Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Genetická variabilita koprofágních brouků *Aphodius prodromus*, *Geotrupes spiniger* a *Geotrupes stercorarius* (Coleoptera: Scarabaeioidea) na území jižních Čech

Bakalářská práce

Jakub Vlček

Školitel: PaedDr. Martina Žurovcová, Ph.D.

Školitel specialista: Mgr. Martin Šlachta, Ph.D.

České Budějovice 2012

Bibliografické údaje

Vlček, J., 2012: Genetická variabilita koprofágních brouků *Aphodius prodromus*, *Geotrupes spiniger* a *Geotrupes stercorarius* (Coleoptera: Scarabaeioidea) na území jižních Čech. [Genetic variability of dung beetles *Aphodius prodromus*, *Geotrupes spiniger* and *Geotrupes stercorarius* (Coleoptera: Scarabaeioidea) in region of South Bohemia. Bc. Thesis, in Czech.] – 42 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotace

Genetic variability of three coprophagous beetles on confined area of South Bohemia was studied in this thesis. The main aim was to reveal a population structure in beetles *Aphodius prodromus*, *Geotrupes spiniger* and *Geotrupes stercorarius* by methods of molecular biology. Two sequence markers were employed in this population genetic issue: Internal Transcribed Spacer 1 (ITS1) and mitochondrial gene Cytochrome oxidase I (COI). Several parameters of DNA sequence variability and statistical methods were used: nucleotide diversity, genetic distances, Mantel test; haplotype networks and phylograms were constructed. None of the studied species exhibited significant population structure dependent on geografical distance. However, interesting result is occurrence of highly differentiated but sympatric subpopulations of *A. prodromus*.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích, 26. 4. 2011 ……..

Poděkování

Děkuji své školitelce Martině Žurovcové za poskytnuté zázemí a podnětné připomínky. Martinu Šlachtovi jsem zavázán za sběr vzorků a celý nápad studia variability koprofágních brouků. Lucce Kučerové děkuji za výraznou pomoc nejen při statistickém zpracování. Aleši Bezděkovi a Františku Sládečkovi jsem velice vděčný za určení vzorků a připomínky k možné interpretaci výsledků z pohledu taxonomického i ekologického. Laboratorním spolupracovnicím (Danča, Andy, Anička) patří můj velký dík za uvedení do světa bílé biologie a příjemnou společnost při všedním pipetování. Rodičům děkuji za bezmeznou podporu a vlastně všechno. A podobně jsem také zavázán blízkým lidem v mém okolí.

Za finanční podporu děkuji Přírodovědecké fakultě JU, Entomologickému ústavu AVČR (Výzkumný záměr: AVOZ50070508). Projekt byl také financován z výzkumného záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, číslo MSM 6007665806 (Martin Šlachta) a Evropského sociálního fondu (Martin Šlachta).

.

Obsah

1. **Úvod** ... 1
   1.1. Koprofágní brouci ... 1
      1.1.1. Vymezení pojmu a základní informace ... 1
      1.1.2. Ekologie ... 2
      1.1.3. Hospodářský a další význam ... 3
   1.2. *Aphodius prodromus* ... 3
   1.2. *Geotrupes spiniger* ... 4
   1.3. *Geotrupes stercorarius* ... 4
   1.4. Populační struktura ... 5
   1.5 Molekulární markery ... 5
      1.5.1 Mitochondriální DNA (mtDNA) markery ... 5
      1.5.2 Jaderný DNA marker ITS 1 ... 8
      1.5.3 EPIC (Exon Primed Intron Crossing) ... 8
      1.5.4 Alozymy ... 8
      1.5.5 Mikrosatelity (SSRs) ... 9
      1.5.6 Single nucleotide polymorphism (SNP) ... 10
      1.5.7 Amplified fragment lenght polymorphism (AFLP) ... 10
      1.5.8 Závěr a volba markeru ... 11
2. **Cíle práce** ... 12
3. **Materiál a Metody** ... 13
   3.1. Sběr vzorků ... 13
   3.2. Extrakce a stanovení kvality DNA ... 14
   3.3. Amplifikace DNA ... 14
   3.4. Analýza sekvencí (software) ... 18
4. **Výsledky** ... 20
   4.1. *Aphodius prodromus* ... 20
   4.2. *Geotrupes spiniger* a *Geotrupes stercorarius* ... 25
5. **Diskuze** ... 31
   5.1. Funkčnost zvolených markerů ... 31
   5.2. Variabilita zvolených markerů ... 31
   5.3. Schopnost markerů odlišit druhy *Geotrupes spiniger a Geotrupes stercorarius* ... 32
   5.4. Populační struktura ... 33
6. **Závěr** ... 36
7. **Použitá Literatura** ... 37
8. **Přílohy** ... 44

1. Úvod

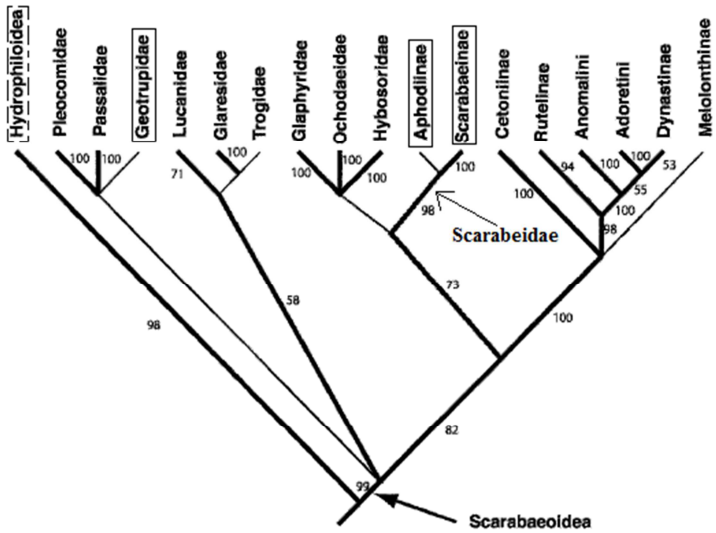
1.1. **Koprofágní brouci**

1.1.1. Vymezení pojmu a základní informace

Termín koprofágní brouci (dung beetles) označuje zástupce polyfyletické, nejednoznačně definované skupiny, jejichž společným znakem je životní cyklus spojený s využitím exkrementů savců, ptáků i plazů (Hanski a Cambefort 1991). Obecně uznávané čeledi této skupiny jsou Scarabaeidae (hlavně pak podčeledi Scarabaeinae a Aphodiinae) a Geotrupidae patřící do nadčeledi Scarabaeoidea (Finn a Gittings 2003), avšak v některé literatuře (Gittings a Giller 1998, Holter et al. 1993) se termínem koprofágní brouci označují také rody Sphaeridium a Cercyon, patřící do nadčeledi Hydrophiloidea.

Koprofágních brouků řazených do Scarabaeoidea bylo celkem popsáno asi 7000 druhů, z čehož zásadní druhovou diverzitu tvoří podčeleď Scarabaeinae s přibližně 5000 druhy (Monaghan et al. 2007) vyskytujícími se povětšinou v tropech. Tito ekosystémově významní brouci obývají všechny kontinenty kromě Antarktidy. V severním temperátu tvoří největší druhovou diverzitu koprofágů zástupci podčeledi Aphodiinae a spolu se zástupci podčeledi Geotrupinae téměř zcela nahrazují jižněji se vyskytující Scarabaeinae (Hanski 1986).

Fylogenetické vztahy koprofágních brouků uvnitř skupiny Scarabaeoidea nejsou ustálené. Smith (2006) z předběžných molekulárních dat (Obr. 1) zjistil, že Aphodiinae a Scarabaeinae jsou sesterské monofyletické skupiny v rámci Scarabaeoidea odvozenější než Geotrupinae. Avšak Grebennikov a Scholtz (2004) monofylii Scarabeidae podle morfologických charakteristik zpochybňují.



Obr 1.: Fylogenetické vztahy v rámci nadčeledi Scarabaeioidea. Strom vytvořen parsimoniální metodou na základě předběžných molekulárních dat (Smith 2006). Plnou čarou jsou ohraničeny koprofágní taxony, přerušovanou čarou je ohraničena částečně koprofágní nadčeleď Hydrophiloidea.

1.1.2. Ekologie

O nestálý a prostorově omezený potravní zdroj koprofágních brouků probíhá neustálá vnitrokoprofágní kompetice (Hanski a Cambefort 1991), která vedla k vývoji několika gild, skupin, které se odlišují způsobem zpracováním potravy a tedy také hnízdní strategií. Váleči („rollers“) oddělí menší část trusu a přemístí ji do určité vzdálenosti od zdroje, pak svoji kořist zahrabou a nakladou do ní vajíčka. Štolaři („tunellers“) vyhrabou noru přímo pod potravním zdrojem, ve štole vybudují komůrky se zásobou trusu (nepropojenou s původním zdrojem), ve kterém se vyvíjejí larvy. Obývači („dwellers“) jsou většinou menší brouci, jejichž reprodukční cyklus probíhá přímo ve výkalu na původním místě či v odsunuté satelitní části (rod *Aphodius*), která je však s původním zdrojem propojená (Gittings a Giller 1997). Poslední gildou jsou kleptoparaziti („cleptoparasites“), kteří využívají potravní zdroj již upravený váleči nebo štolaři.

Potravu jsou koprofágní brouci schopni odhalit díky dobře vyvinutému čichu i na velkou vzdálenost (Hanski a Cambefort 1991) a překlenout tuto vzdálenost jim jako letuschopnému hmyzu problém nedělá. Ústní ústrojí dospělců je speciálně adaptované na koprofágii, pomocí modifikované horní části mandibuly filtrují z exkrementu drobné, nutričně hodnotné částice (Holter a Scholz 2007). U larev je však ústní ústrojí kousací.

1.1.3. Hospodářský a další význam

Koprofágní brouci významně pozitivně ovlivňují koloběh živin. K okamžitému využití např. poskytují rostlinám dusík, který by bez jejich zásahu vyprchal do atmosféry (Hanski a Cambefort 1991). Po celém světě napomáhají rozkladu většiny výkalů a zvláště pro zemědělství je rozklad exkrementů hromadících se na pastvinách životně důležitý. Dekompozice výkalu je brouky ovlivněna jak primárně, kdy (hlavně larvy) hmotu ve velkém konzumují, tak sekundárně, kdy trus uzpůsobují (provrtáváním a přemísťováním) pro kolonizaci dalších dekompozitorů, například kroužkovců, bakterií a hub (Holter 1979). Rychlý rozklad trusu pak zvyšuje efektivitu pastvin, jelikož místa pokrytá exkrementy nejsou spásána (Hanski a Cambefort 1991). Koprofágní brouci také určitou měrou redukují početnost parazitů dobytka (Bergstrom et al. 1976) a v tropech se podílejí na disperzi semen rostlin prošlých trávicím traktem savce, tudíž se pozitivně podílejí na obnově deštného lesa (Aresen a Levey 2004).

Po značném snížení počtu pastvin a intenzifikaci zemědělství v průběhu minulého století došlo v České republice ke snížení diverzity koprofágů. Avšak za posledních dvacet let se počet pastvin navýšil a díky různým finančním podporám se rozvíjejí i extenzivně pasené lokality zvláště v horských oblastech (Šlachta et al. 2009). S tímto trendem narůstá i diverzita a početnost koprofágních brouků, a proto je právě nyní velmi potřebné porozumět jejich populační ekologii. Podrobné rozklíčování populační ekologie je v nynějších dobách velice dobře proveditelné pomocí molekulárních metod, které v této bakalářské práci přispějí k porozumění ekologie koprofágních brouků vyskytujících se v rámci jižních Čech.

1.2. ***Aphodius prodromus* (Brahm, 1790) – hnojník jarní**

Tento brouk s částečně holoarktickým rozšířením je jedním z nejhojněji se vyskytujícím koprofágním druhem v České Republice (Zúber 2011). Dospělí brouci dorůstají velikosti 4-7 mm a jsou rozšířeni plošně po celé ČR kromě hřebenů hor (Tesař 1957). Biologie tohoto druhu se značně liší od ostatních koprofágních brouků. Ačkoliv je *A. prodromus* zařazen do ekologické skupiny „dung dwellers“, neklade vajíčka do výkalu, ale do země v blízkosti tlejícího materiálu, ve kterém se poté vyvíjejí i larvy (Gittings a Giller 1997). Dle předchozí citované práce se dospělci objevují na pastvinách ve dvou hlavních vlnách a to na jaře a na podzim. *A. prodromus* je velice letuschopný a obsazování nových nik, vzniklých obnovou pastvin, by mu nemělo dělat potíže (Šlachta, osobní sdělení, 2012).

Doposud byly u tohoto druhu zkoumány pouze obecné ekologické závislosti (Bertone et al. 2005). *A. prodromus* byl také v práci Huttona a Gillera (2003) využit jako jeden

z modelových druhů pro zjištění vlivu zemědělství na společenství koprofágních brouků. Na úrovni DNA však tento druh nebyl doposud zkoumán, ale populačně genetická studie byla provedena na příbuzném druhu *Aphodius fossor*, kde odhalila minimální vnitrodruhovou variabilitu pomocí markeru COI a alozymů v rámci celého Finska (Roslin 2001).

1.3. *Geotrupes spiniger* (Marsham, 1802)

Tento druh byl původně v České Republice vzácný (Tesař 1957), avšak v posledních 20 letech jeho početnost i rozšíření vzrůstá (Zúber 2011). Centrem výskytu je jižní Evropa, ale druh je rozšířen kromě severních oblastí v rámci celého evropského kontinentu a Malé Asie (Martín Piera 2000). V ČR se vyskytuje hlavně v nížinných oblastech (Zúber 2011). Z ekologicky funkčního hlediska je tento brouk zařazen do skupiny tunelářů.

Doposud byla u toho druhu studována produkci zvuku u larev (Palestrini 1990). Další tři články publikované Klempererem (1978a), 1979b), 1980c)) odhalují a objasňují a) detailní vlastnosti chování larev v hnízdních komůrkách, zvláště opravu vlastních komůrek larvou, b) detailní chování samiček při tvorbě hnízd, c) kleptoparasitické chování *Aphodia rufies* ve hnízdech *G. spiniger*. A Rahiminejad et al. (2011) ve své práci popisují nový druh roztoče rodu *Spatulaphorus* parazitující na broucích *G. spiniger*. Na úrovni DNA však žádné studie neexistují, ani v rámci celého rodu *Geotrupes* nebyla populační struktura studována. Publikovány však byly dvě populačně genetické práce příbuzných rodů *Phelotrupes* a *Trypocopris* (Akamine et al. 2011, Carisio et al. 2004)

1.4. *Geotrupes stercorarius* (Linné, 1758) – chrobák velký

Vývoj početnosti tohoto druhu má téměř opačný trend jako u *G. spiniger*. Tesař (1957) uvádí, že je všude hojný, ale v současné době (Juřena et al. 2008, Zúber 2011) se uvádí jako vzácný či pouze lokálně hojnější, objevující se spíše v horských oblastech. Výskyt je palearktický se severní hranicí na 68° 50´ s. š. (Tesař 1957).

Doposud bylo u tohoto druhu odborně studováno téma vlivu světla na pohybový cirkadiánní rytmus (Buisson et al. 1985) a rozšíření ve Švédsku (Vaisanen a Rassi 1990). Na úrovni DNA se Frydrychová a Marec (2002) zabývali tímto druhem ve studii zaměřené na hlubší fylogenetickou otázku ztráty telomerické repetice „TTAGG“ u různých evolučních linií řádu brouků (Coleoptera).

