

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Genetická variabilita koprofágních brouků na pastvinách

Bakalářská práce

Kristýna Vrbová

Školitel: PaedDr. Martina Žurovcová, Ph.D., Biologické centrum AV ČR v.v.i.,
Entomologický ústav

Školitel specialista: Mgr. Martin Šlachta, Ph.D., Zemědělská fakulta, JU ČB

České Budějovice, 2011

Bibliografické údaje

Vrbová, K., 2011: Genetická variabilita koprofágních brouků na pastvinách. [Genetic variability of dung beetles on pastures. Bc. Thesis, in Czech.] – 40 p., Faculty of Science, The University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

The aim of this thesis was a research of the genetic variability of 8 populations of the dung beetle *Aphodius prodromus* using allozyme markers. Following population-genetic analysis were used to determine genetic structure of these populations: estimates of heterozygosity, Wright's F- statistics, estimates of gene flow, Mantel test, PCA, Nei's genetic distance, testing of Hardy-Weinberg equilibrium and linkage disequilibrium. The results revealed low gene flow between populations, low number of heterozygotes and disequilibrium within and between populations. Cluster analyses showed, that populations from Tichá and Rychnov nad Malší- hřbitov are genetically most different from other populations.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala 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, 3. 12. 2011

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Martině Žurovcové za odborné vedení, rady a poskytnutí literatury a Martinovi Šlachtovi za sběr vzorků, jejich determinaci a za konzultaci. Dále děkuji Lucii Kučerové za pomoc nejen v začátcích práce v laboratoři, ale také za konzultace ohledně statistických metod a za poskytnutí článků. Michale Korandové bych chtěla poděkovat za rady, které mi ochotně dávala. Velké díky patří také mé rodině, která mě podporovala po celou dobu studia a poskytla mi klid na práci, kdykoliv jsem potřebovala.

Obsah

1. ÚVOD	1
1.1. Koprofágní brouci.....	1
1.2. Funkční skupiny koprofágních brouků.....	2
1.3. Význam koprofágních brouků.....	2
1.4. Aphodius prodromus.....	3
1.5. Studie populací a genetických markerů.....	4
2. CÍL PRÁCE	6
3. MATERIÁL A METODY	7
3.1. Sběr vzorků.....	7
3.2. Alozymová elektroforéza.....	8
3.2.1. Studované enzymy.....	10
3.2.2. Homogenizace.....	11
3.2.3. Elektroforéza.....	11
3.2.4. Detekce alozymů.....	12
3.3. Statistická analýza.....	12
4. VÝSLEDKY	15
4.1. Charakteristiky variability.....	15
4.2. Hardy-Weinbergova rovnováha.....	16
4.3. Wrightovy F-statistiky.....	17
4.4. Genetický tok.....	18
4.5. Genetická vzdálenost.....	19
4.6. PCA (Analýza hlavních komponent).....	21
4.7. Vazebná nerovnováha (LD).....	22
5. DISKUZE	23
5.1. Studované enzymy.....	23
5.2. Variabilita.....	23
5.3. Hardy-Weinbergova rovnováha.....	24
5.4. Struktura populací.....	25
6. ZÁVĚR	27
7. POUŽITÁ LITERATURA	28
8. PŘÍLOHY	32

1. ÚVOD

1.1. Koprofágní brouci

Mezi koprofágní brouky patří zástupci čeledí *Scarabaeidae* (vrubounovití), *Geotrupidae* (chrobákovití), *Hydrophilidae* (vodomilovití) a *Staphylinidae* (drabčíkovití). Tito brouci jsou významní dekompozitoři, přispívají k odstranění exkrementů z pastvin, k jejich rozkladu a ke koloběhu živin (Hanski a Cambefort, 1991; Šlachta a kol., 2009b; Šlachta a kol., 2010). Porušením svrchní vrstvy výkalu podporují přístup bezobratlých a bakterií a vystavují jádro výkalu povětrnostním vlivům (Holter, 1979).

Koprofágní brouci se vyskytují na všech kontinentech kromě Antarktidy, celosvětově bylo popsáno více než 7000 druhů (Mittal, 2005).

Většina koprofágních brouků se živí čerstvým trusem savců, příležitostně i trusem ptačím a plazím. Mezi koprofágními brouky můžeme nalézt jak generalisty (nevykazují preference pro určitý typ výkalu), tak i specialisty s různým stupněm specializace (Vinod a Sabu, 2007). V severní a střední Evropě patří velká většina koprofágních brouků mezi generalisty a nejméně dvě třetiny z nich se vyskytuje na pastvinách. Potravu jsou schopni detekovat i na velké vzdálenosti, protože mají dobře vyvinutý čich (Hanski a Cambefort, 1991).

Koprofágní brouci přijímají potravu ve formě malých, spíše kapalných částecek o maximální velikosti 2-150 μm (záleží na velikosti a druhu brouka). Holter a kol. (2000, 2002) uvádí, že tento způsob příjmu potravy je broukům umožněn pomocí filtračního mechanismu v ústech, který vyřazuje větší částičky ještě před pozřením (Holter a Scholtz, 2007). Larvy většiny koprofágních brouků se také živí výkaly, ale díky kousacímu ústnímu ústrojí jsou schopny přijímat suchý a relativně tvrdý materiál (Gittings a Giller, 1997). Jednou z výjimek jsou larvy *Aphodius prodromus* (Brahm, 1790) a *Aphodius sphaelatus* (Panzer, 1798), které se mohou vyvíjet mimo výkal v rozkládajícím se rostlinném materiálu (Gittings a Giller, 1997). Larvy *Sphaeridium lunatum* (Fabricius, 1792) se sice vyvíjejí ve výkalu, ale živí se dravě (Hanski a Cambefort, 1991).

Významným rodem koprofágních brouků je rod *Aphodius* (Illinus, 1798), který je druhově nejpočetnějším rodem v oblasti mírného pásma. Jedná se o malé až středně velké brouky, 3-13 mm (Landin, 1957). Několik druhů tohoto rodu bylo introdukováno do Austrálie ve snaze zamezit hromadění dobytčích výkalů na pastvinách (Doubé a kol., 1991).

1.2. Funkční skupiny koprofágních brouků

Podle strategie rozmnožování jsou koprofágní brouci rozdělováni do tří funkčních skupin (Hanski a Cambefort, 1991; Vinod a Sabu, 2007). „Dung dwellers“ omezují svou reprodukci a larvální vývoj pouze na výkal a jeho bezprostřední okolí, případně jsou částečnými saprofágy a fytofágy. Většinou se jedná o malé brouky, kteří ale preferují spíše větší výkaly herbivorů. Mezi „dung dwellers“ řadíme zástupce čeledi *Scarabaeidae* (podčeleď *Aphodiinae*) a *Hydrophilidae*.

„Tuneláři“ (anglicky „tunnelers“) budují podzemní hnízda, ve kterých se vyvíjejí larvy na částech výkalu zahrabaných do země. Výhodou hnízd je ochrana před kompetitory a predátory a proti nepříznivým klimatickým podmínkám. „Tuneláři“ jsou brouci patřící do čeledi *Scarabaeidae* (podčeleď *Coprinae*) a *Geotrupidae*.

Skupina „válečů“ (anglicky „rollers“) výkal nejprve přesune do určité vzdálenosti od původního místa a pak ho zahrabe. Výkal je rolován do koulí, které jsou využívány jako zdroj potravy a místo pro vývoj (Holter a kol., 2002). „Váleči“ jsou v České republice zastoupeni pouze jedním nehojným druhem *Sisyphus schaefferi* (Šlachta a kol., 2009b).

1.3. Význam koprofágních brouků

Přítomnost koprofágních brouků na pastvinách je velmi žádoucí, jelikož se podílejí na rozkladu výkalů. Místa, která jsou pokryta exkrementy, nejsou skotem spásána, a proto urychlení rozkladu výkalů umožňuje efektivnější využití pastvin (Hanski a Cambefort, 2001; Šlachta a kol., 2009b).

„Tuneláři“ pomáhají svým chováním zvyšovat schopnost půdy absorbovat a držet vodu a zlepšují cyklus živin v půdě. Když zůstane výkal na povrchu, ztrácí se tím až 80% dusíku vypařováním. Při rychlém začlenění výkalu do půdy je umožněna větší dostupnost dusíku rostlinám (Thomas, 2001a).

Aktivita brouků rodu *Aphodius* dělá výkal atraktivnější pro žížaly, které se pak podílejí na jeho odstranění. Toto podporuje fakt, že přidání larev rodu *Aphodius* do výkalu mělo za následek zvětšování populací žížal a tím větší rychlost rozkladu. Výkal napadený koprofágními brouky je také přístupnější pro další dekompozitory jako jsou bakterie a houby (Holter, 1979).

Koprofágní brouci prospívají dobytku tím, že soupeří s larvami škůdců, jako jsou *Haematobia irritans* (bodalka malá) a *Musca autumnalis* (moucha dobytčí), o potravu a ničí jejich vajíčka. Dr. George Bornemissza zjistil, že z výkalu napadeného broukem

Onthophagus gazella (Fabricius, 1787) se vylíhlo o 95% méně bodalek než z výkalů, kde byl tento brouk nepřítomen (Thomas, 2001b).

