

NYUGAT-MAGYARORSZÁGI EGYETEM
ERDŐMÉRNÖKI KAR
ERDŐMŰVELÉSI ÉS ERDŐVÉDELMI INTÉZET

Eredics Attila

TRYPODENDRON FAJOK
(Coleoptera, Curculionidae, Scolytinae)
FILOGENETIKAI
ÖSSZEHASONLÍTÁSA

Konzulens:

Dr. Lakatos Ferenc
egyetmi tanár

Sopron
2007

Tartalomjegyzék

I.	Bevezetés.....	2
II.	A vizsgált <i>Trypodendron</i> fajok jellemzése.....	3
III.	Anyagok és módszerek.....	6
1.	A DNS kivonása.....	7
2.	A DNS megsokszorozása (PCR).....	7
3.	Szekvenálás és elemzés.....	9
IV.	Filogenetikai analízis.....	10
1.	Fajon belüli változatosság.....	11
2.	Rokonsági kapcsolatok.....	13
3.	Fajok közötti változatosság.....	16
V.	Összefoglalás.....	17
VI.	Köszönetnyilvánítás.....	18
VII.	Felhasznált irodalom.....	19
VIII.	Melléklet.....	20
1.	M. Aminosav kódtábla.....	20
2.	M. Fajok közötti változatosság.....	21
3.	M. Törzsfák.....	23

I. Bevezetés

Munkám célja a Magyarországon előforduló három fában költő szúfaj, a *Trypodendron domesticum*, *T. signatum*, és a *T. lineatum* rokonsági kapcsolatainak genetikai módszerekkel történő felderítése volt.

A nemzetség az egész világon összesen 24 fajt tartalmaz, ebből mindössze négy faj fordul elő Európában: *Trypodendron domesticum* (Linnaeus, 1758), *Trypodendron signatum* (Fabricius, 1787), *Trypodendron lineatum* (Olivier, 1795), *Trypodendron laeve* (Eggers, 1939). A *T. laeve* tápnövénye főleg *Picea excelsa*, és mivel meglehetősen ritka faj, ezért nem szerepel a vizsgálatban [1].

A fában költő szúfajok fontosak erdészeti szempontból, mert tömegszaporodásra hajlamosak. Elszaporodásuknak nagyon kedvez a száraz, aszályos időjárás, a légköri szennyezés vagy a hirtelen bekövetkező abiotikus károsodások (pl. széltörés) és mechanikai sérülések okozta gyengültségi állapot. Ha nem történnek időben megfelelő ellenintézkedések, nagy károkat tudnak okozni. Emellett jelentős vektor szerepük van az *Ambrosia* gombák terjesztésében [3].

A vizsgálatok során a három *Trypodendron* faj összesen 27 egyedének genetikai vizsgálatát végeztem el. A filogenetikai elemzésnél kulcsoportként az *Ips typographus* három egyedének genetikai adatait használtam. Mivel bizonyos egyedek eltérő földrajzi területről származtak, így lehetővé vált a fajon belüli változatosság vizsgálata a földrajzi hely függvényében is.

II. A vizsgált *Trypodendron* fajok jellemzése

A *Trypodendron* (Stephens, 1830) nemzetség az ízeltlábúak törzsébe (*Arthropoda*), a rovarok osztályába (*Insecta*), bogarak rendjébe (*Coleoptera*) és az újabb rendszertani besorolás szerint az ormányosok családján (*Curculionidae*) belül a szúbogarak alcsaládjába (*Scolytinae*) tartozik. Korábbi szinonim nevük *Xyloterus* (Erichson, 1836).

A vizsgált *Trypodendron* fajok közös jellemzője, hogy a fában költő szúk közé tartoznak, vagyis meneteiket a fatestbe rágják, ellentétben a kéregben költő szúkkal, mert ezeknek a menetei a kéreg alatt futnak.

A fában költő szúknál az anyamenet egyenesen behatol a fába, ahol később többé-kevésbé elágazik, általában az évgyűrűkkel párhuzamosan. A lárvák az anyamenetben fejlődnek, és általában nem, vagy csak kissé rágják a fát, helyette a járat falán növény *Ambrosia* gombát eszik. A gombát az anya hurcolja be az anyamenet rágásakor. A gomba behatol a faanyagba, és onnan vonja ki a számára szükséges ásványi anyagokat. A lárvák a gomba menetben fejlődő micéliumait eszik. A bábozódás a menetben történik, és a fiatal kifejlett bogarakra is rátapad a gomba, amikor a menetben mozognak.

Az imágóvá vedlés után a bogaraknak még szükségük van egy érési időszakra, mielőtt szaporodásra lennének képesek, ezért érési rágást végeznek, mialatt ivarszerveik teljesen kifejlődnek és energia tartalékot halmoznak fel [2,3].

A vizsgált három faj közül kettő él lombhullató fákon, a harmadik túlevelű fajokkal táplálkozik. A három fajt morfológiailag nehéz elkülöníteni, határozóbélyegek a csáp alakja és a szárnyfedő mintázata.

A *Trypodendron domesticum* (1-2. kép) elterjedési területe Európa és Ázsia, tápnövényei lombhullató fajok: *Acer* spp., *Alnus incana*, *A. glutinosa*, *Betula* spp., *Caragana* spp., *Carpinus betulus*, *Fagus* spp., *Fraxinus* spp., *Juglans regia*, *Morus alba*, *Prunus* spp., *Quercus* spp., *Robinia pseudoacacia*, *Sorbus* spp [4,5].



1-2. kép: *T. domesticum*. Foto: Maja Jurc [6]

A *Trypodendron signatum* (3-4. kép) elterjedési területe Európa és Ázsia, tápnövényei szintén lombos fajok: *Acer* spp., *Alnus hirsuta*, *A. siberica*, *Betula* spp., *Fagus* spp., *Fraxinus* spp., *Populus* spp., *Quercus* spp., *Tilia* spp., *Ulmus japonica*, *U. propinqua* [4,5].



3-4. kép: *T. signatum*. Foto: Maja Jurc [6]

A *Trypodendron lineatum* (5-6. kép) elterjedési területe Afrika, Ázsia, Európa és Észak Amerika. Tápnövényei tűlevelű fajok: *Picea* spp., *Abies* spp., *Cedrus* spp., *Larix* spp., *Pseudotsuga* spp. [4,5].



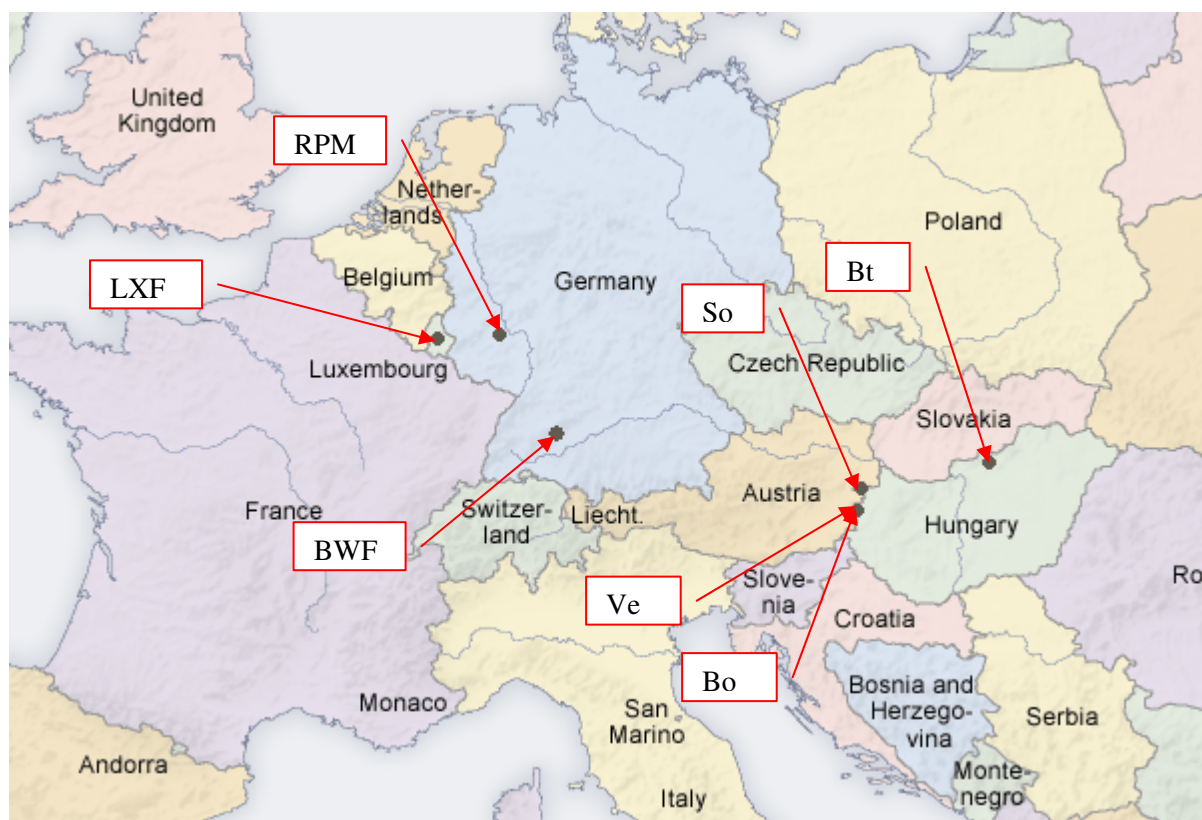
5-6. kép: *T. lineatum*. Foto: Maja Jurc [6]