1.5. **Populační struktura**

Základní vlastností ideální populace podle Hardyho a Weinberga je náhodné křížení mezi všemi jedinci. Tyto panmiktické populace *sensu stricto* se však v reálném světě téměř nevyskytují, jelikož výběr partnera je často závislý na různých faktorech. Hlavním, ale ne jediným faktorem, je fyzická (geografická) vzdálenost jedinců. Tento fenomén je nazýván termínem „isolation by distance“ (IBD) a znamená, že s rostoucí geografickou vzdáleností pravděpodobnost spáření dvou určitých jedinců klesá (Wright 1943). Nenáhodné křížení pak přispívá k nenáhodnému rozmístění alelových frekvencí v populaci a vede k vytvoření populační struktury. Ve velké populaci tak vznikají menší jednotky – subpopulace (= demy). Mezi těmito jednotkami dochází k menšímu genovému toku než mezi jednotlivci uvnitř subpopulace a uvnitř každé subpopulace probíhá náhodný genetický drift, který posunuje frekvence alel v každém demu jiným směrem. Těmito způsoby je populační struktura tvořena a udržována. Migrací mezi jednotkami je zase smazávána.

1.6. **Molekulární markery**

Molekula DNA s sebou nese historii veškerého života, nedávného i vzdáleného. Pomocí molekulárních markerů se tuto historii snažíme odhalit. Zásadní je volba vhodného markeru, který nám poskytne dostatek kvalitních informací, díky nimž budeme schopni zamítnout či potvrdit naše hypotézy. V rámci genomu všech organismů se vyskytují konzervované oblasti, ve kterých je mutační rychlost malá. Tedy za delší časový úsek je nižší pravděpodobnost, že se budou mutace překrývat a zkreslovat informaci v této oblasti obsaženou. Proto marker umístěný zde, je vhodný pro odhalování hlubších fylogenetických vztahů. Na opačné straně je populační genetika, která pro odhalení nedávné historie a vlastností populací vyžaduje použití hypervariabilních markerů s rychlou evolucí. Ideální molekulární marker by měl být tedy vysoce polymorfní, levný, laboratorně málo pracný a neutrální (bez vlivu selekce).

Ideální marker však neexistuje, a proto je důležité vybrat z jejich velké škály ten nejvhodnější pro danou otázku a taxon. V následujících odstavcích shrnuji úspěšnost jednotlivých molekulárních markerů při odhalování populační struktury v řádu *Coleoptera* s důrazem na nadčeleď *Scarabaeoidea.*

1.6.2. Mitochondriální DNA (mtDNA) markery

Tyto markery ležící na bakteriím blízkém genomu a předávající se pouze po mateřské linii, se zdají být v populačních analýzách velice uplatnitelné, ačkoliv reprezentují jen jeden molekulární úhel pohledu. Jejich mutační rychlost je díky oxidativnímu stresu a nepřítomnosti

nukleohistonového komplexu vyšší než u markerů jaderného genomu (Avise 2009). Množství mitochondriálních uniformních genomů v rámci jedné eukaryotní buňky je značné, ale v průběhu buněčného cyklu velmi kolísá. Jedná se o haploidní, nerekombinující marker, u kterého není zapotřebí odlišovat gametickou fázi, jako je tomu třeba u diploidní jaderné DNA. Všechny výše zmíněné pozitiva mají však své výjimky, kterých poslední dobou přibývá (White et al. 2009). Známé jsou případy mitochondriální rekombinace a heteroplasmie (neuniformita mtDNA v rámci organismu). Značný problém mohou představovat i jaderné pseudogeny NUMT (Gaziev a Shaikhaev 2010), což jsou nefunkční sekvence mitochondriálních genů, které se např. nehomologní rekombinací dostaly do jaderného genomu, a z důvodu nepřítomnosti selekce na funkčnost se v nich rychle hromadí mutace. Vybraný primer pak může místo požadovaného mitochondriálního genu amplifikovat i paralogní NUMT jehož mutační rychlost je odlišná od mtDNA. Zásadní vlastností je i vliv předávání mitochondrií po mateřské linii, mitochondriální markery tedy odrážejí demografické jevy pouze samičí části populace. Přesto se tyto markery staly jedněmi z nejdůležitějších pro odhalení populačních vlastností mnohých druhů, a to hlavně zásluhou prací zakladatele fylogeografie prof. J. C. Avise (1987).

První práce odhalující populační strukturu v řádu *Coleoptera* na základě mitochondriálních markerů publikoval Vogler (1993a, 1993b) a z dalších populačně genetických prací (Tab. I) je evidentní, že nejčastěji používaným lokusem v rámci mtDNA je oblast genu pro cytochrom oxidázu I (COI), což potvrzují i Caterino et al. (2000) analýzou sekvencí v databázi GenBank. Maximální genetická vzdálenost se v těchto pracích pohybuje od 0,016 do 0,055 a haplotypová diverzita (h) od 0,58 do 0,98. Porovnávání mezi těmito hodnotami je však těžko interpretovatelné z důvodu rozdílností mezi jednotlivými studiemi.

Akamine et al. (2011) odlišili pomocí markeru COI u brouka *Phelotrupes auratus* (Geotrupidae) dvě zřetelně odlišené linie (poddruhy) v rámci celého japonského souostroví, mezi nimiž byla genetická vzdálenost 0,03. Podobné výsledky publikovali i Carisio et al. (2004), kteří odlišili několik linií uvnitř tří koprofágních brouků rodu *Trypocopris* (Geotrupidae) na území jižní Evropy.Ale k opačnému závěru, tedy extrémní homogenitě populací *Aphodia fossor* (Aphodidae) v rámci celého Finska, došel Roslin (2001) na základě jak sekvencí COI tak alozymových markerů.

Tab. I: Seznam populačně genetických prací v rámci řádu Coleoptera, ve kterých byl použit mitochondriální marker. Pro každou studii jsou uvedeny základní vlastnosti analyzované matice (délka alignmentu, lokus, počet sekvencí) a identifikátory variability (divergence sekvencí a nukleotidová diverzita). Zkratky COI a II označují gen pro cytochrom oxidázu, CytB je označení pro gen cytochrom B a ND1 označuje gen pro NADH dehydrogenázu.

Práce	Druh	Počet sekvencí	Lokus (gen)	Nukleotidová diverzita (π)	Maximální distance sekvencí (haplotypová diversita (h))	Délka alignmentu
(Vogler a Desalle 1993a)	*Cicindela dorsalis*	46	3 různé v rámci mt	n/c	0,047	656
(Cognato et al. 2003)	*Ips confusus*	95	COI	0,011	0,016 (h = 0,58)	n/c
(Lee et al. 2003)	*Pyrocoelia rufa*	107	COI		0,055	n/c
(Kajtoch et al. 2009)	*Centricnemus leucogrammus*	65	COII, CytB, a ND1	0,564	n/c (h=0,981)	1629
(Kajtoch et al. 2009	*Polydrusus inustus*	92	COII, CytB, a ND1	0,071	n/c (h = 0,795)	1643
(Akamine et al. 2011)	*Phelotrupes auratus*	57	COI	n/c	0,046	745
(Anducho-Reyes et al. 2008)	*Dendroctonus mexicanus*	173	COI	0,007	n/c (h = 0,75)	246
(Miller a Allsopp 2005)	*Antitrogus parvulus*	70	COII	0,0063	0,022	315
(Roslin 2001)	*Aphodius fossor*	113	COI	0,0068	n/c (h = 0,94)	607
(Carisio et al. 2004)	*Trypocopris sp.*	49	COI	0,029; 0,016; 0,027	0,051	568
(Horn et al. 2006)	*Tomiscus destruens*	219	COI a COII	0,013	n/c (h=0,87)	617

1.6.3. Jaderný DNA marker ITS 1

Nejčastěji využívaný sekvenční jaderný marker používaný pro studium populační genetiky u brouků je ITS 1 (internal transcribed spacer 1). Je to protein nekódující avšak transkribovaná oblast ležící mezi dvěma konzervovanými částmi (18S a 5.8S) genu pro ribozomální RNA. Tento gen se v jaderném genomu vyskytuje ve stovkách kopií, což přináší problém vnitrogenomového polymorfismu. Ačkoliv zde působí mechanismus „concerted evolution", který v rámci určitého genomu homogenizuje celý gen pro rRNA, jsou známy případy vysoké intragenomické variability (Harris a Crandall 2000, Vogler a Desalle 1994). Tato může přesahovat i variabilitu mezi jedinci a tím znemožňuje jakoukoliv populační analýzu. Vyskytují se však i případy, kdy marker ITS1 poskytne u brouků ještě lepší signál než COI (Laffin 2005) a problém vnitrogenomové variability není přítomen. Tyto dva markery se v populačních studiích hmyzu používají často společně (Laffin 2005, Liu et al. 2006, Mander et al. 2003, Roehrdanz et al. 2003), ale jejich informativnost se případ od případu liší. Na rozdíl od COI se v oblasti ITS1 vyskytují také inzerční a deleční mutace (indel), které se hůře „alignují" a interpretují.

1.6.4. EPIC (Exon Primed Intron Crossing)

Jde o typ jaderného sekvenčního markeru, jehož primery leží v méně variabilní oblasti funkčního genu a amplifikována je variabilnější oblast intronů, kterou neovlivňují selekční tlaky zachovávající funkčnost či strukturu sekvence DNA jako templátu pro proteiny, mutace se zde tedy objevují častěji než ve většině funkčních genů. Mutační rychlost je však čtvrtinová při porovnání s mutační rychlostí mtDNA (Creer et al. 2003). Problémem těchto markerů je nutnost odlišení alel u diploidních organismů, vyvarování se amplifikace paralogních lokusů a rekombinace. Ucelený přehled o problémech a pozitivech používání intronů v molekulární fylogenetice podává Creer (2007) a stejný autor (Creer et al. 2005) popisuje výběr vhodných intronů a pro nemodelové organizmy.

V rámci brouků nebyl tento marker zatím použit pro studium vnitrodruhové variability, a ani v rámci celého hmyzu (Insecta) není použití tohoto markeru časté. EPIC primery navrhl a ozkoušel na blanokřídlém hmyzu Lohse et al. (2011), ale existují i univerzální EPIC primery (Hillis et al. 1996).

1.6.5. Alozymy

Markery, které poprvé odhalili populační vlastnosti ještě před vynalezením PCR, jsou založeny na detekci polymorfismu proteinů v rámci populací (Lewontin a Hubby 1966).

Frekvence jednotlivých alel jsou zjišťovány elektroforetickou separací a následnou vizualizací pomocí specifického substrátového barvení. Od jejich používání se poslední dobou ustupuje z důvodu nižší informativnosti na rozdíl od sekvenčních markerů, jejichž použití je s postupem doby stále levnější a efektivnější.

V rámci populační genetiky brouků byly alozymy velmi užívanou metodou, často kombinovanou právě se sekvenčními markery (Laffin et al. 2004, Roslin 2001, Vogler et al. 1993). V těchto studiích alozymy vykazují menší variabilitu než mitochondriální markery, což ale opět není pravidlem, opačné uspořádání variabilit bylo například zjištěno u lýkožrouta smrkového (*Ips typhographus*) (Stauffer et al. 1999). Hlavními klady alozymových markerů jsou: finanční nenáročnost, schopnost odlišit heterozygoty a možnost efektivně zanalyzovat více lokusů.

1.6.6. Mikrosatelity (SSRs)

Mikrosatelity jsou považovány za jedny z nejvariabilnějších nesekvenčních markerů odhalující vlastnosti na populační úrovni. Jedná se o repetice sekvencí dvou, tří, až šesti nukleotidů, jejichž informativnost spočívá v počtu opakování těchto repetic. V eukaryotickém genomu se vyskytují až tisíce mikrosatelitových lokusů, z nichž je v populačních studiích používána přibližně desítka. Mikrosatelity se amplifikují pomocí primerů ležících v méně variabilní oblasti, která mikrosatelitový lokus ohraničuje. Značným problémem je izolace mikrosatelitových míst u nemodelových organismů, jelikož ohraničující oblasti (flanking region), ve kterých je navrhnut specifický primer, se často liší i u příbuzných druhů. Dalšími komplikacemi SSR markerů je přítomnost nulových alel, tedy nenaamplifikování určitého lokusu mikrosatelitu (Beebee a Rowe 2008) a nestejná mutační rychlost mezi lokusy i v rámci nich (Brito a Edwards 2009).

V řádu brouků existuje cca 100 článků zabývajících se izolací a využitím mikrosatelitů při populační analýze (databáze Web of Science, 5. 4. 2012), většina z nich se však týká různých škůdce plodin z čeledí Chrysomelidae, Curculionidae (Dhuyvetter et al. 2002, Choi et al. 2011, Kim a Sappington 2005, Li et al. 2008) a brouků z čeledi Carabidae (Brouat et al. 2002, Dhuyvetter a Desender 2003). V rámci čeledi Scarabeidae doposud nebyly u žádného druhu izolovány primery pro amplifikaci mikrosatelitů. Existuje pouze jediná práce odhalující populační strukturu v čeledi Scarabaeidae u nosorožíka (*Oryctes rhinoceros*) na základě mikrosatelitových lokusů (Manjeri et al. 2011), jedná se však o zcela jiné využití mikrosatelitových sekvencí, jako míst na která nasedá primer a amplifikuje oblasti mezi

mikrosatelity (Random amplified microsatellite – RAMs) (Hantula et al. 1996).

1.6.7. Single nucleotide polymorphism (SNP)

Tento typ markeru bere v potaz variabilitu vzniklou bodovými mutacemi v rámci mnoha lokusů napříč celým genomem. Metoda se vyvinula hlavně díky přesnějším a efektivnějším typům sekvenování a s tím korelovaným exponenciálním růstem počtu sekvencí v databázi GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank). SNP mají relativně pomalou mutační rychlost, která zaručuje nízkou míru homoplazií. Nevýhodou je nutnost analýzy velkého množství SNP lokusů, což je prováděno skenováním sekvencí produkovaných často sekvenátory nové generace (Garvin et al. 2010). Ucelený přehled o použití SNP na nemodelových organismech podávají Helyar et al. (2011) a Brumfield et al. (2003), technickou stránku aplikace SNP shrnul Garvin et al. (2010) .

V rámci brouků bylo SNP použito u druhu *Diabrotica virgifera virgifera* (*Chrisomelidae*) (Coates et al. 2009) kde bylo prokázáno, že markery SNP mají větší informativní hodnotu než mikrosatelity, což byl už u mnohých skupin jev pozorovaný (Lao et al. 2006).

1.6.8. Amplified fragment lenght polymorphism (AFLP)

Jedná se o multilokusový anonymní typ markeru, který výchází z metod RAPD (Random amplification of polymorphic DNA) a RFLP (Restriction fragment length polymorphism) které jsou dnes považovány za překonané. Metoda AFLP je založena na náhodném rozstříhání DNA, následném navázání uměle vytvořených sekvencí (linkerů), na které při dalším kroku, PCR, nasedají specifické primery a amplifikují různě dlouhé sekvence mezi místy rozstřihnutí. Délková variabilita těchto sekvencí se pak vizualizuje elektroforetickou metodou (Beebee a Rowe 2008). Tento postup se dá aplikovat na různé druhy, aniž by bylo třeba navrhovat specifické primery a sekvenovat. Výsledky jsou navíc mezidruhově porovnatelné. Zásadním pozitivem je pak zjištění variability v rámci celého genomu, naopak informační hodnotu dosti snižuje dominance tohoto markeru.

U brouků z nadčeledi Scarabaeoidea se AFLP používá často spolu s COI pro odlišení blízce příbuzných kryptických druhů (Carisio et al. 2004, Pizzo et al. 2006), ve studii Carisia et al. AFLP odhaluje vnitrodruhovou variabilitu u brouků rodu *Trypocopris*, kdežto ve studii Pizza et al. je vnitrodruhová variabilita brouků rodu *Onthophagus* minimální. Mende et al. (2010) zjistil pomocí AFLP značnou strukturovanost populací *Macroplea mutica* (Coleoptera:

Chrysomelidae) v rámci Evropy a další příklad využití AFLP markeru při studiu populační struktury publikuje Kazachkova et al. (2008).