Významná je také jejich redukce gastrointestinálních parazitů dobytka. Vajíčka těchto parazitů procházejí do výkalů svého hostitele, kde se změjí na larvy a ty se vyvinou v infekční stádium, které napadá dobytek. Když je ale exkrement odstraněn brouky, vajíčka parazitů uhynou a tím je zničen jejich životní cyklus (Thomas, 2001a).

1.4. *Aphodius prodromus*

Aphodius prodromus (Obr. 1) je jeden z nejhojnějších všeobecně rozšířených koprofágních brouků (Zúber, 2011). Šlachta a kol. (2009a) uvádí, že tento brouk spolu s *Aphodius sphaelatus* tvořil až 49% ze všech sesbíraných brouků ze tří lokalit (Rychnov nad Malší, Vlčí Jámy, Dolejší Těšov).



Obr. 1 Koprofágní brouk *A. prodromus* (foto T. Murray, 2007).

Dospělí brouci dosahují velikosti mezi 4 a 7mm (Tesař, 1957). Na rozdíl od většiny koprofágních brouků neklade vajíčka do výkalu, ale vkládá je do země (Gittings a Giller, 1997). *A. prodromus* je řazen do funkční skupiny „dung dwellers“. Larvy se mohou vyvíjet mimo výkal na tlejícím rostlinném materiálu (Gittings a Giller, 1997). Gordon (1983) označil tento druh jako pojídače povrchu výkalů s preferencí pro otevřené pastviny a dobytčí exkrementy.

A. prodromus se vyskytuje v Evropě, severní a střední Asii, Severní Americe (Balthasar, 1964), a to na jaře a na podzim (Gittings a Giller, 1997). V České republice je rozšířen všude, mimo hřebeny hor (Tesař, 1957).

1.5. Studie populací a genetických markerů

Ve výzkumu koprofágních brouků byla doposud věnována pozornost především ekologii, o jejich genetice se toho ví málo. Ekologií brouků rodu *Aphodius* se mimo jiné zabýval Giller a kol. (1998). Výzkum byl zaměřen na stabilitu jejich složení v různém prostorovém a časovém měřítku. Největší variabilita se vyskytla v geografickém měřítku.

Palestini, Barbero a Rolando (1998) se věnovali vnitrodruhové a mezidruhové agregaci mezi koprofágními brouky. Zjistili, že vnitrodruhové seskupování je mnohem vyšší než mezidruhové. Příčinou sdružování může být hledání partnera nebo se jedinci také shromažďují, protože přítomnost dalších brouků na výkalu může měnit jeho chemický stav a tím zlepšovat jeho vlastnosti.

Prostorovou populační strukturu brouků rodu *Aphodius* studovali Roslin a Koivunen (2001). Zaznamenali značnou variaci v souboru koprofágních brouků rodu *Aphodius* vyskytujících se na stejném nestejnorodě rozmístěném zdroji, dobytčím výkalu na pastvinách. Různé druhy vykazovaly různé odpovědi na změny ve struktuře krajiny. Jejich výsledky naznačovali, že generalisté rodu *Aphodius* a specialisté s vysokou silou disperze se vyskytují jako nestejnorodá populace v terénu. Specialisté s limitovanou disperzí tvoří klasické metapopulace.

Porter a Rush (1996) testovali genetickou variabilitu u 5 druhů koprofágních brouků rodu *Aegialia* (Latreille, 1807) pomocí alozymových markerů. Pro analýzu bylo využito 32 různých lokusů. Procento polymorfních lokusů bylo vysoké (v rozsahu 12,1-93,9%). Celkově byly u rodu *Aegialia* nalezeny nízké hodnoty heterozygotnosti, ty se však příliš neliší od výsledků pro ostatní brouky a bezobratlé. Odhady genetického toku byly velmi nízké.

Genetické analýze devíti populací koprofágních brouků rodu *Onthophagus* (Latreille, 1802) za použití 8 alozymových lokusů se věnovali Martín-Piera a Boto (1999). Data ukázala, že mezi *Onthophagus opacicollis* (Reitter, 1893) a *Onthophagus similis* (Scriba, 1790) existuje na některých místech genetický tok, na jiných lokalitách jsou však izolováni. Tyto výsledky naznačují neukončený proces speciace lišící se na různých místech.

Rostlin (1999) ve své práci porovnával prostorovou populační strukturu *Aphodius fossor* (Linnaeus, 1758) s jeho genetickou populační strukturou pomocí dvou různých tříd genetických markerů (alozymy a mitochondriální DNA). Alozymové markery i mtDNA sekvence odhalily nápadnou genetickou homogenitu na finské pevnině, což naznačuje, že genový tok mezi sousedícími populacemi je dost silný k homogenizaci genofondu uvnitř velkých oblastí. Při porovnání mezi lokálními populacemi Finska a Alandu (skupina ostrovů

desítky kilometrů od pevniny) se objevily významné rozdíly pouze v mtDNA haplotypových frekvencích (jsou citlivější než alozymy). Výsledky ukazují, že *A. fossor* má významnou sílu disperze, která mu umožňuje časté přesuny mezi sousedícími farmami.

Morfologickou a genetickou diferenciaci mezi dvěma sesterskými skupinami koprofágních brouků, *Onthophagus taurus* (Schreber, 1759) a *Onthophagus illyricus* (Scopoli, 1763), zkoumal Pizzo a kol. (2006). Morfologický přístup spojený s použitím molekulárních markerů (COI, AFLP) dovoľoval testování mezidruhových vztahů a umožňoval zjištění evolučních a geografických procesů, které mohou vést k mezidruhové diferenciaci. Použití uvedených molekulárních markerů odhalilo, že pozorované druhy jsou geneticky dobře diferencované a tvoří dvě rozeznatelné linie, které se zřejmě oddělily během Pliocénu alopatrickou speciací. Jak molekulární markery, tak i morfologické znaky ukazují, že fenotypově střední jedinci přes svůj nejednoznačný vzhled patří k druhu *O. illyricus*.

„Good genes models“ a pohlavním výběrem u *Onthophagus taurus* se zabývali Garcia-Gonzalez a Simmons (2011). Zjistili významný vliv otců na životaschopnost od vajíčka k dospělci a na prereproduktivní přežití synů, stejně jako mírné až vysoké koeficienty aditivní genetické proměnlivosti pro tyto vlastnosti a pro prereproduktivní přežívání dcer. Tyto výsledky naznačují, že mezi samci je genotypová variace, která se převádí do rozdílu v životaschopnosti potomků.

2. CÍL PRÁCE

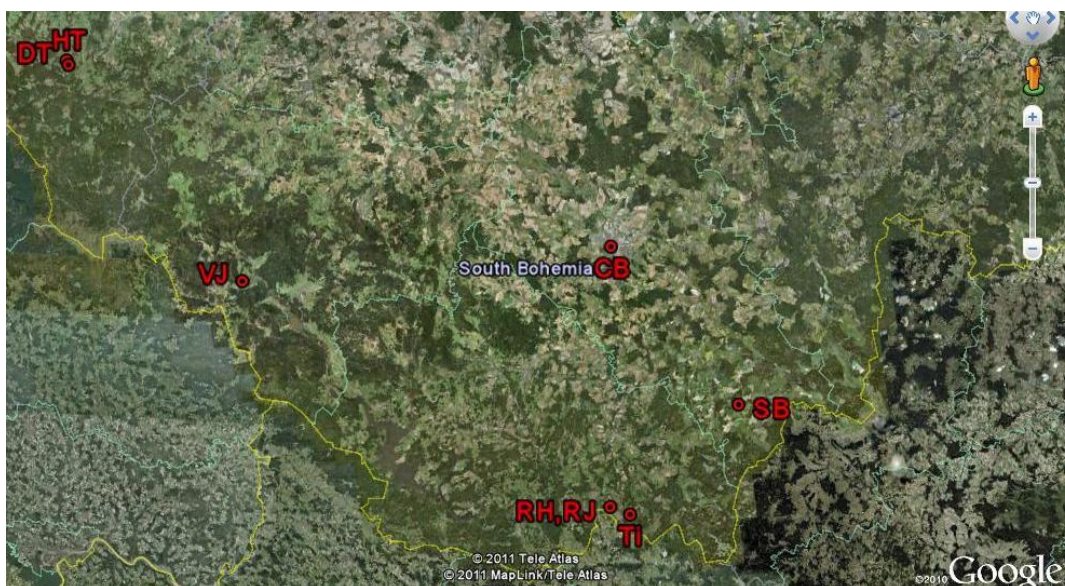
Cílem mé bakalářské práce bylo na základě předchozích studií koprofágních brouků vytipovat alozymové markery a experimentálně otestovat jejich vhodnost pro studium populačně-genetické struktury *Aphodius prodromus*. Následně byla provedena analýza vzorků *A. prodromus*, které pocházely z 8 lokalit v Jižních Čechách.