III. Anyagok és módszerek

A vizsgált egyedek begyűjtése 2003 és 2007 között történt. A minták tárolása tömény etanolban történt a DNS épségének megőrzése érdekében. Az egyes bogarak a következő helyekről származnak:

Faj:	Hely:	Jel:	Darab:
<i>T. domesticum:</i>	Bátonyterenye	Bt	8 egyed
	Luxemburg	LXF	1 egyed
	Németország	BWF, RPM	2 egyed
<i>T. signatum:</i>	Sopron	So	3 egyed
	Bozsok	Bo	2 egyed
	Velem	Ve	3 egyed
<i>T. lineatum:</i>	Bátonyterenye	Bt	7 egyed
	Génbank (Európa)	AF	1 egyed
<i>Ips typographus:</i>	Sopron	So	3 egyed
Összesen:			30 egyed

A minták földrajzi származása az alábbi térképen látható:



A térkép forrása: Wikipedia [7]

A vizsgálatokhoz a mitokondriális DNS (mtDNS) egy szakaszát alkalmaztam, mivel a mtDNS-nek több előnye is van a sejtmag DNS-sel (sDNS) szemben. A mérete kisebb a sDNS-nél, mindössze 16-20 kb, és általában jobban megőrzi a génsorrendet és összetételt (12-13 fehérje kódoló gén). Emellett viszonylag nagyobb az evolúciós változási sebessége és csak anyai ágon öröklődik. Ebből adódóan jól használható evolúciós kapcsolatok felderítésére közeli rokon fajoknál is. Rovarokban a mtDNS evolúciós változási sebessége függ a származástól, az adott géntől és génen belüli helytől is, de átlagosan kétszer gyorsabb, mint a sDNS változási sebessége [8].

1. A DNS kivonása

A DNS kivonásához Sigma-Aldrich GenElute (Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit) DNS kivonó készletet használtam. A kivonás menete röviden összefoglalva a következő:

Az alkoholban tárolt mintákat desztillált vízben megmossuk, majd eppendorf csövekben egyenként a megfelelő homogenizációs puffer jelenlétében roncsoljuk a bogarakat. Ezután Proteináz-K (PK) enzimet adunk hozzá, és 55 °C-on legalább két óráig inkubáljuk, miközben időnként többször is összerázzuk a mintákat.

A fehérjék elroncsolása után a sejtekből kiszabadult DNS-t speciális szűrő és szűrőoldatok segítségével tisztítjuk. A kapott 50 μ l oldat tartalmazza mind a sejtmag DNS-t, mind a mitokondriális DNS-t. A DNS kivonás sikerességének ellenőrzésére 2 μ l-nyi mintát agaróz gélen elektroforézis segítségével megfuttatunk (kb. 15 perc, 90 mA). A sikeres DNS kivonást UV-fényben jól látható erőteljes sáv jelzi.

2. A DNS megsokszorozása (PCR)

A génsorrend meghatározásához nagy mennyiségű azonos DNS szakasz szükséges. Ezek előállítása a polimeráz-lánreakció (PCR, Polymerase Chain Reaction) segítségével történik.

A DNS szintézisét DNS polimeráz enzimek végzik. A polimeráz működéséhez egy, a szintetizálandó új szál szekvenciáját meghatározó, templát DNS szála, a szintézis kezdetét meghatározó primer oligonukleotidra, valamint a prekursor dezoxiribonukleotid-trifoszfát (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, röviden dNTP) molekulákra van szükség. A primerek azok az oligonukleotidok, melyek segítségével a szintézis helyét és irányát meghatározhatjuk.

A polimeráz láncreakciónál két oligonukleotid primer által behatárolt DNS szakaszt sokszorozunk meg egy hőstabil DNS polimeráz, és számos egymást követő szintézis ciklus segítségével. Egy ciklus három lépését a szálak szétválasztása (denaturálás), a primerek kötődése (annealing) és az új szálak bioszintézise adja (extension) adja [9].

A folyamat lejátszódásának szempontjából kritikus a ciklus egyes szakaszainak hőmérséklete és időtartama. A PCR-t Eppendorf Master Cycler Personal típusú automata PCR készülékkel végeztem. Az általam alkalmazott program (MIK 1) a következő volt:

1. T = 95 °C 5:00 min
2. T = 95 °C 0:30 min
3. T = 55 °C 1:00 min
4. T = 72 °C 1:00 min
5. GOTO 2 REPEAT 33
6. T = 72 °C 5:00 min
7. HOLD T = 22 °C

A PCR során a DNS mintához adott DNS polimeráz (Taq) enzim a primerek (Pat, Dick) által meghatározott DNS szakaszt másolja le. Az alkalmazott Pat és Dick primer a mtDNS-en található COI (citokrom-oxidáz I) gén mintegy 570 bp nagyságú darabját határozza meg.

A folyamat végén a kiválasztott DNS szakasz nagy mennyiségben van jelen a mintában, amely megfelelő tisztítás után már alkalmas a szekvenálás elvégzésére. A PCR sikerességét szintén ellenőriztem agaróz gélen elektroforézissel.

3. Szekvenálás és elemzés

A minták bázissorrendjének meghatározását a bécsi Universität für Bodenkultur (University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Department of Forest and Soil Sciences) egyetemen végezték el.

A minták kapott bázissorrendjét ClustalX [10] programmal egyenlített ki. A filogenetikai elemzések MEGA 2.1 [11] program segítségével készültek.

A filogenetikai analízis célja az evolúciós viszonyok, az evolúciós történet feltárása. Eredménye egy filogenetikai fa (törzsfa). A faépítő módszerek lehetnek távolság alapú és karakter alapú módszerek.

A távolság alapú módszer páronként távolságokat számít a szekvenciák között, majd ezekkel a távolságokkal dolgozik tovább, fákat levezetve belőlük. A szekvenciák közötti távolság egy határértéket ér el, ahogy a távolság nő. Ha egy pozícióban már történt mutáció, a további mutációk már nem teszik távolabbivá. A távolság alapú módszerek korrigálnak erre az effektusra [12].

UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic average): Úgy határozza meg az egyes csoportok közötti távolságot, hogy számítja a két csoport tagjainak összes bázispár közötti távolságok átlagát. Az eredmény olyan fán ábrázolható, ahol az elágazások két csoport vagy szekvencia között félúton vannak. A távolság két szekvencia között egyenlő az ágak hosszának összegével [8].

Neighbor Joining (NJ): Egy csillag alakú fából kiindulva a legközelebbi szomszédokat összekapcsolja, helyettesíti őket az átlagukkal, majd ezt ismételteti a teljes fa kialakulásáig.

Minimum Evolution (ME): A legrövidebb olyan fát találja meg, amely összeegyeztethető a szekvenciák közötti távolságokkal. (A faágak hossza evolúciós távolságnak felel meg, így két szekvencia távolsága a fa szerint számítható a megfelelő ágak hosszának összeadásával.)

A karakter alapú módszer (karakter = pozíció az összerendezésben) olyan fákat származtat le, amelyek mindegyik pozícióra optimalizálják az adatmintázatok eloszlását.

Maximum Parsimony (MP): "legnagyobb takarékoság" módszere: Olyan fát épít, ami a lehető legkevesebb mutációs eseménnyel magyarázza meg a meglévő szekvenciák létrejöttét. Számos azonos pontszámú fát szolgáltat, ezek közös részét vehetjük mint megbízhatót. Nagy távolságú szekvenciák esetében hátránya, hogy azonos bázis esetén azt tételezi fel, hogy nem történt mutáció, holott valószínűbb a visszacserélődés.

A kapott törzsfa megbízhatóságának tesztelése ún. "resampling" statisztikai módszerrel (boot-strapping) történt. Ennek lényege, hogy a meglévő adatokból véletlenszerűen mintákat veszünk, ezekre végezzük el a számítást, majd statisztikát készítünk [12].

A DNS-en létrejönnek olyan mutációk is, amelyek nem jelennek meg a fehérjékben a kódtábla degeneráltsága miatt, vagyis nem minden bázis megváltozása jár együtt a kódolt fehérje megváltozásával. Ezek a „csendes” mutációk nem biztos, hogy híven tükrözik az evolúció sebességét, mert nincsenek szelekciós nyomás alatt, mint a fehérjék. [13].

Az előbbieket figyelembevételével a különböző elemzéseket elvégeztem mind a bázissorrend, mind a kódolt fehérje szekvencia alapján. Az alkalmazott aminosav kódtáblát az 1.M. melléklet tartalmazza.