1.6.9. Závěr a volba markeru

Nejčastěji používaným agentem odhalujícím vnitrodruhovou variabilitu v rámci brouků je sekvenční mitochondriální marker amplifikující oblast genu COI. V poslední době je však tento marker postupně překonáván multilokusovými jadernými markery (SNP, SSRs). Informace ze sekvencí COI však často velice dobře doplňují jaderné markery a takto, z více molekulárních úhlů pohledu, se výsledky stávají robustnějšími. Bohužel SNP nebo SSRs jsou buď laboratorně, nebo finančně náročné metody pro mnou studované nemodelové druhy. Proto jsem ke skríningu populací koprofágních brouků použil dva sekvenční markery, osvědčenou mitochondriální oblast COI a variabilní jadernou oblast ITS1, která byla se střídavými úspěchy použita u mnoha populačních studií brouků. Spolu s těmito osvědčenými informačními agenty jsem vyzkoušel amplifikovat i, v rámci brouků, nekonvenční EPIC markery.

2. Cíle práce

2.1. Analyzovat úspěšnost různých molekulárních markerů při odhalování populační struktury (koprofágních) brouků.

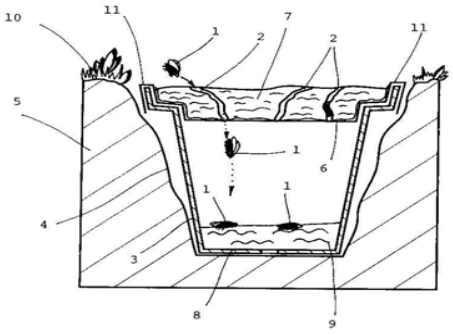
2.2. Experimentálně ověřit funkčnost vybraných molekulárních markerů na třech druzích koprofágních brouků *A. prodromus*, *G. spiniger* a *G. stercorarius.*

2.3. Pomocí vybraných molekulárních markerů zhodnotit populační strukturu *A. prodromus* na geografické škále jižních Čech. Porovnat vnitrodruhovou a mezidruhovou variabilitu u *G. spiniger* a *G. stercorarius*.

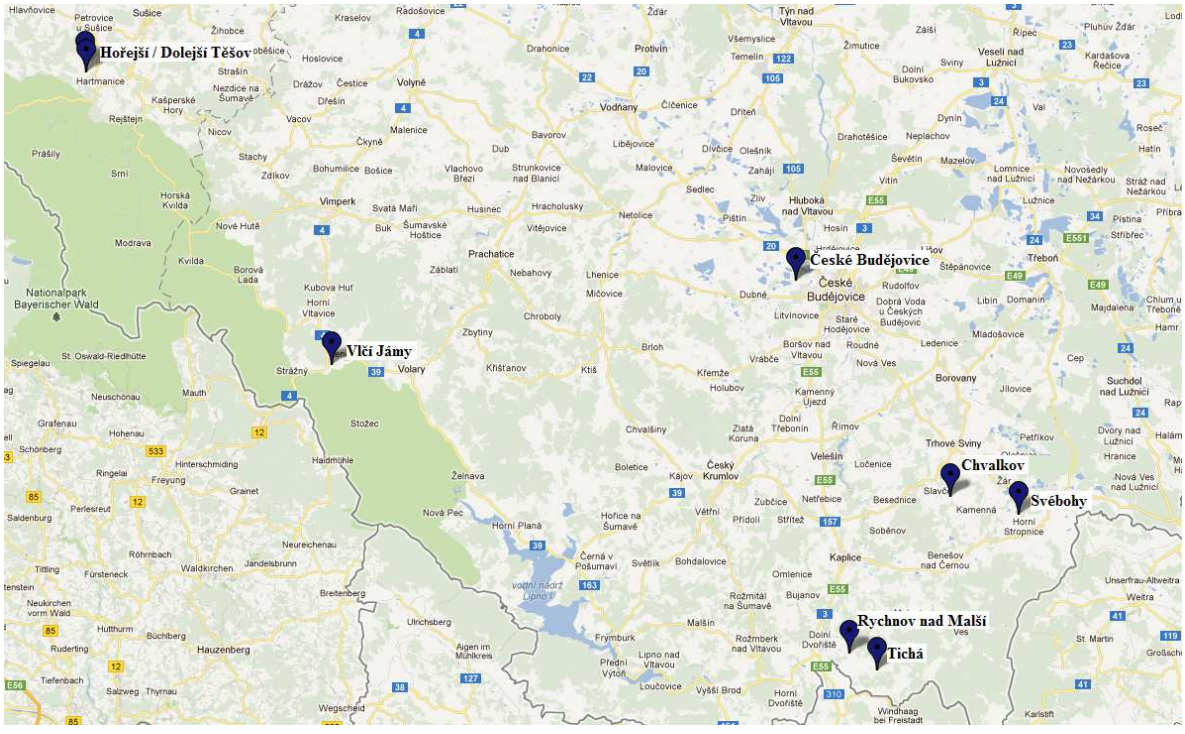
3. Materiál a Metody

3.1. **Sběr vzorků**

Sběr a determinace brouků (*A. prodromus*, *G. spiniger* a *G. stercorarius*) byla prováděna Martinem Šlachtou v roce 2010 metodou padacích pastí (Obr. 2). Na rozdíl od náčrtu nebylo použito konzervační médium 10% formalín z důvodu možné degradace následně studovaných proteinů a DNA, takže nádoba zůstala prázdná. *Aphodius prodromus* byl nasbírán v jarním období (22. - 23. 4. 2010) z osmi lokalit v oblasti jižních Čech (Příloha 1) a na sedmi identických lokalitách a jedné nové lokalitě (Chvalkov) byly v jarním a letním období sebrány brouci rodu *Geotrupes* (Obr. 3). Brouci byli následně uskladněni v mrazicím boxu o teplotě -80°C bez aplikace jakýchkoliv konzervantů.



Obr. 2: Náčrtek padací pasti dle Šlachty et al. (2008a): 1-koprofágní brouk, 3-plastová nádoba o průměru 20cm, 6-drátěné pletivo s 30mm oky, 7-kravský exkrement jako návnada 9-0,5l 10%formalínu.



Obr. 3: Mapa jižních Čech s vyznačenými lokalitami sběru vzorků.

3.2. **Extrakce a stanovení kvality DNA**

Pro extrakci DNA z *A. prodromus* byla použita hlava a hlavohruď, zadeček byl využit pro alozymovou studii. Z důvodu možné kontaminace PCR inhibitory z očních barviv byla u pozdějších extrakcí separována hlava a použita pouze hlavohruď. U brouků rodu *Geotrupes*, kteří byli zachováni v kompletním stavu, byla extrakce prováděna z jedné přední končetiny. Když byly na přední končetině přítomni parazitičtí roztoči, byla použita končetina zadní. S brouky bylo manipulováno pomocí sterilních entomologických pinzet.

Samotná extrakce kompletní DNA ze všech brouků byla provedena pomocí kitu DNeasy tissue (QIAGEN) podle návodu výrobce (http://www.qiagen.com/literature/render.aspx?id=381). Testována byla i fenol-chloroformová extrakce při použití protokolu dle Ausubela (1992).

Koncentrace a čistota extrahované DNA byla stanovena spektrofotometrickou metodou pomocí přístroje NanoDrop™ 2000 a zpracována v programu téže firmy.

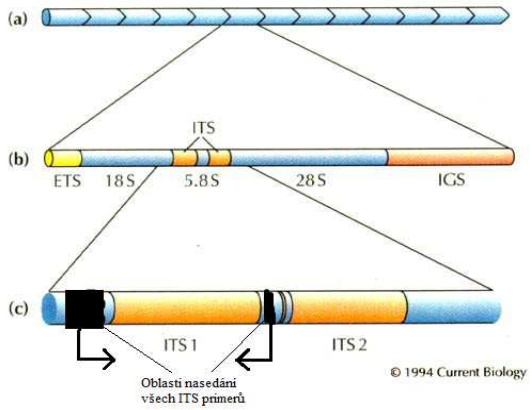
3.3. **Amplifikace DNA**

3.3.1. Primery

Část mitochondriálního genu COI byla u obou dvou brouků amplifikovaná metodou PCR za použití primeru pro DNA barcoding (Tab. III).

Netranskribovaná oblast jaderného genu pro ribozomální RNA ITS1 byla nejdříve s obtížemi amplifikována pomocí univerzálních hmyzích primerů dle Ji et al. (2003) ležících v konzervovanější oblasti přepisovaných genů 18S a 5.8S (Obr. 4). Následně byly z několika takto získaných sekvencí navrhnuty 4 páry specifických primerů, z nichž pouze jeden (ITS2F/R) byl ideálně optimalizován a fungoval při PCR reakci u obou druhů brouků.

Byly vyzkoušeny i vybrané univerzální EPIC markery hlavně dle Lohse et al. (2011) a Hillise et al. (1996), ale i přes velkou snahu optimalizovat reakci, nebyly fragmenty amplifikovány.



Obr. 4: Schéma uspořádání genu pro rRNA a) sekvence genových jednotek pro rRNA; b) uspořádání oblastí jedné genové jednotky pro rRNA; c) oblasti nasedání ITS primerů v konzervované oblasti genu 18S a 5.8S ohraničující ITS1.

3.3.2. PCR

Základní reakční směs obsahovala vždy: 7,25 µl ddH_2O; 1,25 µl 10x Ex Taq pufr (TaKaRa); 1 µl dNTP (2,5mM, TaKaRa);0,75 µl forward/revers primeru (5 µM); 0,01 µl Taq polymerázy (Top-bio). Pro optimalizaci reakce bylo vyzkoušeno přidání BSA 0,5µl (20mg/ml) (Fermentas), jehož použití však nemělo téměř žádný vliv na úspěšnost PCR. 0,5 µl 5x Optizymu enhanceru (Invitek), mělo na úspěšnost PCRna rozdíl od BSAvliv velmi pozitivní. Množství přidané templátové DNA se pohybovalo od 0,5 – 2,5 µl v závislosti na její koncentraci. Většina templátové DNA byla z původní koncentrace průměrně 60 – 120 ng/ml rozředěna na koncentraci 5 – 20 ng/ml z důvodu snížení obsahu možných PCR inhibitorů. Všechny PCR reakce byly prováděny na termocyklerech značky Bioer na modelech TC-XP a GenePro. Pro každý primer bylo testováno minimálně 4 – 6 různých teplotních profilů PCR, optimalizované profily pro ITS1 a COI jsou v Tab. II.

Tab. II: Profily optimalizovaných PCR pro primery LCO/HCO markeru COI a ITS2F/R markeru ITS1.

	COI		ITS1	
	Teplota (°C)	Doba (min:s)	Teplota (°C)	Doba (min:s)
Predenaturace	94	1:00	94	1:30
Denaturace cycl.	94	0:30	94	0:30
Annealing cycl.	51	0:30	63	0:45
Elongace cycl.	70	1:00	72	1:30
Postelongace	72	1:30	72	2:30
Uchování	4	--:--	4	--:--
Počet cyklů	35		35	

Tab. III: Přehled testovaných primerů, jejich sekvence a zdroj.

Lokus	Název	Sekvence primeru 5'→ 3'	**F**orward / **R**evers	Autor
COI	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	F	(Folmer et al. 1994)
	HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	R	
ITS1	ColITS3F	GGGAAGATGACCAAACTTG	F	Vlček (vytvořeny pro tuto studii)
	ColITS3R	TTCATCGACCCACGAGCCAA	R	
	ColITS2F	CGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACC	F	
	ColITS4R	ATTAGCTGCGTTCTTCATCG	R	
	ColITS4F	AACTTGATCATTTAGAGGAAGT	F	
	ColITS2R	ACGAGCCAAGTGATCCACCGTTCAG	R	
	ITS1bCol-R	CAGGCCGACCCGTCCGAAAAC	R	(Laffin 2005)
	ITS1bCol-F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	F	
	ITSr2	ATGTGCGTTCRAAATGTCGATGTTC	R	(Ji et al. 2003)
	ITSf1	TACACACCGCCCGTCGCTACTA	F	
	ITS5f	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	F	
	ITS4r	TCCTCCGCTTATTGATATGC	R	
	aITSr3	TCGTATAACCTGCGGATTAC	R	Žurovcová et al. (nepublikováno)
EPIC, různé lokusy	insCytC-5´	CGCTGCGCCCAGTGCCACAC	F	(Hillis et al. 1996)
	InsCytC-3´	CATCTTGGTGCCGGGGATGTATTTCTT	R	
	RpL15 F	GGGTGCNACTTAYGGHAARC	F	(Lohse et al. 2011)
	RpL15 R	GCGMAGYTCACGRTGYTTDTG	R	
	RpL27 F	CAAYTTYGACAARTACCATCCWG	F	
	RpL27R	CCYTTKCCYARRAGTTTGTA	R	
	RpL37 F	GAARGGTACNTCVAGYTTTGG	F	
	RpL37R	GACCRGTDCCRGTRGTCTTCCT	R	

3.3.3. Separace DNA

Pro kontrolu úspěšnosti PCR reakce a zjištění koncentrace DNA v PCR produktu byla použita metoda separace pomocí gelové elektroforézy. 1% agarózový gel byl připravován z 2 g agarózy (SeaKem LE Agarose) rozpuštěných ve 200ml 1% pufru TAE. Zásobní roztok 50% pufru TAE byl připravován rozpuštěním 242g TRIS ve, 51 ml kyseliny octové, 100 ml 0,5M EDTA, dolito destilovanou vodou do objemu 1000ml. Po rozpuštění roztoku 1%TAE a agarózy v mikrovlnné troubě a ochlazení na 50-60°C bylo přidáno 8µl Ethidia bromidu

0,5µg/µl Následně byl roztok nalit do formy s hřebínky a nechán zatuhnout přibližně 40-60 min.

Po vložení gelu do elektroforetické vaničky naplněné 1% TAE bylo do jamek naneseny 2-4 µl DNA smíchané s 2,5µl roztoku bromfenolové modři (700µl H_2O, 300 µl glycerolu a 25 mg bromfenolové modři v prášku). Elektroforéza běžela při napětí 120V po dobu cca 30min. Poté byl gel vyfocen pod UV lampou (UVP Transluminator). Jako velikostní markery byly používány: Lambda DNA/EcoRI + Hind III (Fermentas) nebo Mass ruler^{TM} Low range DNA ladder ready – to – use (Fermentas).

3.3.4. Čištění a sekvenace DNA

Před sekvenováním i klonováním byly PCR produkty přečištěny metodou ExoSap-IT ® (Dugan et al. 2002). Ke každému PCR produktu bylo na ledu přidáno 0,5µl H_2O; 0,5 µl Exonuclesy I (20U/µl, Fermentas) a 1 µl Shrimp Alkaline Phosphatase (1U/µl, Fermentas). Inkubace probíhala v cykléru při teplotě 37°C po dobu 30 min a inaktivace enzymů při 87°C po 15 min.

Sekvenace byla prováděna Laboratoří genomiky Ústavu molekulární biologie rostlin na přístroji ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems). Do sekvenační reakce bylo napipetováno 0,2-3,5 µl přečištěné DNA, objem DNA potřebný pro sekvenaci byl korelován s koncentrací DNA v PCR produktu. Tato koncentrace byla odečítána pomocí velikostních markerů (Mass ruler^{TM} nebo Lambda). Dále bylo přidáno 0,5µl primeru (5 µM) a vodou byl objem sekvenační reakce doplněn na 7,5µl. Pro sekvenaci byl většinou použit jen forwardový primer, pouze v případě, že takto získaná sekvence obsahovala nejasné pozice, byl následně pro sekvenaci použit i primer reverzní a obě sekvence byly srovnány a upraveny.

3.3.5. Klonování

U brouka *Geotrupes spiniger* bylo nutné zaklonování fragmentu COI z důvodu amplifikace jaderného pseudogenu, který způsoboval nejasné heterozygotní pozice v chromatogramu primární sekvence. Pseudogen (NUMT) byl následně odlišen od funkčního genu přítomností velkého množství stop kodónů (Bensasson et al. 2001).