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Sběr vzorků

Analyzovaní brouci *Aphodius prodromus* byli nasbíráni v osmi lokalitách jižních Čech (Obr. 2). V tabulce 1 jsou uvedeny názvy lokalit, počty sesbíraných brouků a zeměpisné údaje. Vzdálenosti mezi jednotlivými lokalitami jsou zaznamenány v příloze 1.

Sběr vzorků a jejich determinaci zajistil Mgr. Martin Šlachta Ph.D. Brouci byli chytáni do padacích pastí, kde byl návnadou kravský výkal, který byl odebrán v den expozice. Past se skládala z plastové nádoby zakopané po okraj do země, horní část nádoby byla vyplněna výkalem uloženým na drátěném roštu, který byl vložen asi 6 cm dovnitř nádoby (Šlachta a kol. 2009a). Vzorky byly před analýzou uchovávány v -80°C.



Obr. 2 Mapa lokalit. Červené kroužky označují jednotlivé lokality. Zkratky lokalit viz tabulka 1. Mapa byla vytvořena pomocí programu Google Earth, který je dostupný na stránkách <http://www.google.com/intl/cs/earth/download/ge/>.

Tab. 1 Názvy lokalit, počty vzorků a geografické údaje.

Lokalita	Zkratka		Počet	GPS souřadnice	Nadmořská
	lokality	Region	vzorků		výška (m n.m)
České Budějovice	CB	České Budějovice	50	14°28'29"E, 48°58'29"N	381
Dolejší Těšov	DT	Hartmanice	60	13°25'38"E, 49°11'19"N	730
Hořejší Těšov	HT	Hartmanice	60	13°25'52"E, 49°11'0"N	750
Rychnov nad Malší-hřbitov	RH	Dolní Dvořiště	60	14°29'E, 48°39'N	575
Rychnov nad Malší-jámy	RJ	Dolní Dvořiště	60	14°29'E, 48°39'N	575
Svébohy	SB	Novohradské hory	53	14°43'20"E, 48°46'51"N	529
Tichá	Ti	Dolní Dvořiště	15	14°31'16"E, 48°38'28"N	647
Vlčí Jámy	VJ	Šumava	60	13°46'36"E, 48°55'13"N	793

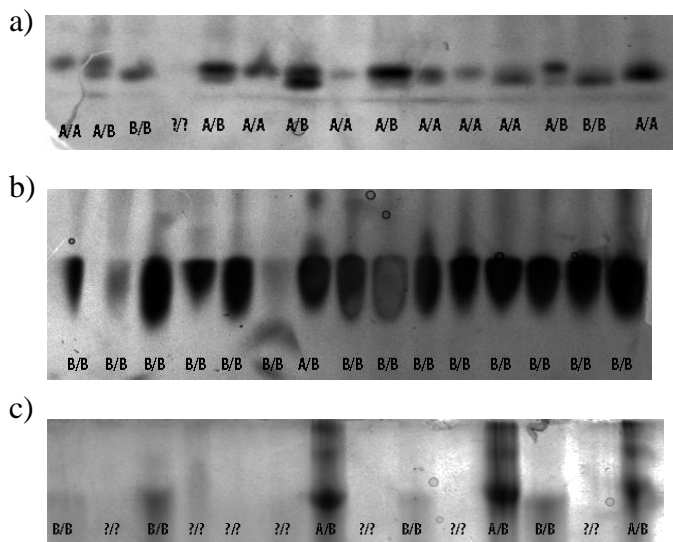
3.2. Alozymová elektroforéza

Alozymová elektroforéza spolu se specifickým substrátovým barvením nabízí poměrně levnou a rychlou metodu analýzy variability u přírodních a umělých populací (Hoelzel, 1991). Výhodou alozymové elektroforézy je, že mohou být identifikováni heterozygoti, protože alely jsou kodominantní a že jde o metodu univerzálně použitelnou (Okumus a Ciftci, 2003). V této bakalářské práci byla metoda alozymové elektroforézy používána kvůli své dobré aplikovatelnosti na brouky. Pomocí této metody byly prováděny první studie koprofágních brouků.

Proteinová elektroforéza je založena na schopnosti migrace proteinů pod vlivem elektrického pole (Hillis a kol., 1996). Primární struktura proteinů se skládá z polypeptidického řetězce, což je sekvence aminokyselin spojených k sobě karboxylovými vazbami. Tato sekvence je určena geneticky (Richardson a kol., 1986). Některé aminokyseliny tvořící protein jsou nabité. Proteinové molekuly mají náboj založený na uspořádání těchto aminokyselin v terciální struktuře. Náboj na proteinových molekulách způsobuje jejich pohyb v elektrickém poli směrem k opačně nabitému konci. Pohyblivost molekul přímo souvisí s jejich nábojem a je dále ovlivněna velikostí a tvarem proteinu. Pokud mají dva proteiny rozdílné sekvence aminokyselin, často mají i různou pohyblivost, protože rozdíly v sekvencích mají za následek změnu velikostí a/nebo náboje (Hedrick, 1983).

Většina proteinů zkoumaných během elektroforézy jsou enzymy, které katalyzují specifickou biochemickou reakci, na jejímž základě se dají obarvit. Některé z těchto enzymů jsou složeny z více než jedné kopie polypeptidického řetězce nebo genového produktu a tvoří tak kvartérní strukturu, podle níž dělíme enzymy na monomerní, dimerní a tetramerní

(Obr. 3). Monomerní enzymy tvoří jeden peptidický řetězec, dimerní dvě podjednotky, z nichž je každá tvořena jedním polypeptidickým řetězcem a tetramerní čtyři podjednotky (Hoelzel, 1991).



Obr. 3 Příklady monomerních, dimerních a tetramerních enzymů.
a) monomerní esteráza
b) dimerní malátdehydrogenáza
c) tetramerní kataláza

Různé molekulární formy enzymů pocházející ze stejného organismu jsou definovány jako isozymy (Acquaah, 1992). Podskupinou isozymů jsou alozymy, což jsou polypeptidy kódované různými alelami stejného genového lokusu (Hillis a kol., 1996).

Separace proteinových molekul může být provedena v různých pevných médiích (Acquaah, 1992). Médium slouží jako síto oddělující molekuly podle velikosti a tvaru. To umožňuje efektivnější separaci podobně nabitých molekul lišících se velikostí (větší molekuly se pohybují pomaleji skrz malé póry gelu). Nejznámějšími médii jsou škrobový gel, akrylamidové gely, agarové gely a celulózo-acetátové gely (Richardson a kol., 1986). V gelech s jednotným pH se proteiny pohybují nepřetržitě, zatímco u gelů s pH gradientem se proteiny pohybují, dokud nedosáhnou isoelektrického bodu a pak se zastaví (Hoelzel, 1991).

Jakmile je provedena elektroforéza, je nutné určit pozici proteinových produktů specifickým substrátovým barvením (Richardson a kol., 1986). Během elektroforézy molekuly enzymů migrují na různá místa v gelu. K označení umístění těchto molekul musí být dodaný vhodný substrát pro enzym, aby vytvořil barvitelný produkt. Tento produkt není sám o sobě viditelný, proto je nutné přidat specifické barvivo do reakčního roztoku, které reaguje s produktem enzymatické aktivity (Acquaah, 1992). Obarvený produkt je zobrazen jako barevný proužek na gelu. Tento gel je pak označován jako zymogram (Richardson a kol., 1986). Homozygotní jedinci vždy vykazují jeden proužek, u heterozygotních se počet

proužků liší na základě kvartérní struktury testovaného enzymu (u monomerních enzymů má heterozygot 2 proužky, u dimerních 3 proužky a u tetramerních 5 proužků).

3.2.1. Studované enzymy

Na základě předchozích studií u příbuzných druhů koprofágních brouků bylo vybráno 15 enzymů, u kterých jsem testovala jejich použití pro zjištění genetické variability *A. prodromus* (Tab. 2). Testované proteiny patřily do několika tříd enzymů. ADH, G6PD, IDH, MDH, ME, LDH a CAT se označují jako oxidoreduktázy, katalyzují oxidačně redukční reakci. HK a PGM (transferázy) katalyzují přesun funkčních skupin mezi dvěma substráty. LAP (hydroláza) ovlivňuje hydrolýzu. PGI je řazena mezi isomerázy, katalyzuje isomerační reakci. Mezi zkoumané proteiny dále patřily tzv. „General Proteins - PT“, které nemají enzymatickou aktivitu (Acquaah, 1992).

K další analýze bylo zvoleno 10 enzymů, které se podařilo obarvit.

Tab. 2 Testované enzymy.