IV. Filogenetikai analízis

Az elemzett szekvenciák hossza 570 bp, amely 190 fehérje kódoló tripletnek felel meg. A szekvenciák változatosságát az alábbi táblázat foglalja össze:

	Nukleotid		Fehérje	
	bp	%	Triplet	%
Total	570	100,0	190	100,0
Conserved	444	77,9	146	76,8
Variable	126	22,1	39	20,5
Parsim-informative	115	20,2	35	18,4
Singleton	11	1,9	4	2,1
0-fold degenerate	372	65,3		
2-fold degenerate	96	16,8		
4-fold degenerate	70	12,3		

1. táblázat: az elemzett minták változatossága

A statisztikai elemzéseknél alkalmazott beállítások a következők voltak:

Gaps/Missing data : Complete Deletion

Codon Positions : 1st+2nd+3rd+Noncoding

Standard Error estimated by boot-strap method (Replications = 5000)

No. of Sites : 496 (nucleotide)

No. of Sites : 158 (amino)

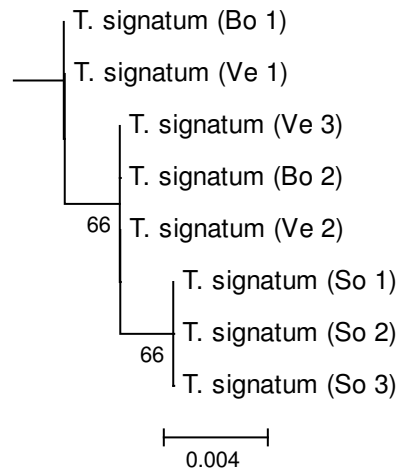
1. Fajon belüli változatosság

A nukleotid és fehérjesorrendből számított statisztikákat a 2. táblázat foglalja össze:

	Nukleotid							
	Number of differences		p-distance		Kimura 2-parameter		Kimura 2-parameter (Gamma)	
	Distance	Standard Error	Distance	Standard Error	Distance	Standard Error	Distance	Standard Error
T. domesticum	1,345	0,550	0,003	0,001	0,003	0,001	0,003	0,001
T. signatum	0,964	0,657	0,002	0,001	0,002	0,001	0,002	0,001
T. lineatum	9,143	1,824	0,018	0,004	0,019	0,004	0,020	0,004
	Fehérje							
	Number of differences		p-dist		Poisson correction		Gamma Model	
	Distance	Standard Error	Distance	Standard Error	Distance	Standard Error	Distance	Standard Error
T. domesticum	0,182	0,177	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
T. signatum	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
T. lineatum	2,000	0,668	0,013	0,004	0,013	0,004	0,013	0,005

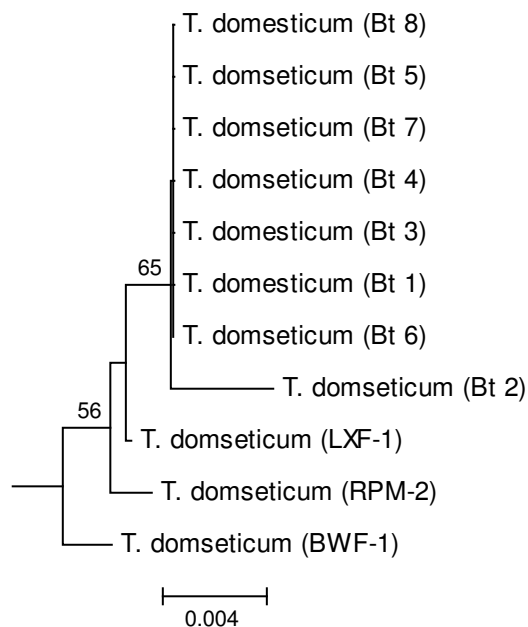
2. táblázat: A minták fajon belüli változatossága

A fajon belüli változatosság a *T. signatum* esetében nagyon alacsony, ennek oka, hogy a minták két földrajzilag közel fekvő területről származtak (Bozsok: Bo és Velem: Ve). A fajon belüli kapcsolatokat az 1. ábra mutatja.



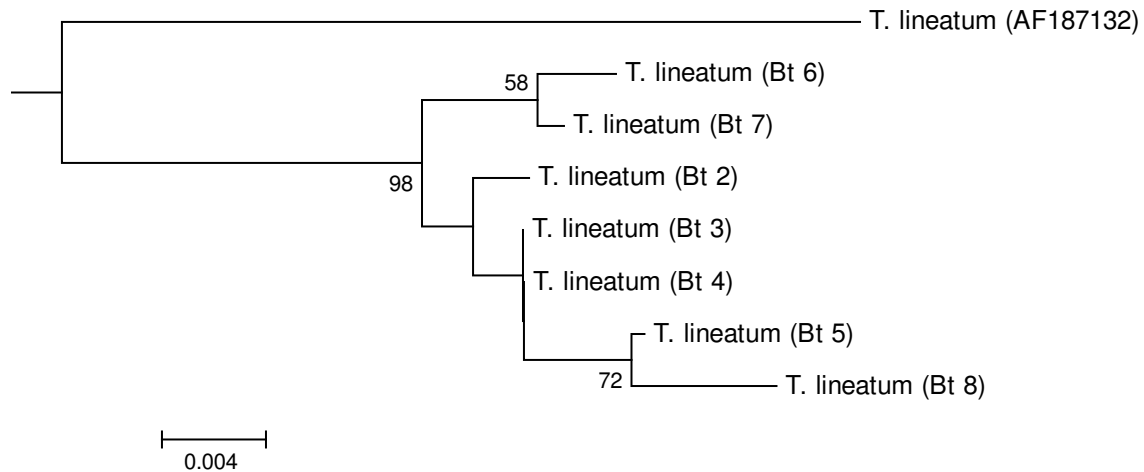
1. ábra: *T. signatum*. Neighbor-joining method, Kimura 2-parameter, 5000 boot-strap repetition

A *T. domesticum* esetében a fajon belüli változatosság már nagyobb, mert itt szerepelnek külföldi minták is (Németország: BWF-1, RPM-2, Luxemburg: LXF-1). De itt is megfigyelhető az azonos helyről származó minták nagyobb hasonlósága (2. ábra).



2. ábra: *T. domesticum*. Neighbor-joining method, Kimura 2-parameter, 5000 boot-strap repetition

A legnagyobb fajon belüli változatosságot a *T. lineatum* mutatja. Itt kiugró a génbankból származó minta (AF187132) különbözősége, de az azonos helyről származó mintákon belül is nagyobb a változatosság, mint a másik két faj esetében (3. ábra).



3. ábra: *T. lineatum*. Neigbor-joining method, Kimura 2-parameter, 5000 boot-strap repetition

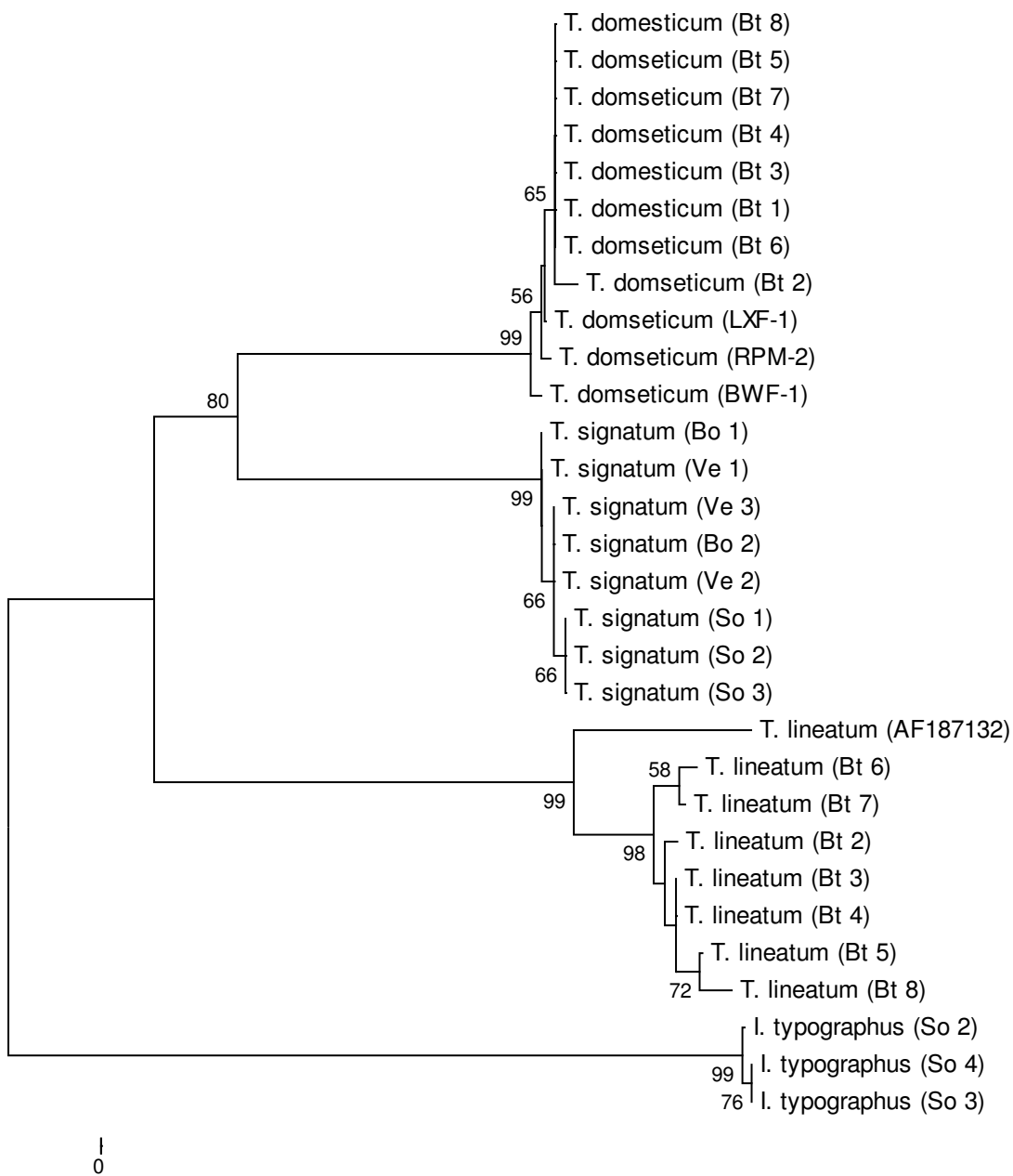
Az azonos genotípusú egyedek összevonhatók egy haplotípusba. Így a *T. signatum* fajon belül 3 haplotípust (So 1, Bo1, Bo2), a *T. domesticum* fajon belül 5 haplotípust (Bt 1, Bt 2, LXF, RPM, BWF) és a *T. lineatum* fajon belül 7 haplotípust (Bt 2, Bt3, Bt 5, Bt 6, Bt 7, Bt 8, AF) lehet elkülöníteni a vizsgált mintákból.