1-4 µl přečištěného (ExoSap) PCR produktu amplifikovaného primery LCO/HCO bylo přidáno do ligační směsi – 1µl pDrive cloning vector (50ng/µl, QIAGEN), 5µl Ligation Master Mix a 0-3µl ddH_2O (doplnění reakce na 10µl). Množství PCR produktu bylo negativně korelované s jeho rostoucí koncentrací. Takto připravená ligační směs byla inkubována po dobu 2-5hodin za teploty 4-10°C.

Transformace byla provedena do100µl kompetentních bakterií *Escherichia coli* kmene DH5α přidáním 5 µl ligační směsi. Tato směs byla jemně promíchána, odložena 15 minut na ledu a poté byl proveden teplotní šok expozicí bakterií 42°C po dobu 45s. Následně bylo pro lepší zotavení bakterií přidáno 0,5ml tekutého SOB media (5g tryptonu, 1,25g kvasničného extraktu, 0,125g chloridu sodného, 2,5ml 250mM chloridu draselného, 0,05 ml 5M hydroxidu sodného a 250ml ddH_2O) a tato transformační směs byla inkubována ve třepacím inkubátoru za teploty 37°C po dobu přibližně 50 minut.

Tuhé růstové LB médium v Petriho miskách bylo připraveno rozpuštěním 10g tryptonu, 5g kvasničného extraktu, 10g chloridu sodného a 15g agaru v 1 litru ddH_2O. Po vyklávování (45minut/125°C) a ochlazení na cca 55°C byl přidán 1 ml roztoku antibiotika ampicilínu (100mg/ml, Sigma) a médium bylo rozlito do Petriho misek, které byly následně uchovávány v ledničce ve 4°C.

Ještě před výsevem byl na růstové médium inokulační hokejkou nanesen roztok umožňující modro-bílou selekci - 50 µl Xgalu (20mg 5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranosidu /1ml dimethyl sulfoxidu) a 10 µl IPTG (0,1M isopropyl-β-D-thio-galactosid). Na takto připravené médium bylo vyseto 200 µl směsi transformovaných bakterií a následná inkubace při 37°C probíhala po dobu 15 – 20 hodin, přičemž Petriho misky byly otočeny dnem vzhůru. Po této době bylo na nové médium přeočkováno 5 – 8 bíle zbarvených kolonií. Inokulační klička byla souběžně omyta v 200 µl ddH_2O a tento roztok byl následně použit jako templátová DNA pro PCR (primery LCO/HCO).

3.4. **Analýza sekvencí (software)**

Sekvence ITS 1 byly alignovány v programu MAFFT (Katoh et al. 2009) strategií L-INS-i z důvodu lepšího zohlednění častých indelů tohoto markeru. Alignment COI sekvencí byl proveden v programu MEGA 5 (Tamura et al. 2011) pomocí algoritmu Clustal W. V tomto programu byly spočítány i základní statistiky matic obou dvou markerů: obsah jednotlivých nukleotidů, počet variabilních a parsimoniálně informativních míst, průměrná divergence všech sekvencí, divergence sekvencí v rámci lokalit a mezi lokalitami. Pro zjištění míry odlišení mezi haplotypovými skupinami byla vypočtena upravená genetická vzdálenost ($d_A = d_{XY}-[(d_X+d_Y)/2]$, d_{XY} je divergence mezi skupinami x a y (v mém případě A a B), d_X a d_Y jsou průměrné divergence uvnitř skupin (Nei a Kumar 2000). Z této upravené divergence byl vypočítán čas divergence pomocí rovnice $T = d_A/2\lambda$ (Nei 1987) kde koeficient λ byla mutační rychlost 1,2% (za milion let), což je standartní hodnota pro mtDNA členovců podle Browera (1994). Dále byly spočteny statistiky nukleotidové diverzity: celková nukleotidová diverzita

(π_T), průměrná nukleotidová diverzita uvnitř populací (π_S), průměrná nukleotidová diverzita mezi populacemi ($\delta_{ST} = \pi_T - \pi_S$) a koeficient nukleotidové diferenciace ($N_{ST} = \delta_{ST} / \pi_T$) (Nei a Kumar 2000) odpovídající statistice F_{ST} pro sekvenční haploidní data.

V programu MEGA 5 byly také testovány modely substituce nukleotidů (Tamura 1992) a vytvořeny fylogramy distanční metodou „minimum evolution" (Rzhetsky a Nei 1992) a metodou „maximum likelihood" za použití algoritmu Close-Neighbor-Interchange. U kódujících sekvencí COI se při analýzách v programu MEGA5 mezery vylučovaly (complete deletion), kdežto u sekvencí ITS1 byly mezery do analýzy zahrnuty jako informativní pozice (pairwise deletion).

Haplotypová diverzita (*h*) byla spočítána v programu DNAsp (Librado a Rozas 2009). Haplotypová síť byla vytvořena programem Network 4.6 pomocí algoritmu „median joining" (Bandelt et al. 1995) a matice pro tuto analýzu byla vytvořena programem DNAsp. U brouků rodu *Geotrupes* bylo v programu PAUP 4.0 (Swofford 2003) testováno pomocí ILD testu zda oba markery (ITS1 a COI) podávají stejný fylogenetický signál.

Mantelův test byl spočítán pomocí programu Genalex (Peakall a Smouse 2006). Dále byla provedena Bayesiánská analýza v programu MrBayes $_v$3.2.1 (Ronquist a Huelsenbeck 2003), jejíž jednotlivé vlastnosti (počet generací, počet samplovaných generací a burnin) se u každé analýzy lišily a proto jsou uvedeny přímo u následně vyprodukovaných fylogramů. Informace o dostatečném prosamplování metodou Bayes, byly zjišťovány v online programu AWTY (Nylander et al. 2008), výsledky tohoto programu sloužily také ke stanovení počtu běhů, které se do analýzy stromečků nebraly v potaz (Burnin).

4. Výsledky

4.1. *Aphodius prodromus*

4.1.1. COI

Úspěšně byly získány sekvence v rámci genu COI u 96 jedinců, průměrně 12 jedinců na lokalitu. Délka alignmentu je 634 bazí a obsah jednotlivých nukleotidů je: T= 35,5 %; C=17,5 %; A= 30,4 %; G= 16,6%. V souboru je 37 variabilních, z toho 35 parsimoniálně informativních míst. 18 haplotypů vykazuje haplotypovou diverzitu (h) 0,790 a celková nukleotidová diverzita je 0,0211 (Tab. V). Divergence všech sekvencí je 2,1 %. Průměrná genetická vzdálenost (distance) sekvencí v rámci lokalit (Tab. IV) je 0,0165 a průměrná genetická vzdálenost sekvencí mezi lokalitami (Příloha. 2) je 0,0209.

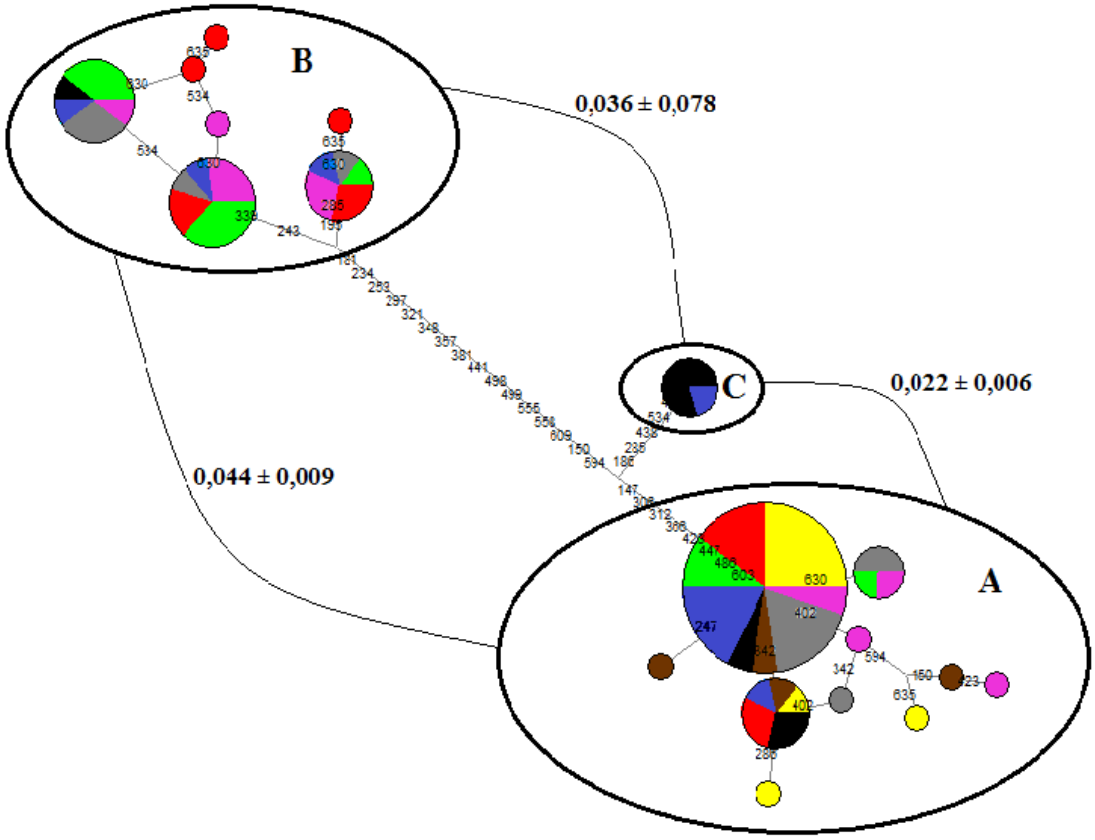
Tab. IV: Počet sekvencí a genetické vzdálenosti (GDa) uvnitř jednotlivých populací brouka *A. prodromus* na základě u markerů ITS1 a COI. ($\bar{x}$ GDa značí průměrnou genetickou vzdálenost).

Lokalita	COI		ITS1	
	Počet sekvencí	GDa	Počet sekvencí	GDa
České Budějovice	13	0,0204	7	0,0302
Dolejší Těšov	9	0,0183	1	n/c
Hořejší Těšov	12	0,0195	1	n/c
Rychnov nad Malší-hřbitov	11	0,0239	2	0,0043
Rychnov nad Malší-jámy	16	0,022	2	0
Svébohy	15	0,0241	9	0,0207
Vlčí Jámy	14	0,0013	5	0,0096
Tichá	5	0,0025	4	0,0053
$\sum$ sekvencí/ $\bar{x}$ Gda	**95**	**0,0165**	**31**	**0,0117**

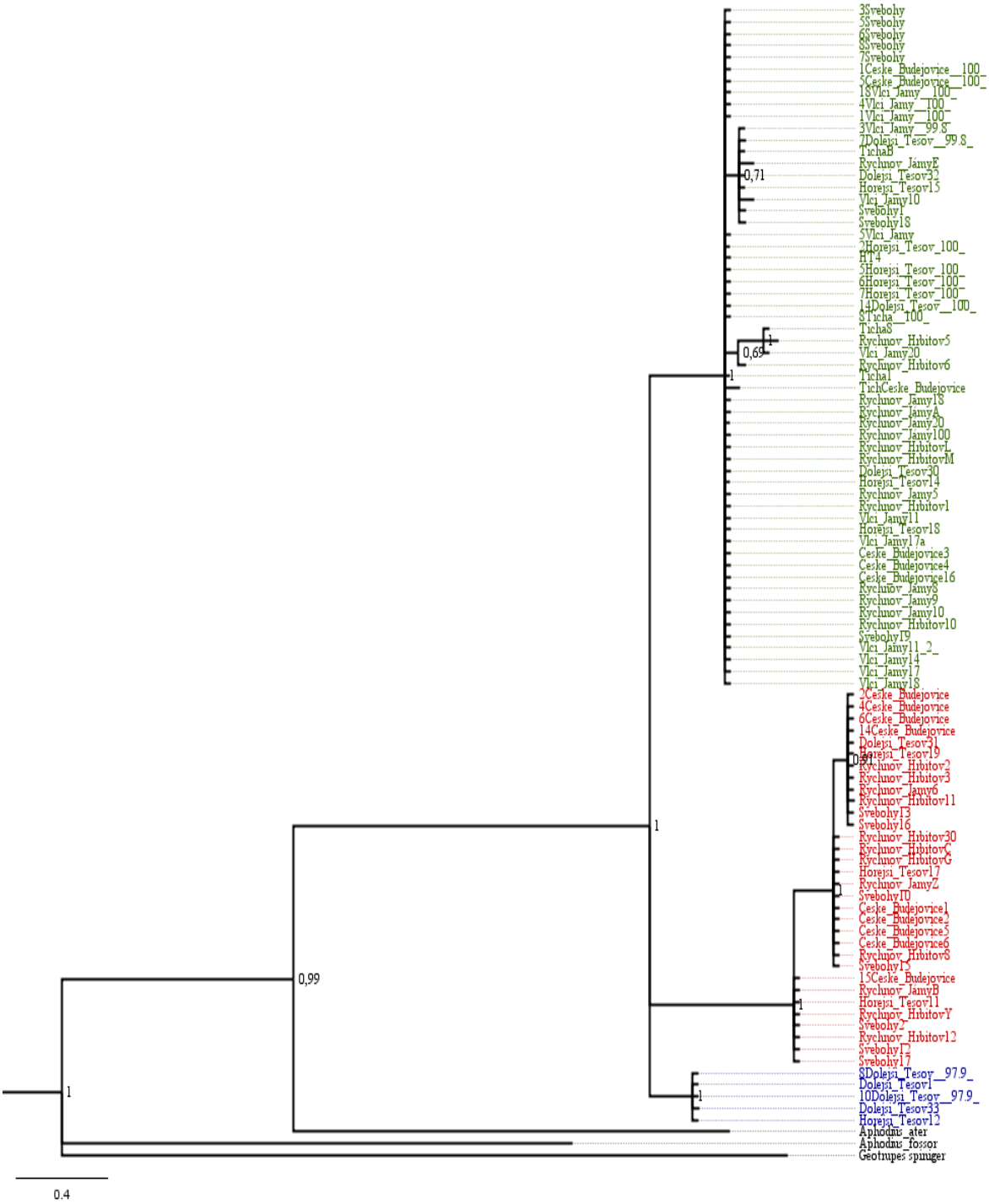
Tab. V: Statistiky nukleotidové diverzity markeru COI u *A. prodromus*: celková nukleotidová diverzita (π_T), průměrná nukleotidová diverzita uvnitř populací (π_S), průměrná nukleotidová diverzita mezi populacemi (δ_{ST}) a koeficient nukleotidové diferenciace (N_{ST}). Hodnoty S.E. (střední chyba průměru) byly vypočteny na základě 1000 bootstrapových opakování.