Zkratka enzymu	Jméno enzymu	Kvartérní struktura	Použito k analýze
ADH (E.C. 1.1.1.-)	Alcohol Dehydrogenase	Dimer	ano
α -AMY (E.C. 3.2.1.1)	α -Amylase	Monomer	ano
CAT (E.C. 1.11.1.6)	Catalase	Tetramer	ano
EST (E.C. 3.1.1.-)	Esterase	Monomer	ano
G6PD (E.C. 1.1.1.49)	Glucose-6-phosphate Dehydrogenase	Dimer	ne
GK (E.C. 2.7.1.2)	Glucokinase	Monomer	ano
HEX (E.C. 2.7.1.1)	Hexokinase	Monomer	ano
IDH (E.C. 1.1.1.42)	Isocitrate Dehydrogenase	Dimer	ano
LDH (E.C. 1.1.1.27)	Lactate Dehydrogenase	Tetramer	ano
LAP (E.C. 3.4.11.1)	Leucine Aminopeptidase	Monomer	ne
MDH (E.C. 1.1.1.37)	Malate Dehydrogenase	Dimer	ano
ME (E.C. 1.1.1.40)	Malic enzyme	Tetramer	ano
PGI (E.C. 5.3.1.9)	Phosphoglucoisomerase	Dimer	ne
PGM (E.C. 2.7.5.1)	Phosphoglucomutase	Monomer	ne
PT	General Proteins	Monomer	ne

3.2.2. Homogenizace

Brouci byli ručně zhomogenizováni v 0,05M TRIS-HCl pufru, který obsahoval 20% glycerolu a 0,05% TRITON X-100. Vzorek byl poté centrifugován při 15 000 rpm ve 4°C po dobu 15 minut. Pro přípravu vzorků jsem využívala pouze těla, jelikož obsahují velké množství alozymů, které jsou metabolickými enzymy většinou exprimovanými v trávicím traktu. V hlavě je alozymů málo a jsou špatně detekovatelné. Hlavy byly uskladněny a dále se využívají na DNA analýzu (neobsahují symbionty, takže nevykazují cizí DNA). Kontaminace symbionty je u alozymů dobře rozpoznatelná, jelikož alozymy symbiontů mají výrazně odlišnou elektroforetickou mobilitu a díky množství tkáně jsou mnohem slabší a tedy dobře odlišitelné od hostitelových alel.

Pro zabránění degradace proteinů byly vzorky připravovány na ledu.

3.2.3. Elektroforéza

Pro separaci alozymů jsem používala 3 různé vertikální elektroforézy, přičemž u všech byla možná souběžná analýza dvou gelů. Analýza α -Amy byla u všech lokalit prováděna na elektroforéze od firmy HOEFER SCIENTIFIC INSTRUMENTS model SE 250 (USA). Na jeden gel o rozměrech 6 x 8 cm a tloušťce 0,75 mm bylo nanášeno 15 vzorků. K analýze vzorků z Českých Budějovic jsem využívala elektroforézu OMNIBIO (Brno), u které bylo možno nanést na gel o rozměrech 8 x 20 cm a tloušťce 0,75 mm 35 vzorků. Vzorky ze zbylých lokalit byly separovány na elektroforéze značky CLEAVER SCIENTIFIC LTD (USA), u níž jsou rozměry gelů 8 x 18 cm a tloušťka 1 mm. Na gel se vešlo 30 vzorků.

Pro analýzu α -AMY jsem použila pufrovací systém podle Stauffera et al. (1992): Tris-HCl/pH 7,8 (pH „Stacking gel“ = 6,9; pH „Running gel“ = 8,9). Zdroj byl nastaven na hodnotu 40mA. U zbylých enzymů byl používán systém podle Davise (1964): Tris-HCl/pH 8,3 (pH „Stacking gel“ = 6,9; pH „Running gel“ = 8,9). U systému dle Davise byl zdroj spuštěn na hodnotu 50 V po dobu 20 minut a poté přepnut na 150 V. U obou systémů se pracovalo s diskontinuálním polyakrylamidovým gelem. Jeho složení a elektrické parametry pro jednotlivé enzymy jsou zaznamenány v tabulce 3. U α -AMY bylo do gelu přidáno 0,5% škrobu. Elektroforéza byla při spuštění vložena do chladničky pro udržení teploty 4°C.

Tab. 3 Složení PAG a elektrické parametry pro jednotlivé alozymy.

Alozym	Pufrovací systém	Hustota RG	Hustota SG	Elektrické parametry
α -AMY	Stauffer	6%	2%	40 mA
ADH	Davis	7%	3%	50 V (20 min), 150 V
CAT	Davis	7%	3%	50 V (20 min), 150 V
EST	Davis	7%	3%	50 V (20 min), 150 V
GK	Davis	7%	3%	50 V (20 min), 150 V
HEX	Davis	7%	3%	50 V (20 min), 150 V
IDH	Davis	7%	3%	50 V (20 min), 150 V
LDH	Davis	7%	3%	50 V (20 min), 150 V
MDH	Davis	7%	3%	50 V (20 min), 150 V
ME	Davis	7%	3%	50 V (20 min), 150 V

3.2.4. Detekce alozymů

Po separaci jsem enzymy detkovala pomocí specifického barvení podle Manchenka (1994), s výjimkou EST, kterou jsem barvila podle protokolu od Ritzengruber a Führera (1986). Barvicí protokoly pro jednotlivé použité enzymy jsou uvedeny v příloze 2.

Po obarvení se gely vloží do fixačního roztoku, který je složen ze 4 dílů metanolu, 1 dílu octové kyseliny a 5 dílů vody (Pasteur a kol, 1988). Po fixaci byl roztok vylit, gely byly vloženy do 10% roztoku kyseliny octové a vyfotografovány pod bílým světlem.

3.3. Statistická analýza

Ke statistickému zpracování dat byly zvoleny následující počítačové programy: GenAlEx (Peakall a Smouse, 2006), GDA (Lewis a Zaykin, 2001), MEGA 5 (Tamura a kol., 2011), Popgene (Yeh a kol., 1999) a Genepop (Raymond a Rousset, 1995).

GenAlEx je program pro populačně genetické analýzy, který pracuje jako doplněk Excelu. Vytváří grafy a tabulky, které je pak možné v Excelu upravovat. GenAlEx umožňuje analýzu kodominantních, haploidních a binárních dat. Při statistická analýze jsem pracovala s daty kodominantními. Z programu GenAlEx bylo možno data exportovat do programů GDA, Popgene i MEGA 5.

GDA je software pro analyzování nespojitých populačně genetických dat. GDA vyžaduje ASCII textové soubory, které byly vytvářeny v poznámkovém bloku a následně označeny příponou NEX. GDA umožňuje výpočet Hardy-Weinbergovy rovnováhy, F-statistiky, genetické vzdálenosti a vytváří dendrogramy.

MEGA 5 je integrovaný nástroj pro upravování sekvencí, odvozování phylogramů, odhadování rychlosti molekulární evoluce a testování evolučních hypotéz.

Popgene je program na analýzu genetické variability přírodních populací. Pracuje s kodominantními a dominantními markery a kvantitativními vlastnostmi. Popgene lze použít k výpočtu alelových frekvencí, genetické diverzity, genetické vzdálenosti, F- statistik, Hardy- Weinbergovy rovnováhy a vazebné nerovnováhy.

Genepop je populačně genetický software, který umožňuje vyhodnocení množství analýz jako je Hardy-Weinbergova rovnováha, vazebná nerovnováha, F- statistiky apod. Jako jediný z daných programů počítal genetický tok podle Bartona a Slatkina (1986). U programu Genepop jsem pracovala s verzí 4.0.10, která je dostupná online na stránkách: <http://genepop.curtin.edu.au/>.

Při určování heterozygotnosti byly zjišťovány pro každou populaci následující charakteristiky: průměrná velikost vzorků (n), procento polymorfních lokusů (P) s kritériem 95% a 99%, průměrný počet alel na lokus (A), průměrný počet alel na polymorfní lokus (A_P), očekávaná heterozygotnost (H_E), pozorovaná heterozygotnost (H_O) a odhad fixačního indexu (f).

Hardy-Weinbergova rovnováha byla testována pomocí χ^2 testu (test dobré shody) a Fisherova exaktního testu. χ^2 test je neparametrický test, kterým se testuje shoda teoretického rozložení se skutečným. Fisherův test se používá v situacích, kdy není možné aplikovat test χ^2 vzhledem k tomu, že v některé z buněk tabulky je příliš nízká četnost (Jabor, 2011).

Wrightovy F-statistiky jsou široce používané pro charakterizování genetické struktury populace. Při odhadu F-statik byly stanoveny následující koeficienty: F_{IS} odchylku od alelových frekvencí na úrovni subpopulací, F_{IT} pro odchylku uvnitř celkové populace, F_{ST} pro vliv rozdělení populace na subpopulace. F_{ST} je také index genetické diference, který určuje genetickou rozdílnost mezi populacemi. Wright (1978) navrhl stupnici pro interpretaci genetické diference:

- $F_{ST} = 0-0,05$ malá divergence (zanedbatelná)
- $F_{ST} = 0,05-0,15$ střední
- $F_{ST} = 0,15-0,25$ velká
- $F_{ST} > 0,25$ velmi velká

Genetický tok je pohyb jedinců mezi populacemi, jehož výsledkem je výměna genetického materiálu. Koeficient genetického toku N_m určuje počet migrantů na generaci. Byl použit výpočet podle Neiho (1978) a Bartona a Slatkina (1986).