2. Rokonsági kapcsolatok

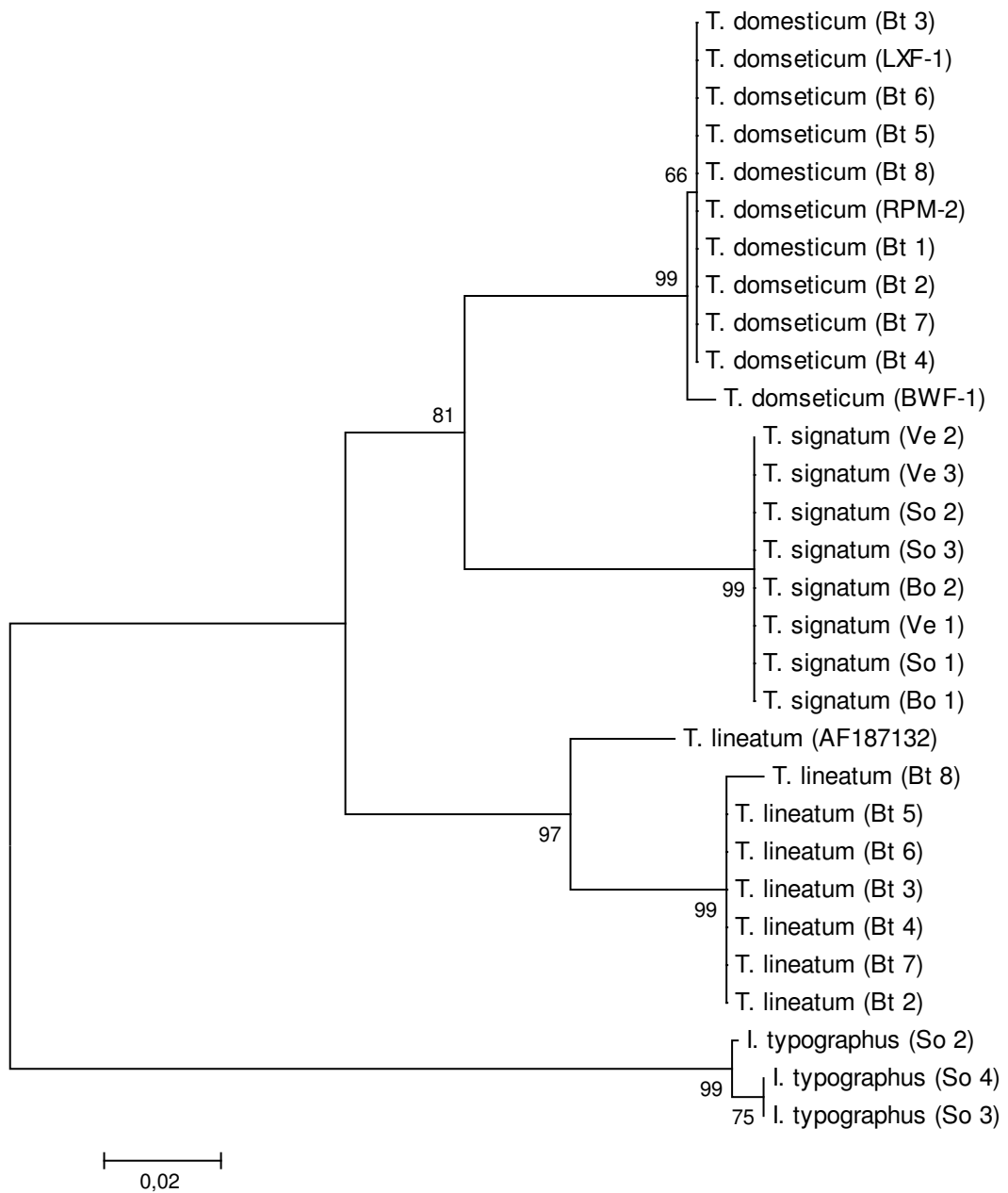
A különböző módszerekkel készített törzsfák mind hasonló szerkezetet mutatnak, közöttük szignifikáns különbség nincs. A különböző módszerekkel szerkesztett törzsfák a 3.M. mellékletben találhatóak.

Megállapítható, hogy a három faj közül a *T. domesticum* és a *T. signatum* áll közelebbi rokonsági kapcsolatban, míg a *T. lineatum* mindkettőtől nagyobb távolságra helyezkedik el a filogenetikai fán. Evolúciós szempontból nézve ez azt jelenti, hogy a törzsfajlás során először a *T. lineatum* vált el a *T. domesticum* és a *T. signatum* közös őseitől, és az utóbbi két faj különválása csak később történt meg.

A Neigbor-joining módszerrel szerkesztett törzsfák az alábbiakban találhatóak: 4. ábra: DNS szekvencia alapján, 5. ábra: Fehérje szekvencia alapján. A fehérje szekvencia alapján készített fák értelemszerűen kisebb különbségeket mutatnak.



4. ábra: DNS szekvencia alapján: Neighbor-joining method, Kimura 2-paraméter, 5000 boot-strap repetition



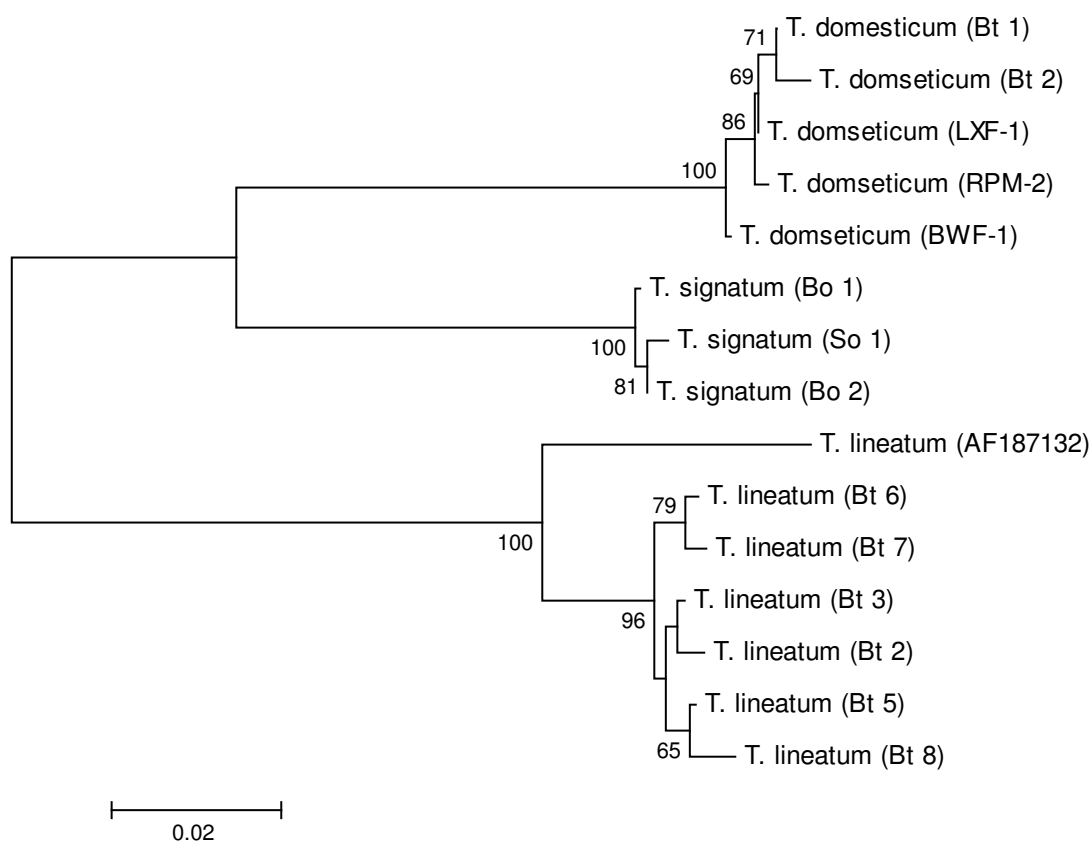
5. ábra: Fehérje szekvencia alapján: p-distance method, Kimura 2-parameter, 5000 boot-strap repetition

3. Fajok közötti változatosság

A fajok közötti változatosság vizsgálatát szintén elvégeztem különböző módszerekkel, az eredmények a 2.M. mellékletben találhatóak. Látszik, hogy a *T. domesticum* és a *T. signatum* hasonlít egymásra leginkább, míg a *T. lineatum* ezektől jobban különbözik. A legnagyobb távolság a *T. lineatum* és a *T. domesticum* között van (3. táblázat). Az egyes haplotípusok bevonásával számított törzsfá a 6. ábrán látható.

