5- H- ND4- ND4L- T P- ND6 CYTB S ND1- L- RNL- V- RNS- I Q- M ND2 W S2 C- Y-