Genetická vzdálenost byla vypočítána v programu GenAlEx. Následně byla zjišťována závislost mezi genetickou a geografickou vzdáleností pomocí Mantelova testu. K provedení shlukovací analýzy byla využívána genetická vzdálenost podle Neiho (1978) a párová F_{ST} . Na základě těchto hodnot byly v programu MEGA 5 sestrojeny dendrogramy.

PCA (Analýza hlavních komponent) je metoda, jejímž cílem je snížení původního počtu proměnných na menší počet proměnných tak, aby došlo k co nejmenšímu zkreslení. Tato metoda umožňuje interpretaci matic pomocí vizualizace genetických vztahů obsažených v dané matici. Jejím výsledkem je graf, na kterém se geneticky příbuzní jedinci shlukují a tvoří tak klastry. PCA předpokládá lineární vztahy mezi proměnnými (Lepš, 1996). PCA byla prováděna dvěma způsoby:

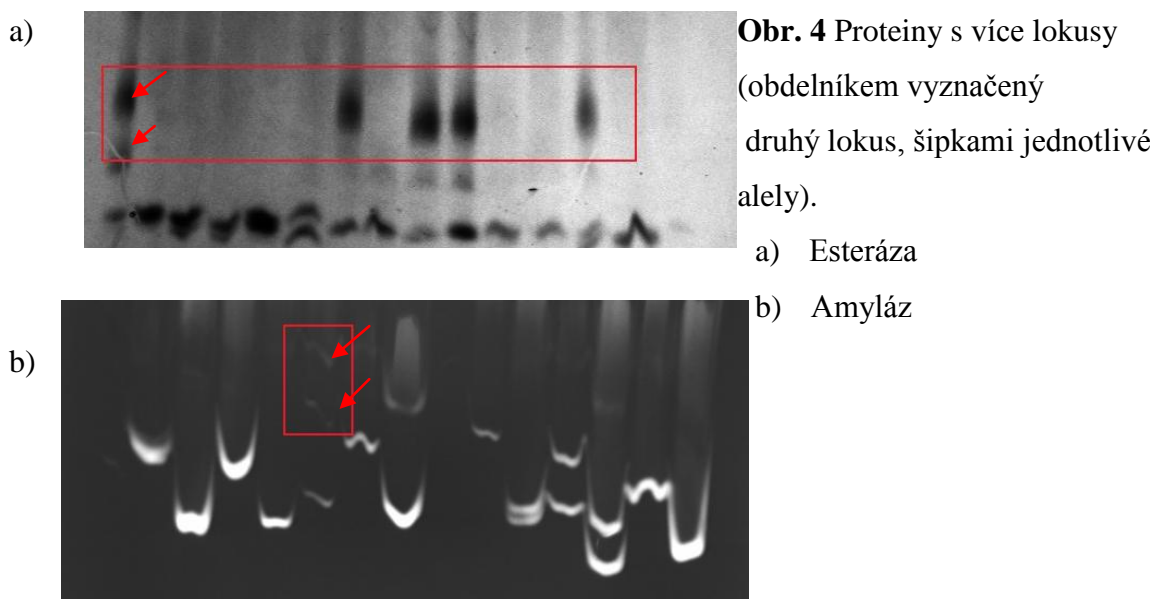
- a. Na základě kodominantní genetické vzdálenosti, kdy ve výsledném grafu byl zaznamenán každý jedinec.
- b. Na základě Neiho genetické vzdálenosti, kdy se na grafu znázorňují jednotlivé populace.

Vazebná nerovnováha (LD) je stav mezi alelami na různých lokusech chromozomu, na kterých dochází k nenáhodné kombinaci alel. LD popisuje situaci, v níž se některé kombinace alel nebo genetických markerů objevují v populaci s menší nebo větší frekvencí, než bychom očekávali. Způsobuje, že změny v četnosti alel v jednom lokusu působí na změny v druhém lokusu (Vrzalová, 2010). Testy vazebné nerovnováhy byly počítány pomocí programu Popgene, který vychází z modelu podle Ohty (1982). Pozorované gametické asociace v celém souboru dat (D_{it}^2) byly rozloženy na odhady uvnitř (D_{is}^2 a D'_{is}^2) a mezi subpopulacemi (D_{st}^2 a D'_{st}^2). Poměr D_{is}^2/D_{st}^2 a D'_{is}^2/D'_{st}^2 ukazuje, které mechanismy jsou zodpovědné za nenáhodnou kombinaci alel (Milankov et al., 2004).

4. VÝSLEDKY

Z původně vybraných 15ti enzymů se nepodařilo při modifikovaných podmínkách (různé složení a pH pufrů) obarvit PGI, G6PD, PGM, LAP a PT. Proto bylo k další analýze použito 10 enzymů, které bylo možno obarvit (ADH, AMY, CAT, EST, GK, HEX, IDH, LDH, MDH a ME) a poskytovaly skórovatelné zymogramy.

U některých gelů AMY a EST bylo vidět více lokusů (Obr. 4), ty však nebyly skórované, protože se nevyskytovaly u všech populací. U AMY bylo také možné detekovat kontaminaci od parazitů či symbiontů.



4.1. Charakteristiky variability

Při určování charakteristik variability ze všech lokusů byly výsledky následující: alelový polymorfismus $P = 1$, průměrný počet alel na lokus $A = 2,4$, průměrný počet alel na polymorfní lokus $A_P = 2,4$, očekávaná heterozygotnost $H_E = 0,52$, pozorovaná heterozygotnost $H_O = 0,123$. Charakteristiky variability pro jednotlivé populace jsou zaznamenány v tabulce 4. Největší očekávaná heterozygotnost byla $0,575$ u populace z Tiché, naproti tomu největší pozorovaná heterozygotnost byla $0,184$ u Hořejšího Těšova. Populace z Rychnova nad Malší-hřbitov vykazovala nejnižší procento polymorfních lokusů (83,3%). Fixační index je u všech populací kladný, to znamená, že je nedostatek heterozygotů. Tento výsledek by mohl být zapříčiněn inbreedingem.

Tab. 4 Variabilita pro jednotlivé lokality (zkratky lokalit viz Tab. 1).

Populace	P	A	H _E	H _O	f
ČB	1,000	2,333	0,441	0,128	0,722
DT	0,900	2,300	0,405	0,130	0,683
HT	1,000	2,222	0,476	0,185	0,612
RH	0,833	2,333	0,447	0,134	0,707
RJ	1,000	2,333	0,473	0,110	0,780
SB	0,889	2,222	0,429	0,065	0,845
TI	1,000	2,200	0,572	0,000	1,000
VJ	1,000	2,300	0,364	0,102	0,717
celkově	0,950	2,281	0,451	0,107	0,763

Analýza privátních alel (tj. alel nalezených jen v jedné populaci) odhalila pouze jeden případ, a to alelu Me-3, která se vyskytovala jen u populace brouků z Českých Budějovic. Frekvence jejího výskytu činila 14,3%, přičemž frekvence privátní alely vyšší než 1% může znamenat, že populace je geneticky izolovaná.

4.2. Hardy-Weinbergova rovnováha

V příloze 3 jsou uvedeny alelové frekvence pro všechny lokality. Hodnoty alelových frekvencí některých lokusů jsou ovlivněny nedostatkem analyzovaných jedinců (převážně u ADH).

Hardy-Weinbergova rovnováha byla testována pomocí testu χ^2 a Fisherova exaktního testu. U Fisherova testu bylo s daty zacházeno dvěma způsoby:

- a.) jednotlivci s chybějícími daty byli z testu vyřazeni (sloupec „discard“).
- b.) chybějící data program GDA odvodil použitím empirických alelových frekvencí (sloupec „infer“).

Tento postup by měl odhalit případné odchylky, které mohou chybějící data způsobit.

V příloze 4 jsou zapsány výsledky testů, které se od sebe mírně liší. Většinou se jedná o rozdíl v lokusech, u nichž se hladina významnosti (p) pohybovala blízko hodnoty 0,05. Největší rozdíly byly mezi výsledky testu χ^2 a Fisherova testu, u kterého byla nahrazena chybějící data.

U všech populací byla zjištěna odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy nejméně v jednom lokusu, z čehož vyplývá, že vzorky z jednotlivých populací nejsou homogenní.

V lokalitách Dolejší Těšov, Hořejší Těšov a Vlčí jámy byla nalezena nerovnováha u osmi lokusů z deseti. Odchyly od Hardy-Weinbergovy rovnováhy mohou být zapříčiněny:

- Inbreedingem, kdy se mezi sebou kříží příbuzní jedinci, což vede k přebytku homozygotů v populaci. Inbreeding naznačují i hodnoty fixačního indexu (viz kapitola 4.1. Charakteristiky variability), které nabývají ve všech lokalitách kladných hodnot.
- Geografickou strukturou populace, která vede k nenáhodnému páření a způsobuje nadbytek homozygotů.

Následně byly populace rozděleny do 5 oblastí: České Budějovice (ČB), Hartmanice (DT, HT), Dolní Dvořiště (RH, RJ, Ti), Novohradské hory (SB) a Šumava (VJ) a u daných oblastí byla testována Hardy-Weinbergova rovnováha, aby se zjistilo, zda lokality tvoří jednu populaci (Příloha 5). Test vycházel signifikantní nejméně u jednoho lokusu každé oblasti, vzorky jsou tedy heterogenní a nepatří k jedné populaci.