	T. domesticum	T. signatum	T. lineatum
T. domesticum		[0,016]	[0,021]
T. signatum	0,112		[0,020]
T. lineatum	0,173	0,159	

3. táblázat: A fajok közötti változatosság. (Nei-féle genetikai távolság, zárójelben a standard error értékei) Tamura-Nei method, 5000 boot-strap repetition, csak a haplotípusok alapján számítva

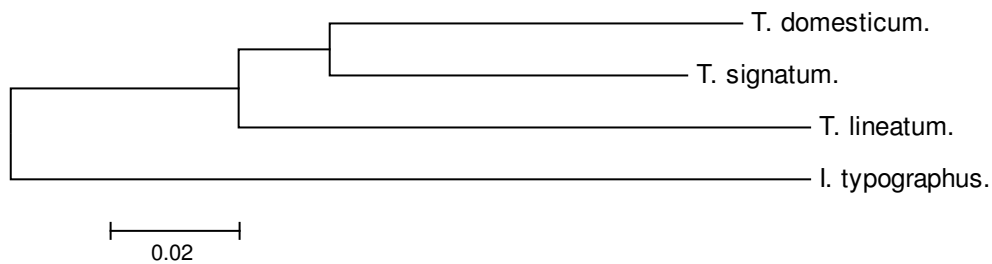


6. ábra: A haplotípusok alapján számított törzsfá. Neighbor-joinig, Tamura-Nei method, 5000 boot-strap repetition

V. Összefoglalás

A vizsgálatok során a három *Trypodendron* faj összesen 27 egyedének genetikai vizsgálatát végeztem el. A filogenetikai elemzésnél kulcsoportként az *Ips typographus* három egyedének genetikai adatait használtam. A vizsgálathoz a mintákból kivont mitokondriális DNS (mtDNS) COI génhelyéről származó 500 bp (bázispár) nagyságú DNS szakasz génszekvenciáját elemeztem.

Az elemzett mintákból egyértelműen megállapítható, hogy a három faj közül a *T. domesticum* és a *T. signatum* hasonlít egymásra leginkább, a Nei-féle genetikai távolságuk 0,112. A *T. lineatum* ezektől nagyobb mértékben különbözik. Az utóbbi fajnak a *T. signatum*-tól való genetikai távolsága 0,159 és *T. domesticum*-tól való genetikai távolsága 0,173. A fajok rokonsági kapcsolatát a 7. ábra mutatja.



7. ábra: A vizsgált fajok rokonsági kapcsolatai. Neighbor-joinig, Tamura-Nei method

Ez az eredmény egybeváág a különböző fajok életmódbeli különbségeivel is, mert a *T. domesticum* és a *T. signatum* lombos fajokon táplálkozik, ezzel szemben a *T. lineatum* tőlevelű fajokon fordul elő.

A törzsféjlődés során tehát feltételezhetően először a *T. lineatum* (illetve annak őse) vált el a *T. domesticum* - *T. signatum* fajcsoport ősétől, mert különböző tápnövényekhez alkalmazkodtak. A *T. domesticum* és a *T. signatum* különválása csak később kezdődött, és habár apró morfológiai különbségek vannak közöttük, mind az elterjedési területük, mind az életmódjuk nagy hasonlóságot mutat.

Annak érdekében, hogy az egyes fajokon belüli földrajzi változatosságot részletesebben lehessen elemezni, nagyobb számú és több különböző helyről származó minta feldolgozása lenne szükséges.

VI. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom konzulensemnek Dr. Lakatos Ferenc egyetemi tanárnak a dolgozatom elkészítésében nyújtott segítségéért és hasznos tanácsaiért.

Sopron, 2007. november 1.

Eredics Attila

VII. Felhasznált irodalom

1. Lakatos F., Eredics A., Kajimura H., Petercord R., Biegel T., Parini C., Knizek M., Arthofer W. and Stauffer C. (2007): Evolutionary background of the host switch of the European Trypodendron species (Curculionidae, Scolytinae). Natural enemies and other multi-scale influences on forest insects. Joint meeting of the IUFRO WPs: 7.03.05, 7.03.06 and 7.03.07. BOKU Vienna, 9-14 Sept 2007.
2. Francois Lieutier (ed.): Bark and Wood Boring Insects in Living Trees in Europe, a Synthesis. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht 2004.
3. Tóth József (ed.): Erdészeti rovartan. *Agroinform Kiadó*, Budapest, 1999.
4. Wood, S. L. & Bright, D. E. (1992): A catalog of Scolytidae and Platypodidae (Coleoptera), Part 2: taxonomic index. - Great Basin Naturalist Memoirs 13: 1-1553.
5. Pfeffer, A. (1995): Zentral- und westpaläarktische Borken- und Kernkäfer (Coleoptera: Scolytidae, Platypodidae). - Pro Entomologia, c/o Naturhistorisches Museum, Basel, 69 pp.
6. Photographer: Maja Jurc, University of Ljubljana, from the collection of Slovenian Museum of Natural History (<http://www.forestryimages.org>)
7. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f8/Europe_countries_map_en.png
8. Marjorie A. Hoy: Insect Molecular Genetics. *Academic Press*, San Diego, 1994.
9. Putnoky Péter: Molekuláris biológia Gyakorlati jegyzet – 2006. PTE TTK Genetikai és Molekuláris Biológiai Tanszék. (<http://www.bioinfo.pte.hu/bioinf.htm>)
10. ClustalX program: Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997)
11. Sudhir Kumar, Koichiro Tamura, Ingrid B. Jakobsen, and Masatoshi Nei (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA.
12. Szilágyi András: Bevezetés a bioinformatikába, Speciális kollégium és doktori iskolai kurzus (ELTE TTK, 2001/2002. tanév I. félév) (<http://www.enzim.hu/~szia/bioinformatika>)
13. Multiple Alignment and Phylogenetic Analysis (<http://cmgm.stanford.edu/classes/pdf/phylogenetic.pdf>)

VIII. Melléklet

1. M. Aminosav kódtábla

UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys
UUC	Phe	UCC	Ser	UAC	Tyr	UGC	Cys
UUA	Leu	UCA	Ser	UAA	***	UGA	<u>Trp</u>
UUG	Leu	UCG	Ser	UAG	***	UGG	Trp
CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg
CUC	Leu	CCC	Pro	CAC	His	CGC	Arg
CUA	Leu	CCA	Pro	CAA	Gln	CGA	Arg
CUG	Leu	CCG	Pro	CAG	Gln	CGG	Arg
AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser
AUC	Ile	ACC	Thr	AAC	Asn	AGC	Ser
AUA	<u>Met</u>	ACA	Thr	AAA	Lys	AGA	<u>Ser</u>
AUG	Met	ACG	Thr	AAG	Lys	AGG	<u>Ser</u>
GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly
GUC	Val	GCC	Ala	GAC	Asp	GGC	Gly
GUA	Val	GCA	Ala	GAA	Glu	GGA	Gly
GUG	Val	GCG	Ala	GAG	Glu	GGG	Gly

Code Table: Invertebrate Mitochondrial [11]

A fehérje szekvencia meghatározására alkalmazott kódtábla (gerinctelen mtDNS). A standard kódtáblától való eltéréseket aláhúzás jelöli.