	Hodnota statistiky	S.E.
π_T	0,0220	0,004
π_S	0,0174	0,0031
δ_{ST}	0,0047	0,0009
N_{ST}	0,2122	0,0101

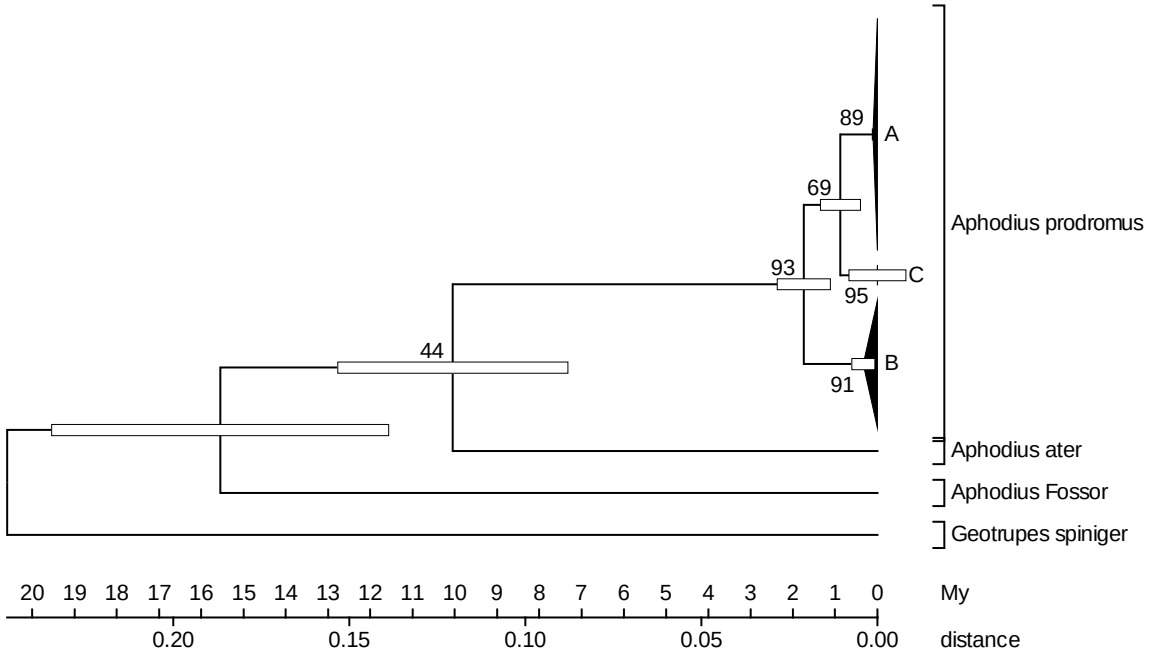
Jako nejvhodnější model substitucí nukleotidů pro výpočet stromů byl stanoven model Tamura 3-parametrový s distribucí gamma. Fylogramy vypočtené Bayesiánskou interferencí (Obr. 6) a maximum likelihoodem (Obr. 7) se liší v určení příbuznosti haplotypu C ke zbývajícím jasně odlišeným skupinám A, B. I haplotypová síť ukazuje dvě větší odlišné rodiny haplotypů (A a B) (Obr. 5), ale sekvence z jednotlivých lokalit netvoří ve fylogramu ani haplotypové síti zřetelné skupiny, není zřejmá téměř žádná populační struktura závislá na geografické vzdálenosti. Tento výsledek potvrzuje i Mantelův test, který průkaznou korelaci mezi geografickou a genetickou vzdáleností populací brouka *A. prodromus* neodhalil (R2=0,0018;p=0,12). Pouze haplotypy Vlčích Jam a Tiché jsou typické pro skupinu A. Také byl nalezen privátní haplotyp (C) vyskytující se pouze u jedinců z Hořejšího a Dolejšího Těšova, ale mezi brouky z Těšovů byly nalezeny i haplotypy ze skupin A a B. Genetická vzdálenost mezi skupinami A, B a C je 0,0341 (Obr 5.) a průměrná vzdálenost uvnitř těchto skupin je 0,0017. Upravená genetická divergence mezi skupinami A a B, která bere v potaz i vnitropopulační variabilitu (Nei a Kumar 2000) je 0,0418. Při použití této hodnoty a za předpokladu standartní mutační rychlosti pro mtDNA členovců (Brower 1994) je čas divergence linií A, B 1,752 My (S.E. = 0,008).



Obr. 5.: Síť haplotypů COI hnojníka jarního počítaná v programu Network 4.6. Drobná čísla na spojnicích haplotypů představují bodové mutace mezi nimi. Písmena A, B a C označují tři odlišné rodiny haplotypů. Barevné výseky koláčového grafu znamenají proporční zastoupení jedinců jednotlivých lokalit v rámci haplotypu, čísla na oblých spojnicích mezi haplotypy označují genetickou vzdálenost (GDa) ± S.E. (střední chyba průměru). Vlčí Jámy – žlutá; Svébohy – červená; České Budějovice – zelená; Hořejší Těšov – modrá; Dolejší Těšov – černá; Tichá – hnědá; Rychnov Jámy – šedá; Rychnov Hřbitov – růžová.



Obr. 6:Fylogram jedinců *Aphodius prodromus* vypočtený programem MrBayes 3.1 na základě markeru COI. Analýza měla 4000000 generací, vzorkování probíhalo každou 200 generaci a burnin byl nastaven na 3000. Pro výpočet byl použit model Tamura 3- parameter s Gamma distribucí pravděpodobností změn jednotlivých nukleotidů. Frekvence změn byla pro každou pozici kodonu počítána zvlášť. U uzlů, kde bootstrapová podpora přesahuje 0,5 je tato hodnota uvedena. Jako outgroup byly použity sekvence COI dvou příbuzných brouků rodu *Aphodius* a brouk *Geotrupes spiniger*. Zelenou barvou označen klastr A, červenou klastr B a modrou klastr privátního haplotypu Horního a Dolního Těšova (C).



Obr. 7: Linearizovaný fylogram populací brouka *Aphodius prodromus* s osou kalibrovaných molekulárních hodin vytvořen na základě markeru COI, metodou maximum likelihood (Close-Neighbor-Interchange), při použití modelu Tamura 3-parametr a rozložení gamma. U uzlů jsou uvedeny hodnoty bootstrapových (počet replikací-1000) pravděpodobností a interval odhadovaného času divergence (2xS.E.) Pro kalibraci byla použita standardní mutační rychlost pro mtDNA členovců, 1,2% mutací za milion let (Brower 1994)

4.1.2. ITS 1

Kvůli značným problémům s optimalizací PCR reakce a sekvenováním tohoto markeru bylo získáno jen 30 použitelných sekvencí z různých jedinců, ačkoliv izolované templátové DNA bylo ze 137 jedinců. Konečná alignovaná matice je 1246 bazí dlouhá, ale délky jednotlivých sekvencí se značně liší, nejkratší s 695 a nejdelší s 1241 bazemi. Průměrné nukleotidové složení je T = 16,8%; C = 31,3%; A = 19,5%; G = 32,4%. V matici je 137 variabilních a 58 parsimonálně informativních pozic. Jelikož alignment obsahuje velké množství mezer (gaps) vzniklých pravděpodobně inzerční nebo deleční změnou (indel) a přítomny jsou i bodové mutace můžeme odlišit dva druhy haplotypů. Těch, které se liší pouze ve změnách nukleotidů (indel změny se nezapočítávají) je 11 s haplotypovou diverzitou 0,789. Těch, které se liší indel změnou (bodové mutace nejsou brány v potaz) je 21 a jejich haplotypová diverzita je 0,966. Průměrná divergence všech sekvencí je 1,9%.

4.2. *Geotrupes spiniger* a *G. stercorarius*

4.2.1. COI

U *G. spiniger* bylo zaklonováno 25 sekvencí, ale čistá mitochondriální sekvence byla získána pouze u 22 jedinců. U *G. stercorarius* bylo získáno 28 sekvencí (Tab. VI). Alignovaná matice se sekvencemi obou druhů o délce 629 b, obsahuje 72 variabilních a 51 parsimoniálně informativních pozic. Nukleotidové složení je T = 38,3%; C = 16,2%; A = 27,7%; G = 17,8%. 10 haplotypů u *G. stercorarius* vykazuje značně vysokou haplotypovou diverzitu (h) 0,841 a u *G. spiniger* je tato hodnota s 23 haplotypy ještě větší (h=0,972). Nukleotidová diverzita u *G. spiniger* je 0,0060 a u *G. stercorarius* je 0,0068 (Tab. VII). Genetická vzdálenost uvnitř druhu *G. spiniger* je 0,006 a uvnitř *G. stercorarius* je 0,007; vzdálenost mezi oběma druhy je 0,074.

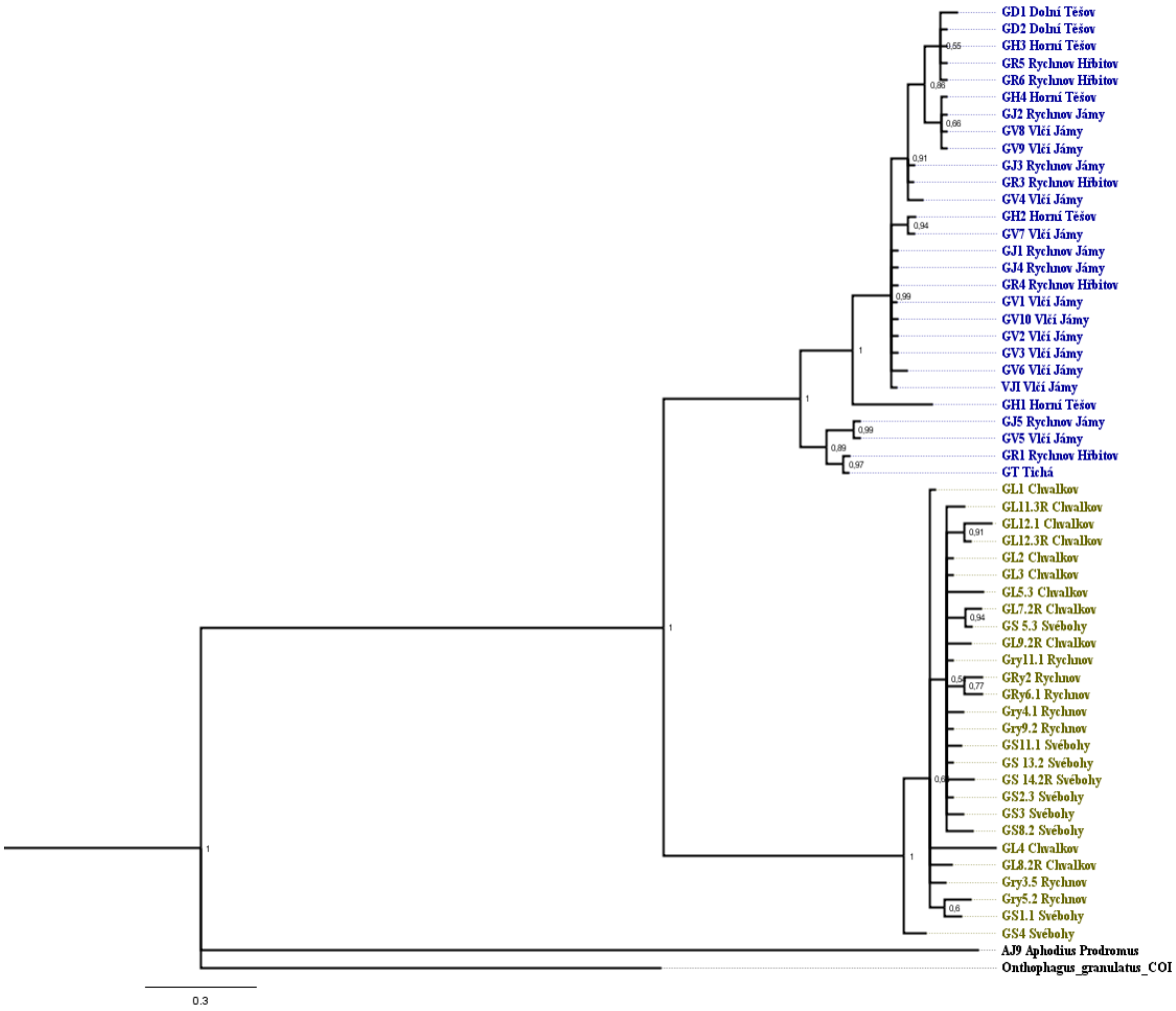
Jako nejvhodnější model substitucí nukleotidů pro výpočet stromů byl stanoven model Tamura 3-parametrový s distribucí gamma. Fylogramy vypočtené Bayesiánskou interferencí (Obr. 8), Maximum likelihoodem a metodou Minimal evolution jsou velmi kongruentní a zřetelně odlišují zkoumané druhy. Podobnou informaci dává i haplotypová síť (Obr. 9). V rámci obou druhů jsou populace na fylogramu přítomny ve více klastrech, tedy o strukturovanosti se nedá příliš uvažovat. Mantelův test neodhaluje průkaznou korelaci mezi geografickou a genetickou vzdáleností populací u obou chrobáků ($R^2_{Stercorarius}$ = 0,0042/ p=0,13; $R^2_{Spiniger}$ = 0,0046/p=0,37).

Tab. VI: Počet sekvencí a genetické vzdálenosti u *G. stercorarius* a *G. spiniger*.

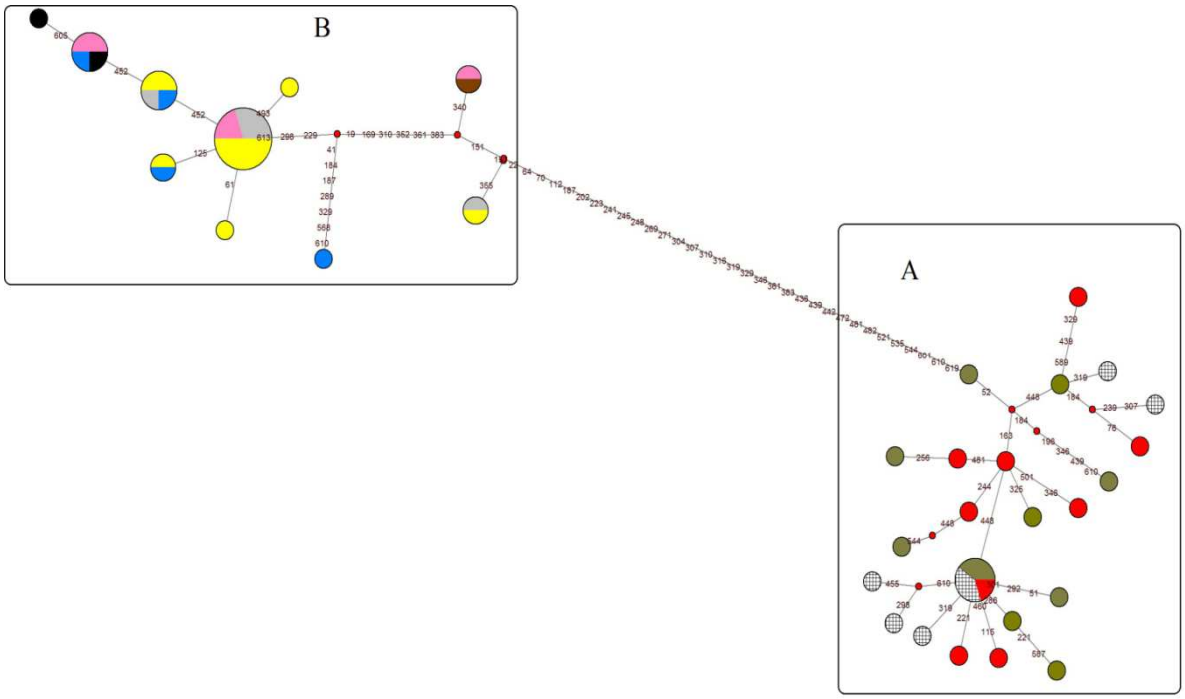
Druh	Lokalita	COI		ITS1	
		N sekvencí	GDa	N sekvencí	GDa
Geotrupes stercorarius	Dolejší Těšov (Dolní)	2	0,0016	1	n/c
	Hořejší Těšov (Horní)	4	0,0104	2	0,0617
	Rychnov nad Malší-hřbitov	5	0,0075	4	0,0005
	Vlčí Jámy	11	0,0047	9	0,0137
	Tichá	1	n/c	1	n/c
	Rychnov nad Malší-jámy	5	0,0079	2	0,0161
	∑ sekvencí/ $\bar{x}$ GDa (*stercorarius*)	28	0,007	19	0,036
Geotrupes spiniger	Rychnov	7	0,0047	5	0,0009
	Svébohy	9	0,0059	10	0,0017
	Chvalkov	11	0,0068	7	0,0003
	∑ sekvencí/ $\bar{x}$ GDa (*spiniger*)	27	0,006	22	0,002
	∑ sekvencí/ $\bar{x}$ GDa	**55**	**0,074**	**41**	**0,042**

Tab.VII Statistiky nukleotidové diverzity markeru COI u *G. stercorarius* a *G. spiniger*: celková nukleotidová diverzita (π_T), průměrná nukleotidová diverzita uvnitř populací (π_S), průměrná nukleotidová diverzita mezi populacemi (δ_{ST}) a koeficient nukleotidové diferenciace (N_{ST}). Hodnoty S.E. (střední chyba průměru) byly vypočteny na základě 1000 bootstrapových opakování.