H-W rovnováha byla testována i u všech populací dohromady. V tomto případě každý lokus dosahoval hladiny významnosti $p < 0.001$. Tím bylo prokázáno, že brouci tvoří v jižních Čechách jednu panmiktickou populaci.

4.3. Wrightovy F-statistiky

Wrightovými F-statistikami byla odhadována odchylka od alelových frekvencí na úrovni subpopulací, uvnitř celkové populace a byl zjišťován vliv rozdělení populace na subpopulace. Hodnoty jednotlivých koeficientů jsou zaznamenány v tabulce 5. Směrodatná odchylka byla u všech koeficientů malá, výsledky jsou tedy významné (odlišné od nuly).

Koeficient F_{IT} je souhrnná hodnota, měří heterozygotnost jedince v rámci celé populace. Hodnoty F_{IT} se pohybují mezi 0,670 a 0,959. Tyto výsledky naznačují velký deficit heterozygotů.

Koeficient F_{IS} zjišťuje snížení heterozygotnosti uvnitř subpopulací. Celková hodnota F_{IS} se rovnala 0,702, což znamená velkou redukci heterozygotů zapříčiněnou nenáhodným pářením v subpopulaci.

Koeficient F_{ST} určuje kolik procent variability je zapříčiněno rozdělením populace na subpopulace. Celková hodnota $F_{ST} = 0,445$ značí velmi vysokou rozrůzněnost populací. Z celkové variability je 44,5% způsobeno genetickou rozdílností mezi subpopulacemi.

Tab. 5 Výsledky F-statistik.

Lokus	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}
ADH	0,741	0,959	0,840
AMY	0,758	0,789	0,127
CAT	0,622	0,684	0,164
EST	0,291	0,670	0,535
GK	0,731	0,828	0,360
HEX	0,860	0,908	0,343
IDH	0,836	0,925	0,545
LDH	0,747	0,907	0,632
MDH	0,882	0,915	0,285
ME	0,882	0,955	0,616
Celkově	0,735	0,854	0,445
SE	0,056	0,034	0,072

SE- směrodatná odchylka

4.4. Genetický tok

Hodnoty genetického toku byly počítány nejprve podle Neiho, který vychází ze vzorce: $Nm = [(1 / F_{ST}) - 1] / 4$. Výsledky testu podle Neiho vykazují nízké hodnoty (Tab. 6). Celková hodnota genetického toku činí 0,533.

Následně byl použit výpočet podle Bartona a Slatkina (1986), jejichž vzorec využívá privátní alely. Podle tohoto vzorce vyšla celková hodnota $Nm = 0,434$, která také vypovídá o nízké migraci.

Tab. 6 Hodnoty genetického toku podle Neiho.

Lokus	Nm
ADH	0,047
AMY	1,723
CAT	1,277
EST	0,217
GK	0,443
HEX	0,479
IDH	0,209
LDH	0,146
MDH	0,628
ME	0,156
Mean	0,533

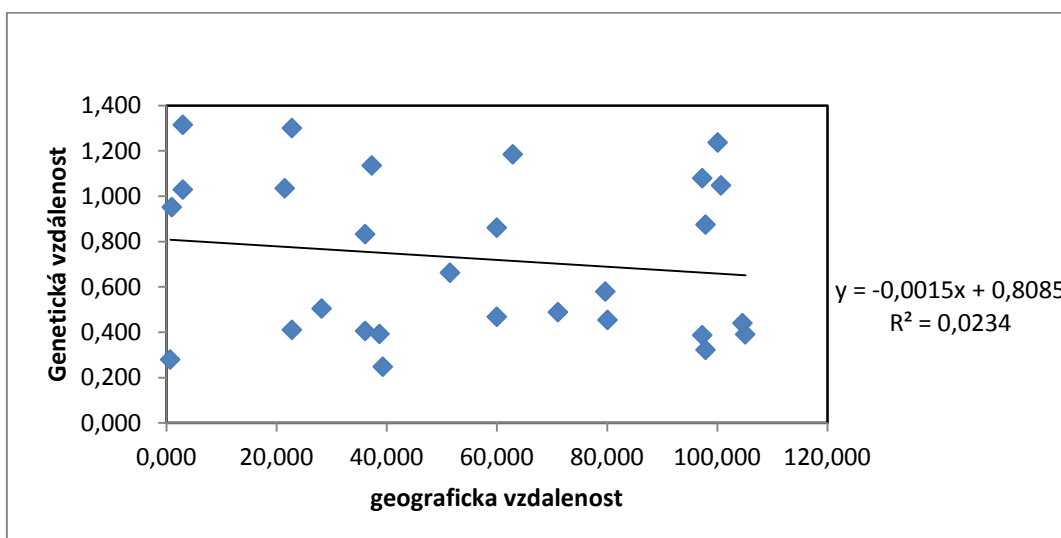
4.5. Genetická vzdálenost

Výsledky genetické vzdálenosti podle Neiho jsou zaznamenány v tabulce 7. Z uvedených hodnot je zřejmé, že největší genetická vzdálenost je mezi populacemi z Rychnova nad Malší-hřbitov a Tiché (1,314), které jsou si však geografickou polohou blízké. Nejmenší genetická vzdálenost je mezi Dolejším Těšovem a Vlčími jámami (0,248).

Tab. 7 Neiho genetická vzdálenost (1978). Zkratky lokalit viz Tab. 1.

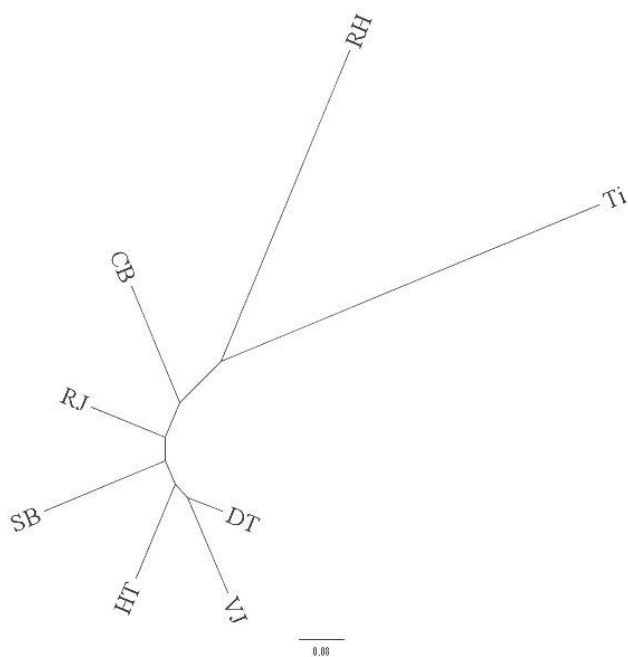
CB	DT	HT	RH	RJ	SB	Ti	VJ	
0,000								CB
0,454	0,000							DT
0,579	0,279	0,000						HT
0,832	0,874	1,079	0,000					RH
0,405	0,322	0,387	0,951	0,000				RJ
0,504	0,390	0,440	1,300	0,410	0,000			SB
1,135	1,047	1,237	1,314	1,029	1,035	0,000		Ti
0,662	0,248	0,392	0,861	0,468	0,488	1,184	0,000	VJ

Pomocí Mantelova testu jsem zkoumala vztah mezi Neiho genetickou vzdáleností a geografickou vzdáleností (Obr. 5). Pokud se v populacích vyskytuje izolace vzdáleností, přímka v grafu stoupá. Pro naše data Mantelův test nenašel žádnou závislou a statistická podpora testu není průkazná ($p = 0,2$).

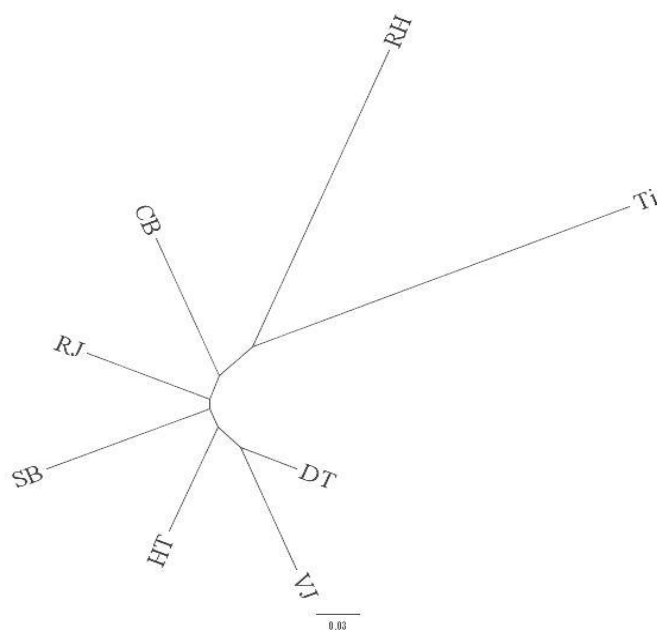


Obr. 5 Závislost mezi genetickou a geografickou vzdáleností.