2. *M. Fajok közötti változatosság*

(mean distance between groups)

d : Estimate

[S.E] : Standard error

[1] #T._domesticum
[2] #T._signatum
[3] #T._lineatum

a. Nucleotide: Number of differences

[Between group average] Standard Error estimated by boot-strap method (Replications = 5000 and random number seed = 83161)

	1	2	3
[1]		[6,354]	[7,439]
[2]	49,670		[7,298]
[3]	73,068	67,875	

b. Nucleotide: p-distance

[Between group average] Standard Error estimated by boot-strap method (Replications = 5000 and random number seed = 53380)

	1	2	3
[1]		[0,013]	[0,015]
[2]	0,100		[0,015]
[3]	0,147	0,137	

c. Nucleotide: Kimura 2-parameter

[Between group average] Standard Error estimated by boot-strap method (Replications = 5000 and random number seed = 33062)

	1	2	3
[1]		[0,015]	[0,019]
[2]	0,110		[0,018]
[3]	0,167	0,153	

d. Nucleotide: Kimura 2-parameter (Gamma)

[Between group average] Standard Error estimated by boot-strap method (Replications = 5000 and random number seed = 8970)

	1	2	3
[1]		[0,019]	[0,025]
[2]	0,122		[0,024]
[3]	0,191	0,173	

e. Amino: Number of differences

[Between group average] Standard Error estimated by boot-strap method (Replications = 5000 and random number seed = 48802)

	1	2	3
[1]		[3,465]	[3,932]
[2]	14,091		[4,021]
[3]	19,966	21,000	

f. Amino: p-distance

[Between group average] Standard Error estimated by boot-strap method (Replications = 5000 and random number seed = 67411)

[1		2		3]
[1]			[0,022			[0,025	
[2]	0,089					[0,026	
[3]	0,126	0,133					

g. Amino: Poisson correction

[Between group average] Standard Error estimated by boot-strap method (Replications = 5000 and random number seed = 98020)

[1		2		3]
[1]			[0,024			[0,029	
[2]	0,093					[0,030	
[3]	0,135	0,143					

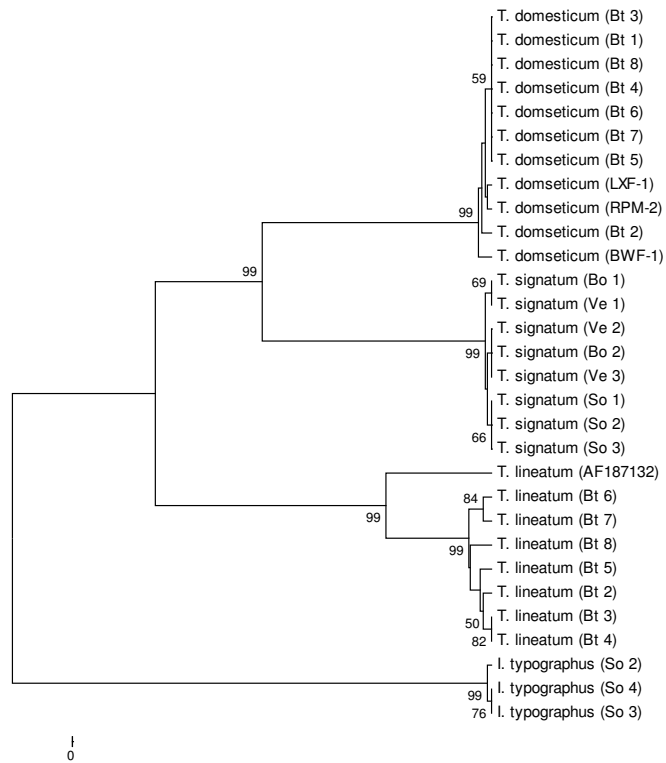
h. Amino: Gamma Model

[Between group average] Standard Error estimated by boot-strap method (Replications = 5000 and random number seed = 51256)

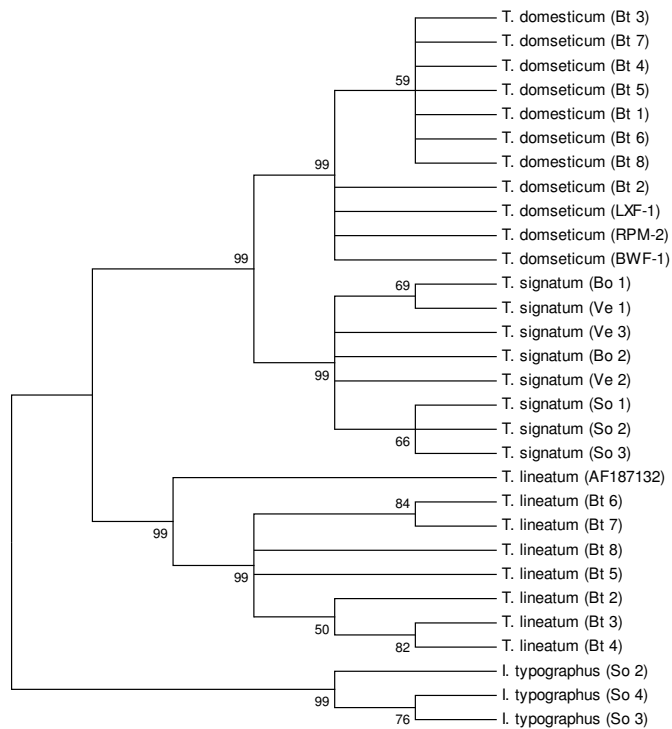
[1		2		3]
[1]			[0,027			[0,033	
[2]	0,098					[0,035	
[3]	0,145	0,153					

3. M. Törzsfák

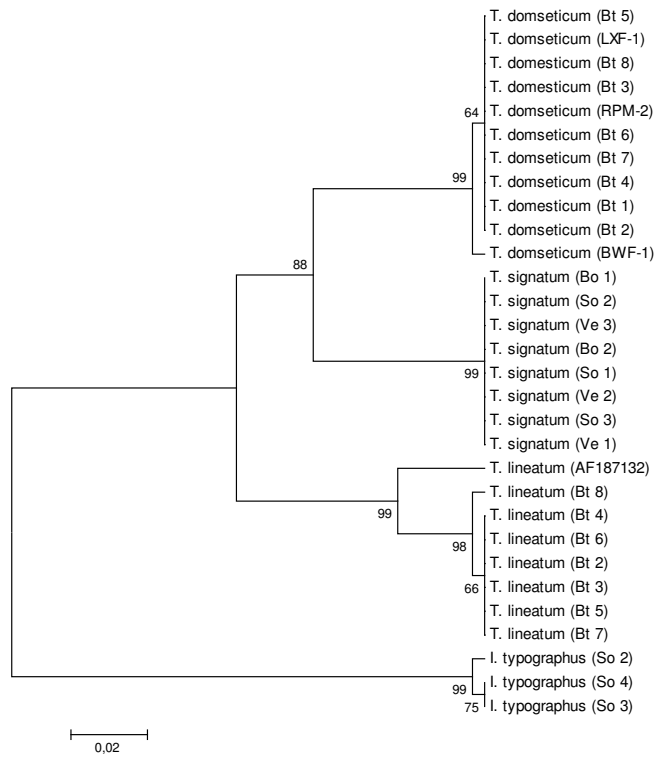
a. UPGMA



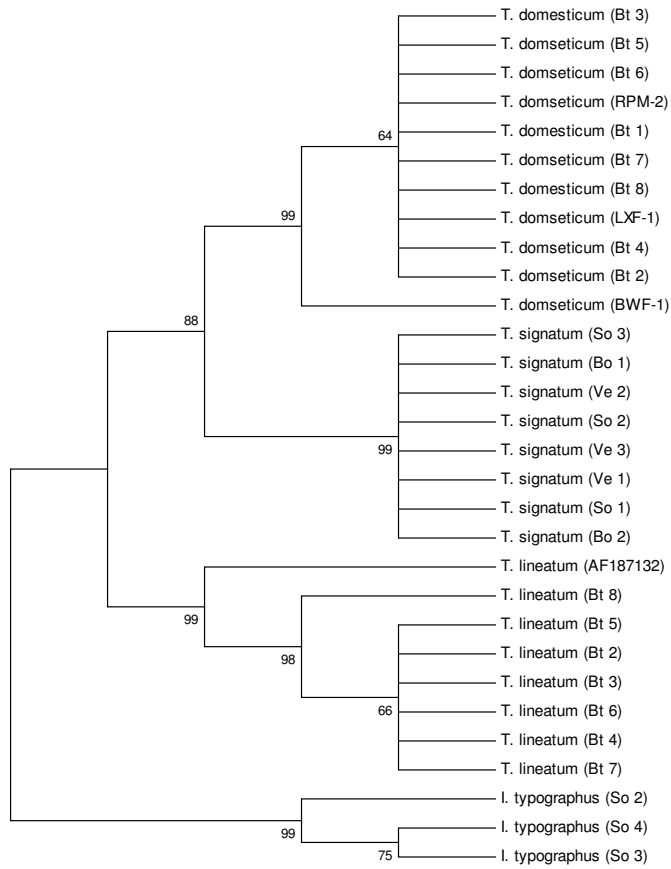
UPGMA, DNS, Kimura 2-parameter, boot-strap 5000