	π_T	S.E.	π_S	S.E	δ_{ST}	S.E	N_{ST}	S.E
G. stercorarius	0,0063	0,0015	0,0065	0,0015	-0,0002	0,0003	-0,0374	0,0003
G. spiniger	0,0061	0,0013	0,0059	0,0013	0,0002	0,0002	0,0270	0,0305



Obr. 8: Fylogram *G. stercorarius* (modrá) a *G. spiniger* (zelená) vypočtený programem MrBayes 3.1 na základě markeru COI. Modrou barvou označeny vzorky sbírané v jarním období, zeleně vzorky z léta a černý outgroup. Analýza měla 2000000 generací, vzorkování probíhalo každou 200 generaci a burnin byl nastaven na 2000. Pro výpočet byl použit model Tamura 3- parameter s Gamma distribucí pravděpodobností změn jednotlivých nukleotidů. Frekvence změn byla pro každou pozici kodonu počítána zvlášť U uzlů, kde bootstrapová podpora přesahovala 0,5, jsou tyto hodnoty uvedeny. Jako outgroup byla zvolena sekvence COI brouka *Aphodius prodromus* a *Ontophagus granulatus.*



Obr. 9: Síť haplotypů COI chrobáků velkých a chrobáků *Geotrupes spiniger* vyprodukovaná programem Network 4.6 pomocí metody median joining s e=0). Barvy označují proporční zastoupení jedinců jednotlivých lokalit v rámci haplotypu. Vlčí Jámy – žlutá; Svébohy – červená; Hořejší Těšov – modrá; Dolejší Těšov – černá; Tichá – hnědá; Rychnov Jámy – šedá; Rychnov Hřbitov – růžová; Rychnov – černobíle mřížkovaná; Chvalkov – Zelná. Písmena „A“ a „B“ označují klastry, o kterých je pojednáno v textu.

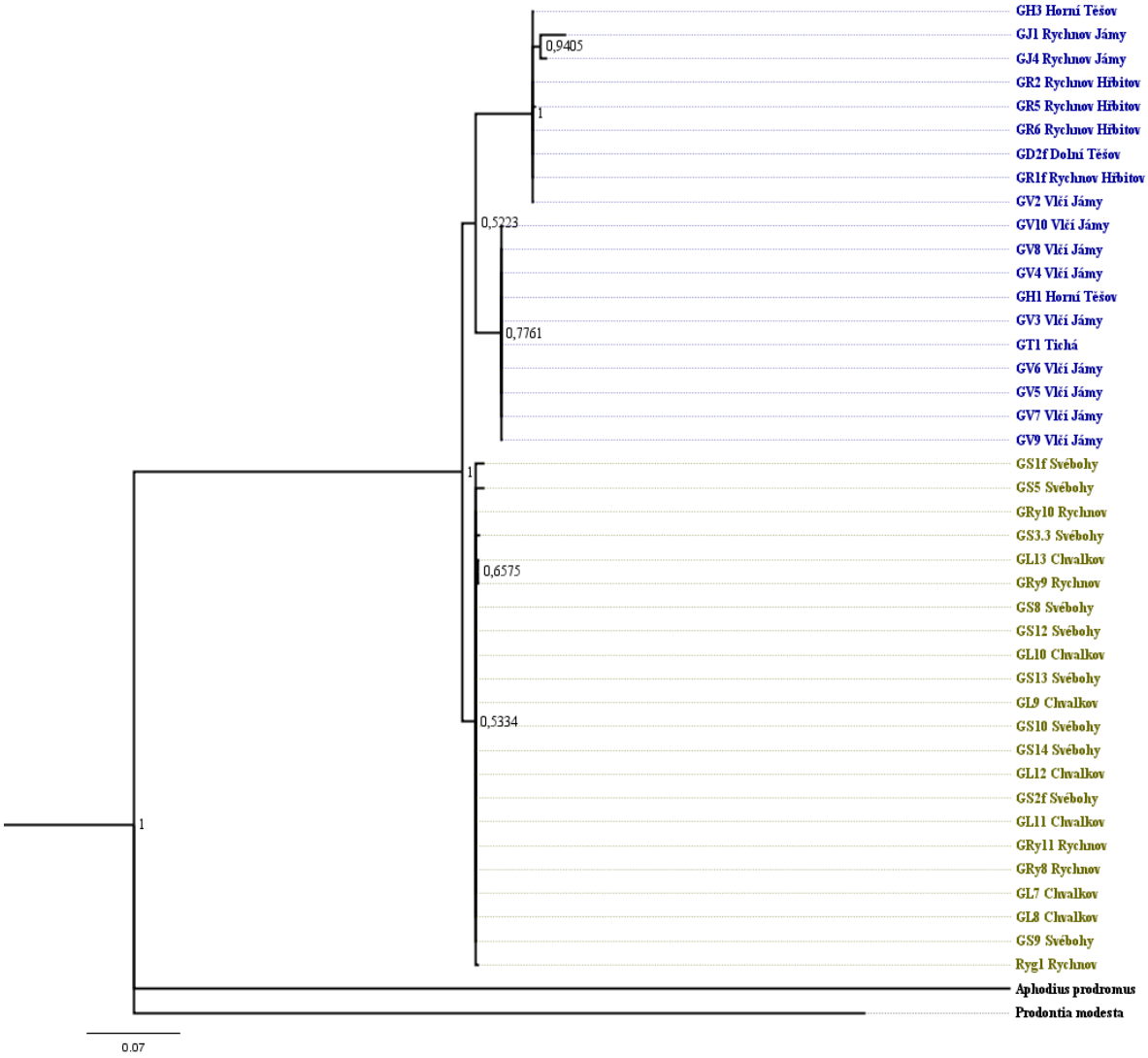
4.2.2. ITS1

Bylo získáno 41 sekvencí obou druhů, v alignované matici dlouhé 684 b je 61 variabilních a 46 parsimonálně informativních míst. Sekvence se liší délkou, nejkratší obsahuje 352 a nejdelší 681 bazí. Průměrné nukleotidové složení je T = 14,2%; C = 35,3%; A = 17,0%; G = 33,5%. Jelikož alignment obsahuje velké množství mezer (gaps) vzniklých pravděpodobně inzerční nebo deleční změnou (indel) a přítomny jsou i bodové mutace můžeme odlišit dva druhy haplotypů. Těch, které se liší pouze ve změnách nukleotidů (indel změny se nezapočítávají) je u *G. spiniger* 5 s haplotypovou diverzitou 0,338. Těch, které se liší indel změnou (bodové mutace nejsou brány v potaz) jsou u *G. spiniger* 3 s haplotypovou diverzitou 0,255 a nukleotidová diverzita je u tohoto druhu 0,0021. U *G. stercorarius* jsou 4 haplotypy odlišné bodovou mutací (h=0,614) a 8 haplotypů lišících se indel změnou (h=0,729) Nukleotidová diverzita je u *G. stercorarius* 0,0350 Genetická vzdálenost uvnitř

druhu *G. spiniger* je 0,0020 a v rámci *G. stercorarius* je 0,0360; vzdálenost mezi oběma druhy je 0,0420.

Jako nejvhodnější model substitucí nukleotidů pro výpočet stromů byl stanoven model Tamura 3-parametrový s pravděpodobností frekvence mutací stejnou u všech bazí. Fylogramy vypočtené Bayesiánskou interferencí (Obr. 10), „Maximum likelihoodem“ a metodou „Minimal evolution“ jsou až na detaily velmi kongruentní a jasně odlišují oba dva druhy chrobáků, u *G. spiniger* není téměř žádná strukturovanost – všichni jedinci jsou v polytomii. U *G. stercorarius* jsou evidentní dva klastry částečně oddělující populace z Rychnovů a Vlčích Jam.

ILD test vyloučil kompatibilitu matic COI a ITS1 ($p= 0,00006$), markery tedy nedávají signifikantně souladný fylogenetický signál, matice proto nejde spojit.



Obr. 10: Fylogram *G.stercorarius* (modrá) a *G. spiniger* (zelená) vypočtený programem MrBayes 3.1 na základě markeru ITS1. Analýza měla 2000000 generací, vzorkování probíhalo každou 200 generaci a burnin byl nastaven na 2000. Pro výpočet byl použit model Tamura 3- parameter se stejnou pravděpodobností změny jednotlivých nukleotidů. U uzlů kde bootstrapová podpora přesahovala 0,5, jsou tyto hodnoty uvedeny. Jako outgroup byla zvolena sekvence ITS1 brouka *Aphodius prodromus* a *Prodontia modesta.*

5. Diskuze

Tato práce navazuje na alozymovou studii populační struktury *A. prodromus* v jižních Čechách (Vrbová 2011) a přináší nová, robustní data přispívající k poznání fylogeografie koprofágních brouků na lokální úrovni. Tyto informace jsou cenné zvláště pro svou unikátnost, jelikož doposud nebyla, kromě výše zmíněné práce, populační struktura *A. prodromus* studována.

Dále práce přináší již méně robustní, ale taktéž unikátní vhled do populační struktury dvou koprofágních brouků *G. spiniger* a *G.stercorarius* na stejné geografické škále jako u *A. prodromus* a ověřuje schopnost vybraných molekulárních markerů odlišit tyto dva příbuzné druhy.

5.1. **Funkčnost zvolených markerů**

Univerzální ani jiné pro brouky nespecifické EPIC sekvence nebyly úspěšně amplifikovány. Pro použití těchto markerů by bylo nutné vytvoření specifických primerů pomocí metody izolace RNA, tvorby transkriptomové knihovny a navrhnutí specifických primerů v okrajových oblastech genů.

Amplifikace části mitochondriálního genu COI probíhala u brouků *G. stercorarius* a *A. prodromus* naprosto bez problému, avšak u *G. spiniger* primery amplifikovaly i oblast jaderného pseudogenu (NUMT), takže bylo nutno PCR produkt následně zaklonovat, což značně prodloužilo laboratorní práce. Tyto NUMTy jsou v rámci hmyzu docela časté u sarančí a mšic, ale v řádu brouků byl jejich výskyt prokázán jen v několika málo případech (Bertheau et al. 2011, Pons a Vogler 2005).

Větší obtíže s amplifikací oblasti ITS1 byly u všech druhů, možnou příčinou byla přítomnost neznámých PCR inhibitorů. U *A. prodromus* byly tyto inhibitory obsaženy pravděpodobně v očích, podobně jako už zjistil Boncristiani et al. (2011) u včel. Tento problém byl vyřešen odříznutím hlavové části u *A. prodromus*, kde zůstala i hruď, a u všech vzorků pozitivně působilo použití 5xOptizyme enhanceru a naředění templátové DNA.

5.2. **Variabilita zvolených markerů**

Nukleotidová diverzita COI byla u *A. prodromus* trojnásobná při porovnání s nukleotidovou diverzitou COI u brouka ze stejného rodu (*Aphodius fossor*) zkoumaného na mnohem větší geografické škále v rámci celého Finska (Roslin 2001), ale odlišnost haplotypů byla u mého druhu o méně než třetinu menší (h=0,79). Při porovnání celkové divergence sekvencí (2,2%) s hodnotami prací v Tab. I je má hodnota o polovinu nižší, avšak studie v

Tab. (I) zkoumali variabilitu na větší geografické škále. Z toho vyplývá, že informativnost (variabilita) markeru COI pro *A. prodromus* je oproti očekávání velmi vysoká.

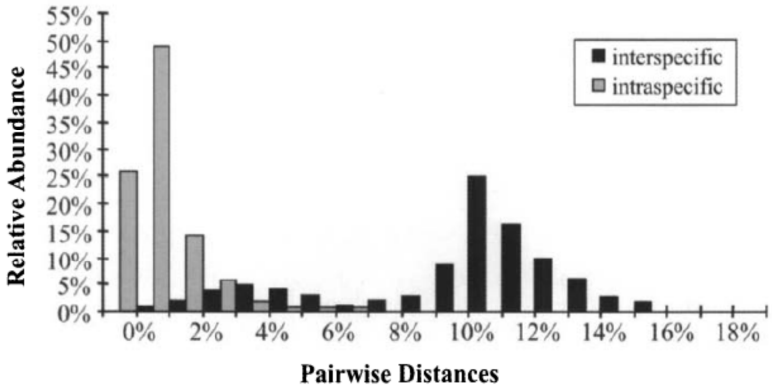
Marker ITS1 je ještě variabilnější (*h*=0,789/0,966) a to hlavně díky délkovému polymorfismu, který je opravdu unikátní, neboť délka fragmentu se pohybuje v rozmezí695-1241bp. Celková divergence sekvencí je na daný počet vzorků také dost vysoká (1,9%), ale tento marker byl amplifikován pouze u 30 jedinců, což jeho informační hodnotu velmi snižuje. Z těchto důvodů byl marker ITS1 z populační analýzy vyřazen.

U obou druhů *G. stercorarius* a *G. spiniger* nabývá vnitrodruhová nukleotidová diversita COI (π) podobných hodnot (0,006). V souladu s očekáváním je velmi nízká, třikrát nižší než nukletodiová diverzita u *A. prodromus* a čtyřikrát menší než u brouků příbuzného rodu *Trypocopris*, kteří byli zkoumání na větší geografické škále (Carisio et al. 2004).

Variabilita Markeru ITS1 je u *G. stercorarius* (π = 0,0350) řádově větší než u *G.spiniger* (π = 0,0021). U *G. stercorarius* je také mnohem více haplotypů odlišeno indel mutací. A průměrná genetická vzdálenost mezi všemi sekvencemi je u *G. stercorarius* na úrovni genetických vzdáleností, které byly zjištěny u nosatce *Ceutorhynchus neglectus* v rámci celé Severní Ameriky (Laffin 2005). Tento „patern“ ukazuje na nesoulad mezi signálem COI a ITS1, tedy různé mutační rychlosti mezi markery i druhy. Větší variabilitu markeru ITS1 než COI odhalil také Laffin (2005), ale pravděpodobný důvod jeho zjištění, byl nízký počet sekvencí COI.

5.3. **Schopnost markerů odlišit druhy *G. spiniger* a *G. stercorarius***

Genetické vzdálenosti jsou v rámci druhů velice nízké (0,007/0,006), desetkrát nižší než vzdálenost mezidruhová (0,074). Toto rozdělení genetických vzdáleností robustně podporuje taxonomické odlišení těchto dvou druhů. Meier et al. (2006) při rozsáhlém testování „DNA barcodového“ markeru zjistil, že desetinásobný rozdíl mezi vnitrodruhovou a mezidruhovou genetickou vzdáleností je s vysokou pravděpodobností dostačující pro odlišení druhů (Obr. 11). Podle této práce jsou ale lepším měřítkem pro odlišení druhů fylogramy, které u obou dvou testovaných markerů ze 100% bootstrapovou podporou odlišují klastry druhů *G. stercorarius* a *G.spiniger*.



Obr. 11: Porovnání mezidruhových a vnitrodruhových genetických vzdáleností barcodového markeru v rámci jednoho rodu (Meier et al. 2006).

5.4. **Populační struktura**

5.4.1. *A. prodromus*

Ačkoliv je genetická variabilita relativně vysoká, většina haplotypů se vyskytuje v rámci všech lokalit. Koeficient Nst (0,212), poukazuje na nezanedbatelnou avšak menší nukleotidovou diferenciaci mezi geografickými populacemi. Ve studii brouků rodu *Trypocopris* bylo zjištěné Nst = 0,722 (Carisio et al. 2004) tato hodnota analogická fixačnímu indexu F_{ST} již značí velkou diferenciaci mezi populacemi, studie však byla provedena na řádově větší geografické škále. Mantelův test u *A. prodromus* neprokázal žádnou korelaci mezi geografickou a genetickou vzdáleností. Všechny tyto informace svědčí o nepřítomnosti jakékoliv populační struktury závislé na geografické vzdálenosti.