Z genetické vzdálenosti podle Neiho (1978) byla programem MEGA 5 metodou Neighbour-Joining provedena shlukovací analýza, na jejímž základě byl sestrojen dendrogram (Obr. 6). Na obrázku 7 je vytvořen dendrogram, který vychází z hodnot párové F_{ST} . Oba dendrogramy vytvářejí stejné shluky. Nejblíže příbuzné jsou si populace z Dolejšího Těšova a Vlčích jam.



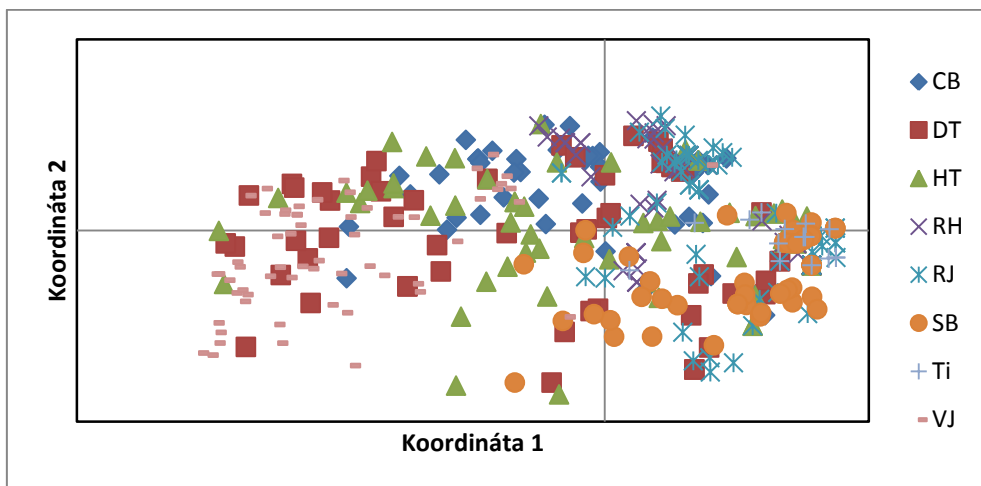
Obr. 6 Dendrogram sestrojený s Neiho genetické vzdálenosti. Zkratky lokalit viz Tab. 1.



Obr. 7 Dendrogram sestrojený z párových hodnot F_{ST} .

4.6. PCA (Analýza hlavních komponent)

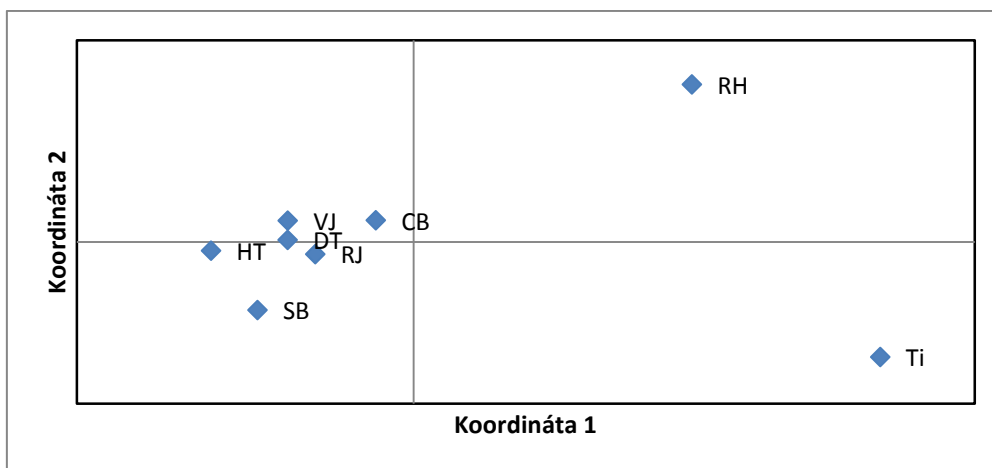
Analýza hlavních komponent byla provedena programem GenA1EX. Jejím výsledkem byl graf, který ukazuje příbuznost jednotlivých jedinců (Obr. 8) nebo populací (Obr. 9).



Obr. 8 PCA vycházející z kodominantní genetické vzdálenosti. Zkratky populací viz Tab. 1.

Na obrázku 7 je vidět, že jedinci z Českých Budějovic a Hořejšího a Dolejšího Těšova jsou rozprostřeni po celém grafu. Vlčí Jámy se neprolínají s populacemi z Rychnova nad Malší, Tiché a Svěbohů.

Obrázek 8 ukazuje, že brouci z Českých Budějovic, Vlčích jam, Hořejšího Těšova, Dolejšího Těšova, Rychnova nad Malší-jámy a Svěbohů tvoří jeden klastr, jsou si tedy nejbližší příbuzní. Populace z Tiché a Rychnova nad Malší-hřbitov jsou nejvíce odlišné, jelikož se nacházejí daleko od ostatních na hlavní koordinátě 1.



Obr. 9 PCA vycházející z Neiho genetické vzdálenosti. Zkratky lokalit viz Tab. 1.

4.7. Vazebná nerovnováha (LD)

Pomocí Ohtovy analýzy vazebné nerovnováhy bylo zjištěno, že téměř u všech párů lokusů je hodnota D_{is}^2 nižší než D_{st}^2 a zároveň D'_{is}^2 je větší než D'_{st}^2 . Tyto výsledky naznačují, že nenáhodné kombinace alel jsou způsobeny převážně omezenou migrací a genetickým driftem. Od tohoto závěru se odlišoval pár lokusů ADH-HEX, kde D_{is}^2 je menší než D_{st}^2 . Dvojice lokusů s průkaznou nerovnováhou a odpovídající hodnoty koeficientů vazebné nerovnováhy jsou uvedeny v tabulce 8.

Tab. 8 Výsledky testů pro vazebnou nerovnováhu. Seznam zkratk lokalit viz Tab. 1.

Lokus 1	Lokus 2	Lokalita s		D_{it}^2	D_{is}^2	D'_{is}^2	D_{st}^2	D'_{st}^2
		průkaznou LD						
HEX	LDH	ČB	$p < 0,001$	0,33261	0,03742	0,28928	0,29862	0,04333
CAT	ME	DT	$p < 0,05$	0,24258	0,00132	0,14628	0,24308	0,09630
GK	IDH	DT	$p < 0,05$	0,32788	0,03205	0,28636	0,29943	0,04152
IDH	LDH	DT	$p < 0,05$	0,23285	0,03031	0,17979	0,19641	0,05305
ADH	HEX	HT	$p < 0,05$	0,25889	0,03906	0,12305	0,22182	0,13584
CAT	EST	HT	$p < 0,05$	0,11977	0,01148	0,10366	0,11165	0,01611
ADH	AMY	VJ	$p < 0,05$	0,14164	0,00628	0,09152	0,13617	0,05012

p- hladina významnosti

D_{it}^2 - celková variance LD

D_{is}^2 - očekávaná variance LD uvnitř subpopulace

D'_{is}^2 - variance korelace lokusů 1 a 2 jedné gamety v subpopulaci vzhledem k celkové populaci

D_{st}^2 - variance korelace dvou lokusů (lokus 1 a 2) různých gamet subpopulace vzhledem k celkové populaci

D'_{st}^2 - variance LD celé populace

5. DISKUZE

O populační genetice koprofágního brouka *A. prodromus* nebylo doposud nic zjištěno, tato práce je první studií zabývající se genetickou strukturou populací tohoto druhu v jižních Čechách. Přestože vzorky pocházely z relativně malé oblasti, i tak výsledky přinesly mnoho nových informací týkajících se genetické diverzity obecně, i specifitějších jevů jako je např. migrace.

5.1. Studované enzymy

Celkově bylo k analýze použito 10 enzymů. U ME (Malic enzym) byly detekovány 3 alely, avšak alela číslo 3 byla zjištěna jen u populace z Českých Budějovic. Martín-Piera a Boto (1999) u MDH a IDH pozorovaly 4 alely, v mé práci však byly objeveny u obou lokusů pouze alely 2. Roslin (2001) zjistil u MDH alely 3. U amylázy se vyskytovalo 5 alel. Kromě toho byly u amylázy identifikovány dva lokusy, ale přítomnost lokusu AMY2 se projevovala velmi zřídka, tudíž byl z další analýzy vynechán. Více lokusů bylo nalezeno i u EST, což odpovídá studii Martinse a Contela (2001), kteří při zkoumání koprofágních brouků pozorovali lokusů 6. Přítomnost více lokusů jsem však zaznamenala pouze u vzorků z lokalit České Budějovice, Vlčí jámy a Svěbohy, které se pohybovaly na hranici detekce.