UPGMA, DNS, Kimura 2-parameter, boot-strap 5000, boot-strap konszenzus fa

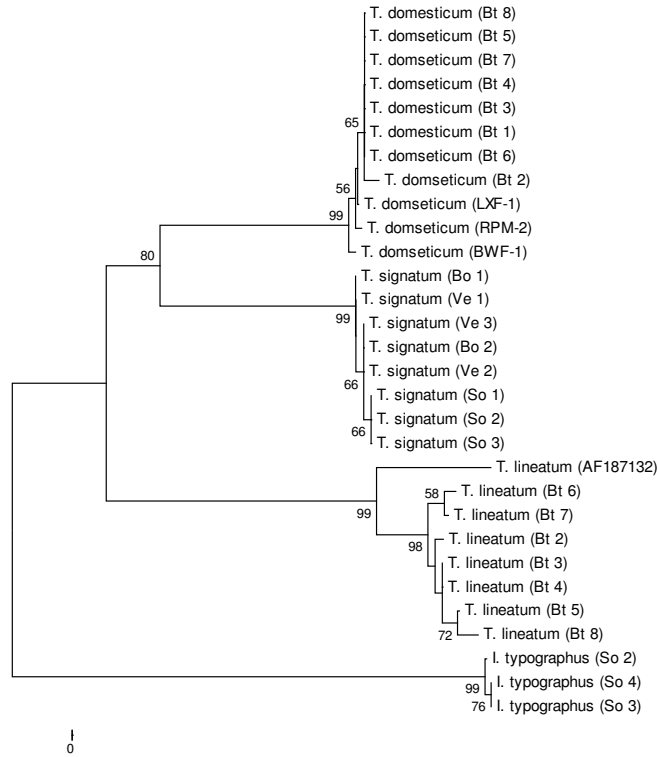


UPGMA, aminosav, p-dist, boot-strap 5000

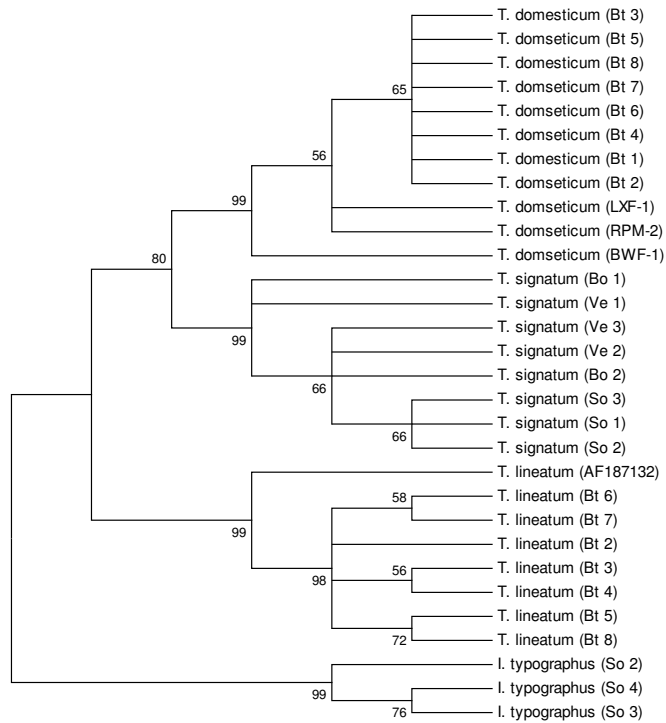


UPGMA, aminosav, p-dist, boot-strap 5000, boot-strap konszenzus fa

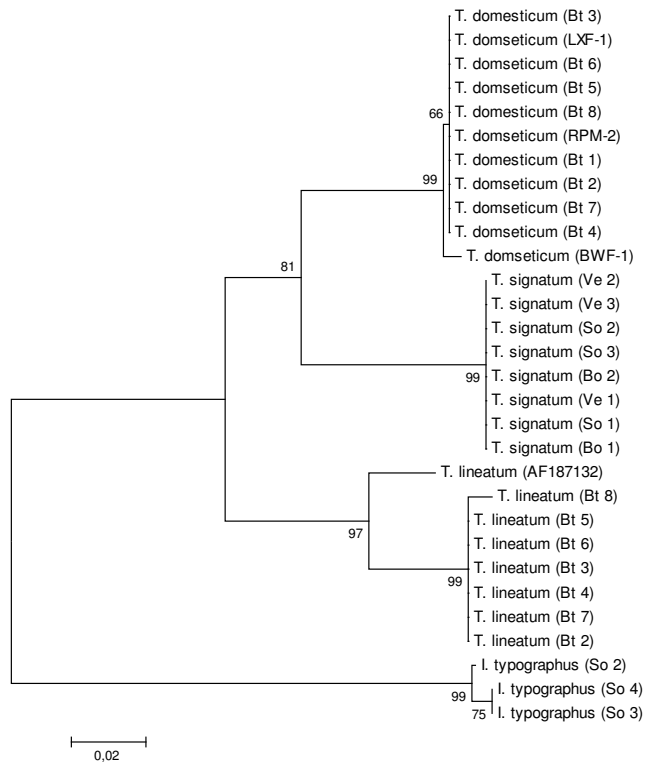
b. Neighbor-Joining



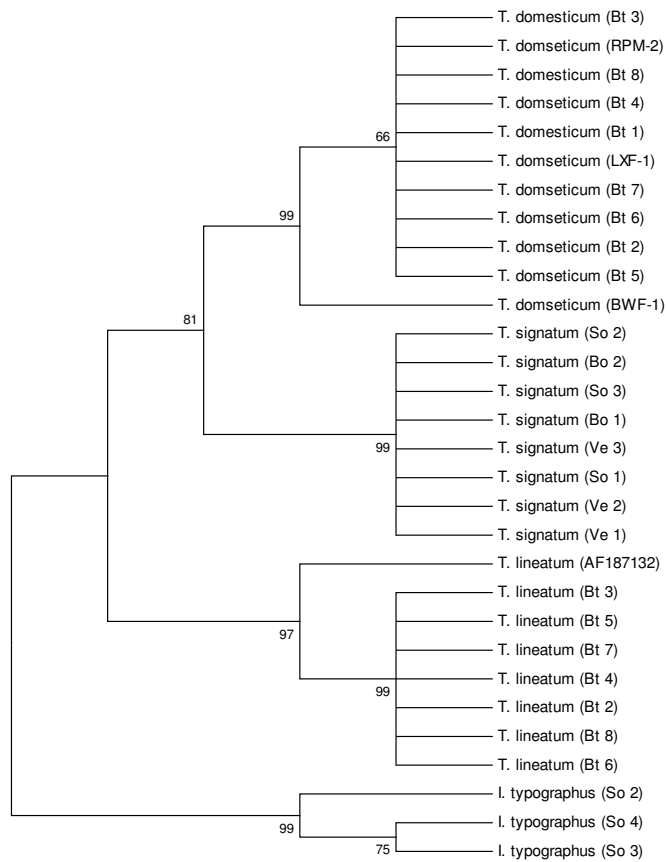
NJ, NDS, Kimura 2-parameter, boot-strap 5000