Výsledky jsou tedy v mírném rozporu s předchozí studií populační struktury stejných jedinců *A. prodromus*. Na základě alozymů Vrbová (2011) zjistila vysoký fixační index F_{ST} (0,445) a tedy přítomnost subpopulací a nízkou migrační schopnost mezi nimi. Avšak ani její genetická vzdálenost nebyla průkazně korelována se vzdáleností geografickou. V jednom se ale práce shodují, v rámci lokálních populací pohyblivého brouka je přítomna nadmíru velká genetická variabilita.

Mnou zjištěná variabilita je vysvětlitelná přítomností geograficky nezávislých geneticky příbuzných skupin, mezi nimiž je genetická vzdálenost značně vysoká (Obr. 5). V haplotypové sítí i fylogramech jsou zřetelně odlišeny tři haploskupiny A, B a C, které se na území jižních Čech vyskytují sympatricky. Třetí skupina (C) tvořena pěti jedinci obsahuje pouze jeden haplotyp a vyskytuje se jen na blízkých lokalitách Dolejšího a Hořejšího Těšova. Možným vysvětlením zjištěné struktury je, že tuto populaci tvoří jedinci s vysokou filopatrií.

Avšak tento závěr je třeba brát s ohledem na nízký počet sekvenovaných jedinců v této skupině.

Skupiny A a B obsahují již reprezentativnější vzorek (58 a 32 jedinců) mezi nimiž je upravená genetická vzdálenost 0,042. Řádově podobná hodnota divergence (0,030) byla zjištěna ve studii Akamina et al. (2011) u brouka *Phelotrupes auratus* na území celého Japonska a Carisia et al. (2004) průměrně 0,020 u brouků rodu *Trypocopris* na území jižní Evropy. V obou těchto studiích touto divergencí odlišili poddruhy studovaných brouků.

Divergence 0,042 mezi skupinami A a B odpovídá 1,1 – 2,4 miliónům let oddělení těchto linií. Ačkoliv je třeba s odhadem vnitrodruhové doby divergence nakládat obezřetně, interval, jehož amplituda je dána 2x hodnotou S.E., se překrývá se začátkem pleistocenních dob ledových, které značně ovlivnili vnitrodruhovou genetickou variabilitu všech organizmů (Hewitt 2000). Tento vzorec pleistocenního rozdělení, který se objevuje u mnoha evropských druhů (Avise 2000) byl nejpravděpodobněji způsoben opakovanou izolací druhu v různých refugiích za dob ledových. Při zpětném setkávání takto geograficky izolovaných populací se sympatricky mohou vyskytovat dva velmi blízké druhy (poddruhy) v kontaktní zóně a podle míry reprodukční izolace mohou vznikat i hybridní jedinci. V rámci Čech byly kontaktní zóny prokázány u motýlů i savců (Bozikova et al. 2005, Schmitt a Muller 2007).

Tedy jedním z vysvětlení pro pozorované rozdělení geneticky významně odlišných sympatricky se vyskytujících jednotek může být přítomnost kryptických podskupin v rámci *A. prodromus* stýkajících se na kontaktní zóně. Tuto hypotézu by bylo nutné dále testovat fylogeografickou analýzou na větší geografické škále a pro větší robustnost také pomocí jaderných molekulárních markerů. Je pravdou, že v rodu *Aphodius* by případ rozlišení kryptických druhů v rámci morfologicky uznávané jednotky nebyl novinkou. Wilson (2001) poukázal na genetickou odlišnost (rozdílný karyotyp) dvou skupin v rámci, do té doby uznávaného jediného druhu *A. fimetarius*. Pro jednu skupinu navrhl jméno *A. pedellus* posléze byly nalezeny i jemné morfologické znaky odlišující tento taxon od *A. fimetarius*.

Fakt, že podrod *Melinopterus,* do kterého mnou studovaný brouk patří, je nejsložitější skupinou pro morfologické určení jednotlivých druhů v rámci rodu *Aphodius* (Tesař 1957), naznačuje druhé možné vysvětlení. Na lokalitách se vyskytuje velice podobný druh *A. sphacelatus* (Šlachta et al. 2008b). Část vzorků mohla být tedy zaměněna právě za tento druh, který pak v analýze vytvořil s druhem *A. prodromus* zřetelně odlišitelné skupiny A a B. Tato hypotéza je lehce ověřitelná osekvenováním referenčně určených druhů brouků a následnou analýzou původního souboru dat. Dalším možným taxonem, který se teoreticky mohl „přimíchat“ do vzorků označených jako *A. prodromus* je *A. reyi*. Tento druh je morfologicky

velice podobný *A. prodromus*, především samice obou druhů jsou velmi špatně odlišitelné na základě vnějších morfologických znaků (Baraud 1992). Z tohoto důvodu je také současné rozšíření *A. reyi* na území České republiky známé jenom fragmentárně. Samci obou těchto druhů se determinují mnohem snáz, takže řešením by byla kontrola determinace samců ve vzorcích dosud považovaných za *A. prodromus*, zda nejsou „kontaminované“ tímto příbuzným druhem.

5.4.2. *G. spiniger* a *G. stercorarius*

Z důvodu zmatených popisků *G. spiniger* a *G. stercorarius* školitelem specialistou byly tyto dva druhy považovány za jeden, jehož populační struktura měla být porovnávána se strukturou *A. prodromus*. Počet vzorků jednotlivých druhů se po zjištění této situace zmenšil na polovinu, navíc se lokality nasbíraných jedinců nepřekrývají (vzorky *G. spiniger* byly sebrány pouze z blízkých pastvin v Novohradských horách). Výsledky populační struktury jsou tedy nezanedbatelně ovlivněny nevhodným vzorkováním populací a neumožňují smysluplné provedení zamýšleného porovnání.

U brouka *G. spiniger* je u COI extrémně nízký koeficient N_{ST} (0,0270), který naznačuje žádnou diferenciaci nukleotidové diverzity mezi geografickými populacemi. Mantelův test v těchto maximálně 20km vzdálených populacích fenomén IBD očekávaně neprokázal. Téměř dokonalou homogenitu populací podporuje marker ITS1 (Obr. 10). Naopak zvláštní je extrémní počet haplotypů COI, téměř každý brouk má svůj specifický haplotyp (Obr. 9), což se projevuje vysokou haplotypovou diverzitou. Haplotypy se však mezi sebou liší malým počtem mutací, průměrná genetická vzdálenost mezi nimi je pouze 0,006. Na základě vysoké haplotypové diverzity můžeme říct, že je u *G. spiniger* přítomna jemná vnitropopulační variabilita, která však neodhaluje žádnou populační strukturu. Oblast ITS 1 je ještě mnohem méně variabilní a už rozhodně neříká nic o populační strukturovanosti.

U *G. stercorarius* je dokonce nukleotidová diverzita na základě COI uvnitř populací větší než diverzita celková (Tab. VII) a proto koeficient N_{ST} vychází jako malé záporné číslo, ale závěr, který z této statistiky vyplývá je stejný jako u předchozího druhu, žádná diferenciace nukleotidové diverzity mezi geografickými populacemi. Stejně tak i Mantelův test vyšel obdobně jako u *G. spiniger*. Ale strukturovanost populací u *G. stercorarius* je podle fylogramů obou dvou markerů větší než u *G. spiniger*. Podle markeru ITS tvoří jedinci z Vlčích Jam (s jednou výjimkou) a Tiché samostatnou sesterskou skupinu jedincům z Rychnova a Těšovů. I kdybychom pominuli nízkou bootstrapovou podporu tohoto uzlu a jiný signál markeru COI, nemůžeme o populační struktuře *G. stercorarius* uvažovat seriózně

z důvodu malého počtu sekvencí na lokalitu.

6. Závěr

Tato práce odhaluje unikátně velkou genetickou variabilitu v rámci druhu *A. prodromus* na lokální geografické škále. Možné vysvětlení je buď špatné určení vzorků, nebo přítomnost morfologicky zatím neodlišených sympatricky se vyskytujících podjednotek brouka *A. prodromus*. Osobně se přikláním spíše k druhé variantě, jelikož menší část vzorků byla znova odborně přeurčena a nebyla nalezena žádná chybovost v předchozím určení. Ale konečný závěr bude možno formulovat až po další analýze sekvencí referenčně určených brouků.

U druhů *G. spiniger* a *G. stercorarius* byla ověřena schopnost markerů ITS1 a COI odlišit příbuzné druhy. Evidentní populační strukturovanost u těchto dvou druhů nebyla nalezena. A o jejím možném náznaku je třeba uvažovat opatrně s ohledem na nízký počet získaných sekvencí na lokalitu.

7. Použitá Literatura

AKAMINE M, MAEKAWA K, KON M. 2011. Phylogeography of Japanese Population of Phelotrupes auratus (Coleoptera, Geotrupidae) Inferred from Mitochondrial DNA Sequences. Zoological Science 28: 652-658.

ANDUCHO-REYES MA, COGNATO AI, HAYES JL, ZUNIGA G. 2008. Phylogeography of the bark beetle Dendroctonus mexicanus Hopkins (Coleoptera:Curculionidae: Scolytinae). Molecular Phylogenetics and Evolution 49: 930-940.

AUSUBEL FM. 1992. Short protocols in molecular biology : a compendium of methods from Current protocols in molecular biology. New York ; Chichester: Wiley.

AVISE JC. 2000. Phylogeography : the history and formation of species. Cambridge, Mass. ; London: Harvard University Press.

AVISE JC. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. Journal of Biogeography 36: 3-15.

AVISE JC, ARNOLD J, BALL RM, BERMINGHAM E, LAMB T, NEIGEL JE, REEB CA, SAUNDERS NC. 1987. Intraspecific Phylogeography - the Mitochondrial-DNA Bridge Between Population-Genetics and Systematics. Annual Review of Ecology and Systematics 18: 489-522.

BANDELT HJ, FORSTER P, SYKES BC, RICHARDS MB. 1995. Mitochondrial Portraits of Human-Populations Using Median Networks. Genetics 141: 743-753.

BARAUD J. 1992. Coléoptères Scarabaeoidea d'Europe. Faune de France 78. Lyon: Fédération Française des Sociétés de Sciences Naturelles & Société Linnéenne de Lyon.

BEEBEE TJC, ROWE G. 2008. An introduction to molecular ecology. Oxford: Oxford University Press.

BENSASSON D, ZHANG DX, HARTL DL, HEWITT GM. 2001. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. Trends in Ecology & Evolution 16: 314-321.

BERTHEAU C, SCHULER H, KRUMBOCK S, ARTHOFER W, STAUFFER C. 2011. Hit or miss in phylogeographic analyses: the case of the cryptic NUMTs. Molecular Ecology Resources 11: 1056-1059.

BERTONE M, GREEN J, WASHBURN S, POORE M, SORENSON C, WATSON DW. 2005. Seasonal activity and species composition of dung beetles (Coleoptera : Scarabaeidae and Geotrupidae) inhabiting cattle pastures in North Carolina. Annals of the Entomological Society of America 98: 309-321.

BONCRISTIANI H, LI JL, EVANS JD, PETTIS J, CHEN YP. 2011. Scientific note on PCR inhibitors in the compound eyes of honey bees, Apis mellifera. Apidologie 42: 457-460.

BOZIKOVA E, MUNCLINGER P, TEETER KC, TUCKER PK, MACHOLAN M, PIALEK J. 2005. Mitochondrial DNA in the hybrid zone between Mus musculus musculus and Mus musculus domesticus: a comparison of two transects. Biological Journal of the Linnean Society 84: 363-378.

BRITO P, EDWARDS SV. 2009. Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. Genetica 135: 439-455.

BROUAT C, MONDOR-GENSON G, AUDIOT P, SENNEDOT F, LESOBRE L, RASPLUS JY. 2002. Isolation and characterization of microsatellite loci in the ground beetle Carabus nemoralis (Coleoptera, Carabidae). Molecular Ecology Notes 2: 119-120.

BROWER AVZ. 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly Heliconius erato inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91: 6491-6495.

BRUMFIELD RT, BEERLI P, NICKERSON DA, EDWARDS SV. 2003. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. Trends in Ecology & Evolution 18: 249-256.

BUISSON B, GROSFILLEY A, VICO L. 1985. The Role of the Ocular Function in the Circadian Endogenous and Locomotric Activity of the Dung Beetle (Geotrupes stercorarius). Journal of Interdisciplinary Cycle Research 16: 125-125.

CARISIO L, CERVELLA P, PALESTRINI C, DELPERO M, ROLANDO A. 2004. Biogeographical patterns of genetic differentiation in dung beetles of the genus Trypocopris (Coleoptera, Geotrupidae) inferred from mtDNA and AFLP analyses. Journal of Biogeography 31: 1149-1162.

CATERINO MS, CHO S, SPERLING FAH. 2000. The current state of insect molecular systematics: A thriving Tower of Babel. Annual Review of Entomology 45: 1-54.

COATES BS, SUMERFORD DV, MILLER NJ, KIM KS, SAPPINGTON TW, SIEGFRIED BD, LEWIS LC. 2009. Comparative Performance of Single Nucleotide Polymorphism and Microsatellite Markers for Population Genetic Analysis. Journal of Heredity 100: 556-564.

COGNATO AI, HARLIN AD, FISHER ML. 2003. Genetic structure among pinyon pine beetle populations (Scolytinae : Ips confusus). Environmental Entomology 32: 1262-1270.

CREER S. 2007. Choosing and Using Introns in Molecular Phylogenetics. Evolutionary Bioinformatics 3: 99-108.

CREER S, MALHOTRA A, THORPE RS. 2003. Assessing the phylogenetic utility of four mitochondrial genes and a nuclear intron in the Asian pit viper genus, Trimeresurus: Separate, simultaneous, and conditional data combination analyses. Molecular Biology and Evolution 20: 1240-1251.

CREER S, MALHOTRA A, THORPE RS, POOK CE. 2005. Targeting optimal introns for phylogenetic analyses in non-model taxa: experimental results in Asian pitvipers. Cladistics 21: 390-395.

DHUYVETTER H, DESENDER K. 2003. Isolation and characterization of microsatellite loci in the saltmarsh beetle Pogonus chalceus (Coleoptera, Carabidae). Molecular Ecology Notes 3: 460-461.

DHUYVETTER H, VERDYCK P, GAUBLOMME E, DESENDER D, MONDOR-GENSON G, RASPLUS JY. 2002. Isolation and characterization of microsatellite loci in the Galapagos Opuntia weevil Gerstaeckeria galapagoensis (Coleoptera, Curculionidae). Molecular Ecology Notes 2: 475-477.

DUGAN KA, LAWRENCE HS, HARES DR, FISHER CL, BUDOWLE B. 2002. An improved method for post-PCR purification for mtDNA sequence analysis. Journal of Forensic Sciences 47: 811-818.

FINN JA, GITTINGS T. 2003. A review of competition in north temperate dung beetle communities. Ecological Entomology 28: 1-13.

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. Mol Mar Biol Biotechnol 3: 294-299.

FRYDRYCHOVA R, MAREC F. 2002. Repeated losses of TTAGG telomere repeats in evolution of beetles (Coleoptera). Genetica 115: 179-187.

GARVIN MR, SAITOH K, GHARRETT AJ. 2010. Application of single nucleotide polymorphisms to non-model species: a technical review. Molecular Ecology Resources 10: 915-934.

GAZIEV AI, SHAIKHAEV GO. 2010. Nuclear mitochondrial pseudogenes. Molecular Biology 44: 358-368.

GITTINGS T, GILLER PS. 1997. Life history traits and resource utilisation in an assemblage of north temperate Aphodius dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae). Ecography 20: 55-66.

GITTINGS T, GILLER PS. 1998. Resource quality and the colonisation and succession of coprophagous dung beetles. Ecography 21: 581-592.

GREBENNIKOV VV, SCHOLTZ CH. 2004. The basal phylogeny of Scarabaeoidea (Insecta : Coleoptera) inferred from larval morphology. Invertebrate Systematics 18: 321-348.

HANSKI I. 1986. Individual behaviour, population dynamics and community structure of Aphodius (Scarabaeidae) in Europe. Acta Oecologica-Oecologia Generalis 7: 171-187.

HANSKI I, CAMBEFORT Y. 1991. Dung beetle ecology. Princeton: Princeton University Press.

HANTULA J, DUSABENYAGASANI M, HAMELIN RC. 1996. Random amplified microsatellites (RAMS) - A novel method for characterizing genetic variation within fungi. European Journal of Forest Pathology 26: 159-166.

HARRIS DJ, CRANDALL KA. 2000. Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda : Cambaridae): Implications for phylogenetic and microsatellite studies. Molecular Biology and Evolution 17: 284-291.

HELYAR SJ, HEMMER-HANSEN J, BEKKEVOLD D, TAYLOR MI, OGDEN R, LIMBORG MT, CARIANI A, MAES GE, DIOPERE E, CARVALHO GR, NIELSEN EE. 2011. Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: new opportunities and challenges. Molecular Ecology Resources 11: 123-136.

HEWITT G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. Nature 405: 907-913.

HILLIS DM, MORITZ C, MABLE BK. 1996. Molecular systematics. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.

HOLTER P, SOMMER C, GRONVOLD J, MADSEN M. 1993. Effects of ivermectin treatment on the attraction of dung beetles (Coleoptera: Scarabaeidae and Hydrophilidae) to cow pats. Bulletin of Entomological Research 83: 53-58.

HORN A, ROUX-MORABITO G, LIEUTIER F, KERDELHUE C. 2006. Phylogeographic structure and past history of the circum-Mediterranean species Tomicus destruens Woll. (Coleoptera : Scolytinae). Molecular Ecology 15: 1603-1615.

HUTTON SA, GILLER PS. 2003. The effects of the intensification of agriculture on northern temperate dung beetle communities. Journal of Applied Ecology 40: 994-1007.

CHOI SK, KIM KS, LEE H, ADAMCZYK JJ, GREENBERG SM, WESTBROOK JK, SAPPINGTON TW. 2011. Temporal Changes in Genetic Variation of Boll Weevil (Coleoptera: Curculionidae) Populations, and Implications for Population Assignment in Eradication Zones. Annals of the Entomological Society of America 104: 816-825.

JI YJ, ZHANG DX, HE LJ. 2003. Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. Molecular Ecology Notes 3: 581-585.

JUŘENA D, TÝR V, BEZDĚK A. 2008. Příspěvek k faunistickému výzkumu listorohých brouků (Coleoptera: Scarabaeoidea s. l.) na území České republiky a Slovenska. (Contribution to the faunistic research of Scarabaeoidea s. l. (Coleoptera) in the territory of the Czech Republic and Slovakia). Klapalekiana 44: 17-176.

KAJTOCH L, LACHOWSKA-CIERLIK D, MAZUR M. 2009. Genetic diversity of the xerothermic weevils Polydrusus inustus and Centricnemus leucogrammus (Coleoptera: Curculionidae) in central Europe. European Journal of Entomology 106: 325-334.

KATOH K, ASIMENOS G, TOH H. 2009. Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. Methods Mol Biol 537: 39-64.

KAZACHKOVA N, MEIJER J, EKBOM B. 2008. Genetic diversity in European pollen beetle, Meligethes aeneus (Coleoptera: Nitidulidae), populations assessed using AFLP analysis. European Journal of Entomology 105: 807-814.

KIM KS, SAPPINGTON TW. 2005. Genetic structuring of western corn rootworm (Coleoptera : Chrysomelidae) populations in the United States based on microsatellite loci analysis. Environmental Entomology 34: 494-503.

KLEMPERER HG. 1978. The repair of larval cells and other larval activities in Geotrupes spiniger Marsham and other species. (Coleoptera, Scarabaeidae). Ecological Entomology 3: 119-131.

KLEMPERER HG. 1979. An analysis of the nesting behaviour of Geotrupes spiniger. Marsham (Coleoptera, Scarabaeidae). Ecological Entomology 4: 133-150.

KLEMPERER HG. 1980. Kleptoparasitic behaviour of Aphodius rufipes (L.) larvae in nests of Geotrupes spiniger Marsh. (Coleoptera, Scarabaeidae). Ecological Entomology 5: 143-151.

LAFFIN RD. 2005. Population structure and phylogenetic relationships of Ceutorhynchus neglectus (Coleoptera : Curculionidae). Canadian Entomologist 137: 672-684.

LAFFIN RD, LANGOR DW, SPERLING FAH. 2004. Population structure and gene flow in the white pine weevil, Pissodes strobi (Coleoptera : Curculionidae). Annals of the Entomological Society of America 97: 949-956.

LAO O, VAN DUIJN K, KERSBERGEN P, DE KNIJFF P, KAYSER M. 2006. Proportioning whole-genome single-nucleotide-polymorphism diversity for the identification of geographic population structure and genetic ancestry. American Journal of Human Genetics 78: 680-690.

LEE SC, BAE JS, KIM I, SUZUKI H, KIM SR, KIM JG, KIM KY, YANG WJ, LEE SM, SOHN HD, JIN BR. 2003. Mitochondrial DNA sequence-based population genetic structure of the firefly, Pyrocoelia rufa (Coleoptera : Lampyridae). Biochemical Genetics 41: 427-452.

LEWONTIN RC, HUBBY JL. 1966. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of

heterozygosity in natural populations of Drosophila pseudoobscura. Genetics 54: 595-609.

LI SJ, SUN L, OSETO CY, FERRIS VR. 2008. Population structure in gray sunflower seed weevil (Coleoptera : Curculionidae), based on analyses of mitochondrial DNA and microsatellites. Annals of the Entomological Society of America 101: 204-214.

LIBRADO P, ROZAS J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25: 1451-1452.

LIU D, TRUMBLE JT, STOUTHAMER R. 2006. Genetic differentiation between eastern populations and recent introductions of potato psyllid (Bactericera cockerelli) into western North America. Entomologia Experimentalis Et Applicata 118: 177-183.

LOHSE K, SHARANOWSKI B, BLAXTER M, NICHOLLS JA, STONE GN. 2011. Developing EPIC markers for chalcidoid Hymenoptera from EST and genomic data. Molecular Ecology Resources 11: 521-529.

MANDER CV, PHILLIPS CB, GLARE TR, CHAPMAN RB. 2003. Preliminary assessment of COI and ITS1 sequence variation in Fuller's rose weevil. New Zealand Plant Protection, Vol 56 56: 190-193.

MANJERI G, MUHAMAD R, FARIDAH QZ, TAN SG. 2011. Genetic variation studies in Oryctes rhinoceros (L.) (Coleoptera: Scarabaeidae) from oil palm plantations using random amplified microsatellite (RAMs) markers. African Journal of Biotechnology 10: 2611-2617.

MARTÍN PIERA F. 2000. Coleoptera: Scarabaeoidea. Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales.

MEIER R, SHIYANG K, VAIDYA G, NG PKL. 2006. DNA barcoding and taxonomy in diptera: A tale of high intraspecific variability and low identification success. Systematic Biology 55: 715-728.

MENDE M, BISTROM O, MEICHSSNER E, KOLSCH G. 2010. The aquatic leaf beetle Macroplea mutica (Coleoptera: Chrysomelidae) in Europe: Population structure, postglacial colonization and the signature of passive dispersal. European Journal of Entomology 107: 101-113.

MILLER LJ, ALLSOPP PG. 2005. Phylogeography of the scarab beetle Antitrogus parvulus Britton (Coleoptera : Scarabaeidae) in south-eastern Queensland, Australia. Australian Journal of Entomology 44: 29-36.

MONAGHAN MT, INWARD DJG, HUNT T, VOGLER AP. 2007. A molecular phylogenetic analysis of the Scarabaeinae (dung beetles). Molecular Phylogenetics and Evolution 45: 674-692.

NEI M. 1987. Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University Press.

NEI M, KUMAR S. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. New York ; Oxford: Oxford University Press.

NYLANDER JAA, WILGENBUSCH JC, WARREN DL, SWOFFORD DL. 2008. AWTY (are we there yet?): a system for graphical exploration of MCMC convergence in Bayesian phylogenetics. Bioinformatics 24: 581-583.

PALESTRINI C, ZUNINO, M. & ZUCCHELLI, M. 1990. Sound production in the larvae of Geotrupes spiniger (Marsham) (Coleoptera: Geotrupidae). Bioacoustics 2: 209-216.

PEAKALL R, SMOUSE PE. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6: 288-295.

PIZZO A, ROGGERO A, PALESTRINI C, CERVELLA P, DEL PERO M, ROLANDO A. 2006. Genetic and morphological differentiation patterns between sister species: the case of Onthophagus taurus and Onthophagus illyricus (Coleoptera, Scarabaeidae). Biological Journal of the Linnean Society 89: 197-211.

PONS J, VOGLER AP. 2005. Complex pattern of coalescence and fast evolution of a mitochondrial rRNA pseudogene in a recent radiation of tiger beetles. Molecular Biology and Evolution 22: 991-1000.

RAHIMINEJAD V, HAJIQANBAR H, FATHIPOUR Y. 2011. New Species of the Genus Spatulaphorus (Acari: Heterostigmatina: Pygmephoridae) Phoretic on Geotrupes spiniger (Coleoptera: Geotrupidae) from Iran. Annales Zoologici 61: 547-551.

ROEHRDANZ RL, SZALANSKI AL, LEVINE E. 2003. Mitochondrial DNA and ITS1 differentiation in geographical populations of northern corn rootworm, Diabrotica barberi (Coleoptera : Chrysomelidae): Identification of distinct genetic populations. Annals of the Entomological Society of America 96: 901-913.

RONQUIST F, HUELSENBECK JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics 19: 1572-1574.

ROSLIN T. 2001. Spatial population structure in a patchily distributed beetle. Molecular Ecology 10: 823-837.

RZHETSKY A, NEI M. 1992. A Simple Method for Estimating and Testing Minimum-Evolution Trees. Molecular Biology and Evolution 9: 945-967.

SCHMITT T, MULLER P. 2007. Limited hybridization along a large contact zone between two genetic lineages of the butterfly Erebia medusa (Satyrinae, Lepidoptera) in Central Europe. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research 45: 39-46.

SMITH ABT. 2006. An overview of the classification and evolution of the major scarab beetle clades (Coleoptera : Scarabaeoidea) based on preliminary molecular analyses. Coleopterists Bulletin 60: 35-46.

STAUFFER C, LAKATOS F, HEWITT GM. 1999. Phylogeography and postglacial colonization routes of Ips typographus L-(Coleoptera, Scolytidae). Molecular Ecology 8: 763-773.

SWOFFORD DL. 2003. PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods) Version 4.04beta: Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts

ŠLACHTA M, FRELICH J, VÁCHAL J. 2008a. Měření diverzity koprofágních brouků: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta.

ŠLACHTA M, FRELICH J, SVOBODA L. 2008b. Seasonal biomass distribution of dung beetles (Scarabaeidae, Geotrupidae, Hydrophilidae) in mountain pastures of South-West Bohemia. Journal of Agrobiology 25: 163-176.

ŠLACHTA M, FRELICH J, TONKA T. 2009. Application of dung-baited pitfall trapping in monitoring study on diversity of coprophagous beetles (Coleoptera: Scarabaeidae, Geotrupidae, Hydrophilidae) in cattle pastures. Journal of Agrobiology 26: 83-99.

TAMURA K. 1992. Estimation of the Number of Nucleotide Substitutions When There Are Strong Transition-Transversion and G+C-Content Biases. Molecular Biology and Evolution 9: 678-687.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, KUMAR S. 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol 28: 2731-2739.

TESAŘ Z. 1957. Fauna ČSR 11- Brouci listonozí Lamellicornia II. - Scarabaeidaelaparosticti. Praha: NČSAV.

VAISANEN R, RASSI P. 1990. Abundance and distribution of Geotrupes stercorarius in. Finland (Coleoptera, Scarabaeidae). Entomologica Fennica 1: 107-111.

VOGLER AP, DESALLE R. 1993a. Phylogeographic patterns in Coastal North American Tiger Beetles (Cicindela dorsalis SAY) Inferred from Mitochondrial DNA sequences. Evolution 47: 1192-1202.

VOGLER AP, DESALLE R. 1994. Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle Cicindela dorsalis. Molecular Biology and Evolution 11: 393-405.

VOGLER AP, DESALLE R, ASSMANN T, KNISLEY CB, SCHULTZ TD. 1993. Molecular Population-Genetics of the Endangered Tiger Beetle Cicindela-Dorsalis (Coleoptera, Cicindelidae). Annals of the Entomological Society of America 86: 142-152.

VOGLER AP, DESALLE R, ASSMANN T, KNISLEY CB, SCHULTZ TD. 1993b. Molecular Population-Genetics of the Endangered Tiger Beetle Cicindela-Dorsalis (Coleoptera, Cicindelidae). Annals of the Entomological Society of America 86: 142-152.

VRBOVÁ K. 2011. Genetická variabilita koprofágních brouků na pastvinách. (Bakalářská práce). Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

WHITE DJ, WOLFF NJ, PIERSON M, GEMMELL NJ. 2009. Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. Molecular Ecology 18: 762-762.

WILSON CJ. 2001. Aphodius pedellus (Degeer), a species distinct from A. fimetarius (Linnaeus) (Coleoptera: Aphodiidae). Tijdschrift voor Entomologie 144: 137-143.

WRIGHT S. 1943. Isolation by Distance. Genetics 28: 114-138.

ZÚBER M. 2011. Listorozí brouci (Coleoptera: Scarabaeoidea) dolního Pojizeří. Elateridarium 5: 43-53.

8. Přílohy

Příloha 1: Souřadnice lokalit

Lokalita	GPS
České Budějovice	14°28′29″E, 48°58′29″N
Dolejší Těšov	13°25′38″E, 49°11′19″N
Hořejší Těšov	13°25′52″E, 49°11′0″N
Rychnov nad Malší-hřbitov	14°29′20″E, 48°40′0″N
Rychnov nad Malší-jámy	14°29′45″E, 48°39′31″N
Svébohy	14°43′20″E, 48°46′51″N
Vlčí Jámy	13°46′36″E, 48°55′13″N
Chvalkov	14°37′57″E, 48°47′46″N
Tichá	14°31′16″E, 48°38′28″N

Příloha 2: Průměrné genetické vzdálenosti mezi jednotlivými lokalitami (černě) a střední chyby průměru (modře), na základě COI u *A. prodromus*.

	Svébohy	České Budějovice	Vlčí Jámy	Hořejší Těšov	Dolejší Těšov	Tichá	Rychnov Jámy	Rychnov Hřbitov
Svébohy		0.0045	0.0040	0.0042	0.0044	0.0040	0.0042	0.0044
České Budějovice	0.0244		0.0059	0.0050	0.0053	0.0059	0.0047	0.0041
Vlčí Jámy	0.0215	0.0309		0.0024	0.0032	0.0008	0.0032	0.0047
Hořejší Těšov	0.0229	0.0269	0.0134		0.0036	0.0025	0.0038	0.0045
Dolejší Těšov	0.0253	0.0296	0.0154	0.0201		0.0033	0.0040	0.0047
Tichá	0.0220	0.0313	0.0018	0.0138	0.0157		0.0032	0.0047
Rychnov Jámy	0.0232	0.0253	0.0174	0.0208	0.0230	0.0178		0.0044
Rychnov Hřbitov	0.0239	0.0224	0.0249	0.0243	0.0268	0.0252	0.0238	