NJ, DNS, Kimura 2-parameter, boot-strap 5000, boot-strap konszenzus fa

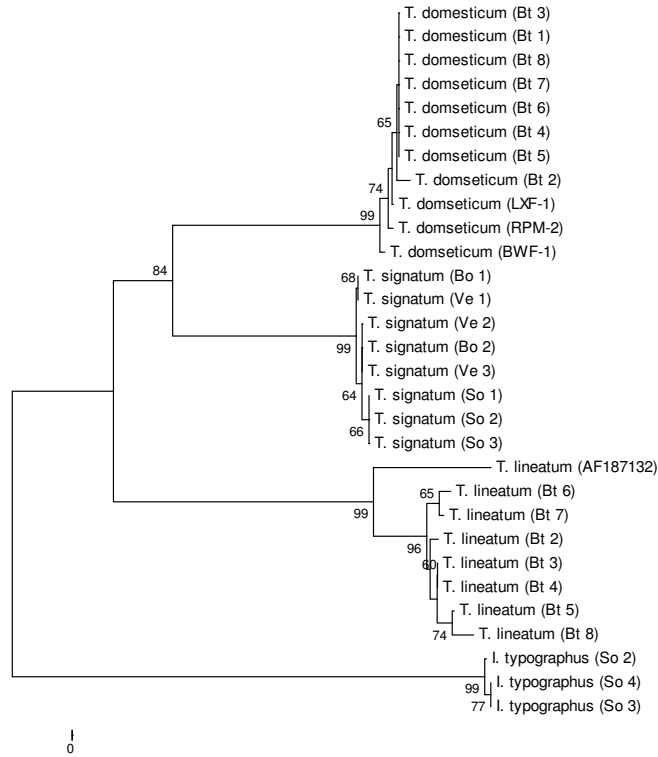


NJ, aminosav, p-dist, boot-strap 5000

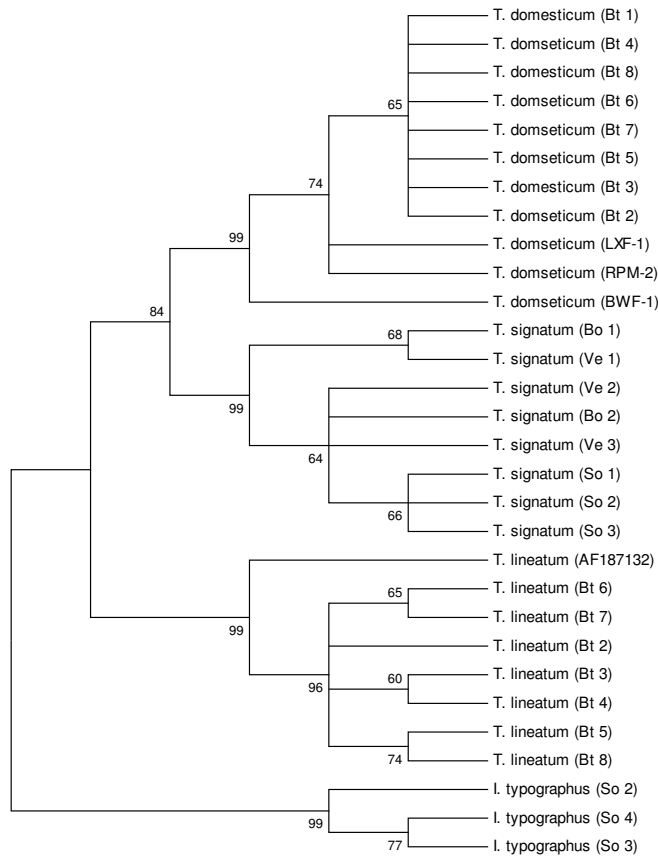


NJ, aminosav, p-dist, boot-strap 5000, boot-strap konszenzus fa

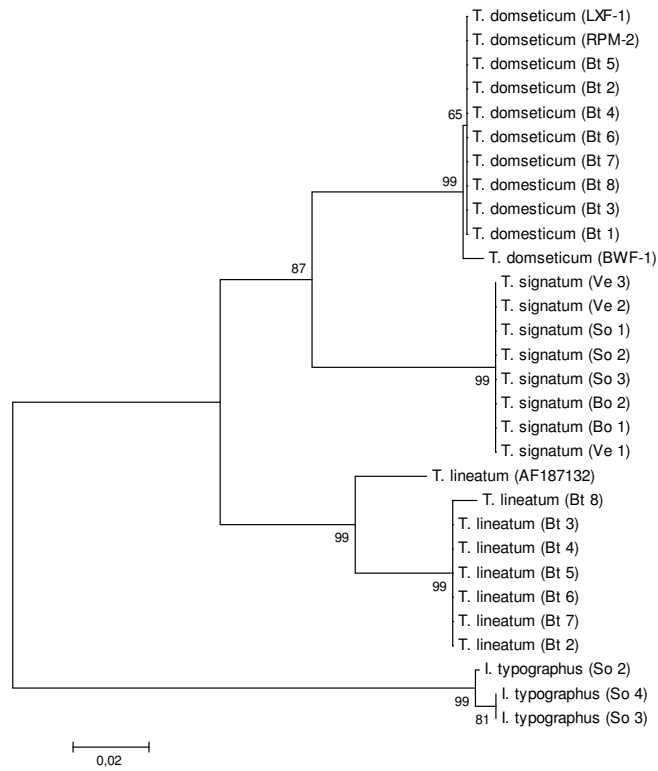
c. Minimum Evolution



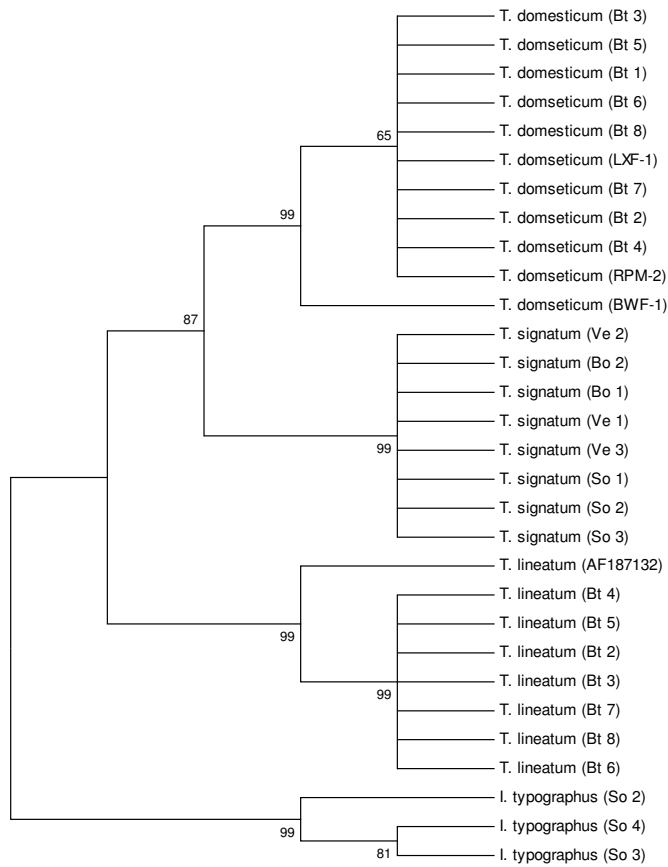
ME, DNS, Kimura 2-parameter, boot-strap 5000



ME, DNS, Kimura 2-parameter, boot-strap 5000, boot-strap konszenzus fa

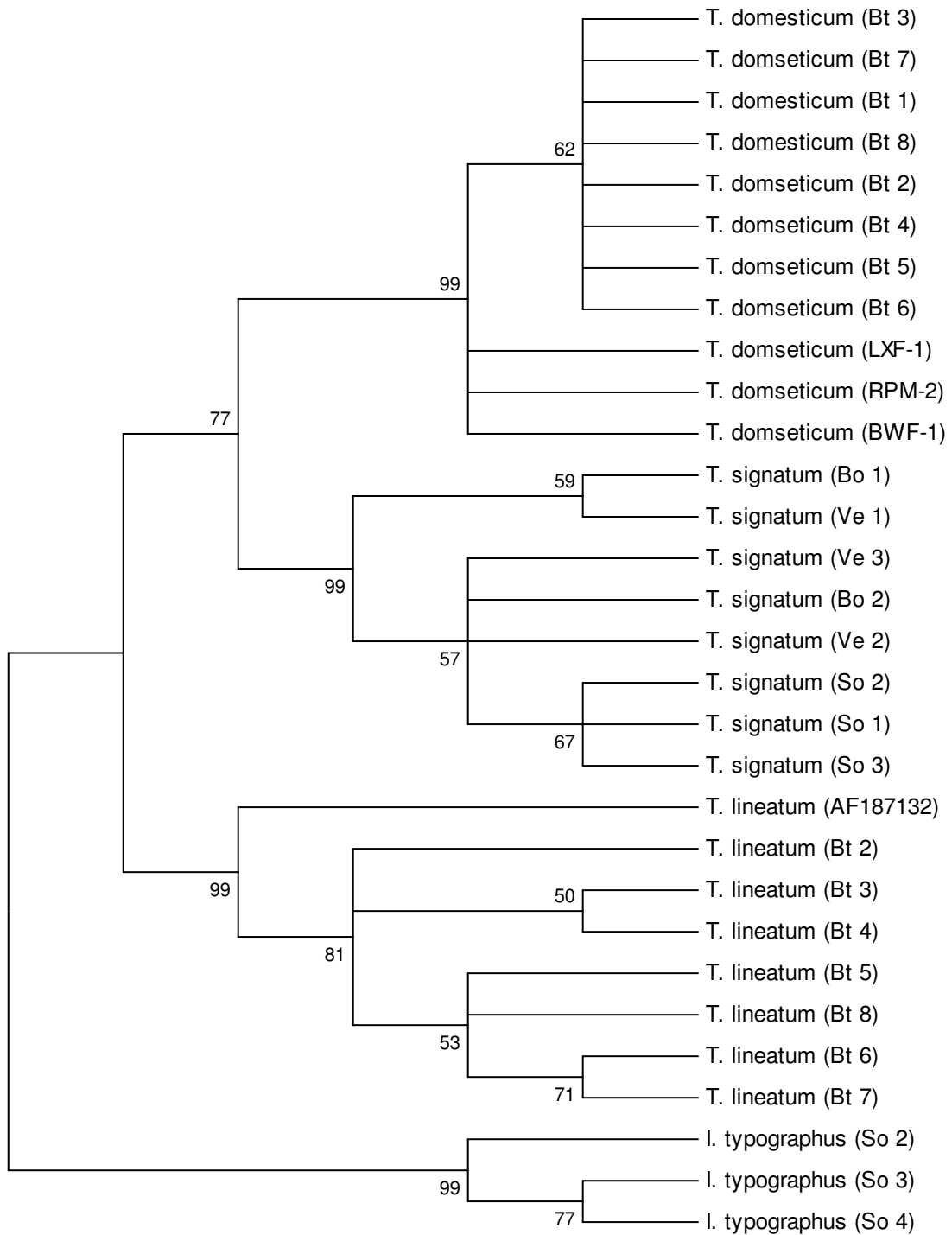


ME, aminosav, p-dist, boot-strap 5000



ME, aminosav, p-dist, boot-strap 5000, boot-strap konszenzus fa

d. Maximum Parsimony



MP, DNS, Kimura 2-parameter, boot-strap 5000, boot-strap konszenzus fa