5.2. Variabilita

Průměrná očekávaná heterozygotnost $H_E = 0,520$ byla znatelně vyšší než hodnota u příbuzného druhu *Aphodius fossor* u populací z Finska a Alandu, kde $H_E = 0,200$ (Roslin, 2001). Tento výsledek se také výrazně liší od průměrné genetické diverzity hmyzu, která má hodnotu $H_E = 0,107$ (Graur, 1985). Rozdíly v pozorované heterozygotnosti mohou být ovlivněny počtem vybraných lokusů a tím, zda se jedná o lokusy monomorfní nebo polymorfní. Vysoké hodnoty H_E v této práci jsou způsobeny tím, že jsem pracovala s velkým množstvím polymorfních lokusů, které byly záměrně zvoleny na základě předchozích studií. Celkový polymorfismus pro všechny lokusy byl 100% a hodnoty očekávané heterozygotnosti se pohybovaly od $H_E = 0,488$ pro ADH po $H_E = 0,780$ u AMY. V práci Roslina (2001) jsou hodnoty genetické diverzity u některých lokusů nízké ($H_E = 0,010$ pro lokus GOT-f, $H_E = 0,016$ pro IDC), naopak u lokusů PEP D a GOT-s jsou hodnoty H_E vysoké (0,529 a 0,475).

Porter a Rush (1996) uvádí u koprofágních brouků rodu *Aegialia* vysoké hodnoty polymorfismu v rozsahu 12-93,9%. Hodnoty očekávané heterozygotnosti jsou však nízké. Průměrná genetická diverzita mohla být snižována větším počtem vyšetřovaných lokusů (32) než bylo v mé práci.

Hodnota pozorované heterozygotnosti ($H_0 = 0,126$) byla v porovnání s očekávanou heterozygotností malá. Za tuto odchylku je pravděpodobně zodpovědný inbreeding, kdy se mezi sebou páří příbuzní jedinci, což způsobuje úbytek heterozygotů v dané populaci.

5.3. Hardy-Weinbergova rovnováha

U všech lokalit byla zaznamenána odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Nerovnováha je pravděpodobně způsobena rovněž inbreedingem, který způsobuje změnu genotypových frekvencí. Inbreeding podporují i nízké hodnoty genetického toku. Jelikož brouci migrují jen velmi málo, dochází ke snížené výměně genetické informace mezi populacemi a zvyšuje se pravděpodobnost příbuzenského páření. Toto zjištění je v rozporu s výsledky Roslina (2001), který zjistil, že populace příbuzného druhu *Aphodius fossor* ve Finsku jsou homogenní. Vysvětluje to silným genetickým tokem mezi relativně stálými místními populacemi. Je tedy otázkou, nakolik jsou lokality v jižních Čechách odlišné od lokalit finských – zda je příčina omezené migrace přítomnost geografických překážek, odlišné pastevní schéma, nebo jestli je *A. prodromus* méně migrující z nějakého biologického důvodu. Nízký genetický tok *A. prodromus* mohl být tedy příčinou nerovnováhy u populací v jižních Čechách. Martins a Contel (2001) vysvětlují nerovnováhu pro lokus EST4 u koprofágního brouka *Onthophagus gazella* selektivními procesy, jelikož odchylka u rovnováhy se vyskytovala pouze u daného lokusu. Jelikož se v mé práci nerovnováha objevovala u všech lokusů, selekcí způsobena není. Příčinou odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy mohla být také přítomnost nulových alel, což jsou alely se sníženou enzymatickou funkcí. Přítomnost nulových alel může vysvětlovat nalezený nedostatek heterozygotů. Tento jev byl pozorován u enzymů ADH, IDH, LDH, ME a EST. Dalším možným důvodem nerovnováhy může být rozdělení na subpopulace. Pokud je populace rozdělena do subpopulací, zvyšuje se pravděpodobnost nenáhodného páření a tím dochází k nadbytku homozygotů. Toto zjištění podporují i výsledky F_{ST} , které ukázaly, že 44,5% z celkové variability je zapříčiněno rozdílností mezi subpopulacemi.

Při testování Hardy-Weinbergovy rovnováhy na úrovni regionů bylo zjištěno, že vzorky z těchto oblastí jsou heterogenní. Když byly všechny lokality ověřovány dohromady, bylo prokázáno, že brouci *A. prodromus* v jižních Čechách tvoří jednu panmiktickou populaci.

5.4. Struktura populací

Genetická diverzita mezi populacemi je velmi vysoká ($F_{ST} = 0,445$) a zároveň se významně liší od nuly. Tento výsledek naznačuje existenci subpopulací *A. prodromus* v jižních Čechách. Genetickou divergenci může zvyšovat i nízká migrace. Tyto výsledky se výrazně liší od hodnot zjištěných u *A. fossor*, kdy divergence mezi populacemi F_{ST} byla pouze 0,011 (Roslin, 2001). Malou genetickou diverzitu mezi populacemi podporují i vysoké hodnoty genetického toku u *A. fossor*, které odpovídají 14 úspěšným migrantů na generaci. Nízké hodnoty F_{ST} udávají i Martín-Piera a Boto (1999) u koprofágních brouků *Onthophagus taurus* ($F_{ST} = 0,027$) a *Onthophagus illyricus* ($F_{ST} = 0,075$), u obou druhů je tedy nízký stupeň diferenciacce.

Brouci *A. prodromus* jsou schopni zaplňovat pastviny brzy, ale přesto málo migrují. Hodnoty genetického toku jsou velmi malé, ukazují, že na každou druhou generaci připadá pouze jeden migrant. Koprofágní brouci jsou velmi dobří letci, tudíž by omezená migrace neměla být způsobena geografickou vzdáleností lokalit.

Závislost genetické vzdálenosti na geografické nebyla prokázána. Geneticky nejvzdálenější jsou si populace Tiché a Rychnova nad Malší-hřbitov, přestože geografická vzdálenost mezi nimi je pouze 3 km. Naopak geneticky nejbliže jsou si brouci z Dolejšího Těšova a Vlčích jam, které dělí zeměpisná vzdálenost 39,3 km.

Dendrogramy, které byly vytvořeny podle hodnot Neiho genetické vzdálenosti, oddělily od ostatních populací Tichou a Rychnov nad Malší-hřbitov. Tento výsledek podporuje i PCA, u níž byl vytvořen shluk populací z Českých Budějovic, Vlčích jam, Hořejšího Těšova, Dolejšího Těšova, Rychnova nad Malší-jámy a Svěbohů a výrazně mimo ostatní byla Tichá s Rychnovem nad Malší-hřbitov. Na grafu PCA, sestavené z hodnot kodominantní genetické vzdálenosti, jsou brouci z Českých Budějovic a z obou Těšovů rozmístěni po celé ploše. Jedinci z Vlčích jam se neprolínají s populacemi z Rychnova nad Malší, Tiché a Svěbohů.

Vazebnou nerovnováhu u většiny párů lokusů způsobil genetický drift. Výjimkou byla dvojice ADH-HEX, kde D'_{is^2} je menší než D'_{st^2} . Takový výsledek mohl být zapříčiněn současným působením více faktorů (genetický drift, selekce, rozdělení do subpopulací).

6. ZÁVĚR

Tato práce je významná tím, že se zabývá druhem brouka *Aphodius prodromus*, kterému doposud nebyla z hlediska genetického věnována téměř žádná pozornost, přestože se jedná o jednoho z nejhojnějších koprofágních brouků v ČR.

Na základě alozymové analýzy (10 enzymů) u 418 jedinců *A. prodromus* z osmi jihočeských populací byl zjištěn nedostatek heterozygotů a výrazné odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Nerovnováha byla nalezena jak na úrovni lokalit, tak i mezi regiony i u všech populací dohromady.

Mezi populacemi byla zaznamenána velmi vysoká genetická divergence, která byla výrazně vyšší než divergence zjištěná v předchozích studiích u jiných koprofágních brouků. Hodnoty genetického toku byly také nižší než u koprofágních brouků *A. fossor*. Bylo zjištěno, že *A. prodromus* tvoří v jižních Čechách subpopulace, jejichž genetická divergence je zodpovědná za velkou část variability. Dendrogramy a PCA ukázaly větší příbuznost mezi populacemi z Českých Budějovic, Vlčích jam, Hořejšího Těšova, Dolejšího Těšova, Rychnova nad Malší- jámy a Svěbohů, naopak nejbližší tomuto klastru je Tichá.

7. POUŽITÁ LITERATURA

- ACQUAAH G., 1992. Practical Protein Electrophoresis for Genetic Research. Dioscorides Press
- BALTHASAR V., 1964. Monographie der Scarabaeidae und Aphodiidae der palaearktischen und orientalischen Region. Coleoptera: Lamellicornia. BAND 3 *Aphodiidae*. Verlag der Tschechoslowakischen Akademie der Wissenschaften, s. 263
- BARTON, N. H., SLATKIN, M., 1986. A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. *Heredity* 56, s. 409-416.
- DOUBE B. M., MACQUEEN A., RIDSHILL-SMITH T. J., WEIR T. A., 1991. Native and introduced dung beetles in Australia. In: HANSKI I., CAMBEFORT, Y. 1991. Dung beetle ecology. Princeton University Press, s. 255-278
- GARCIA-GONZALEZ F., SIMMONS L. W., 2011. Good genes and sexual selection in dung beetles (*Onthophagus taurus*): Genetic variance in egg-to-adult viability. *PLoS ONE* 6,
URL:<<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.001633>>
- GILLER P. S., GITTINGS T., FINN J. A., 1998. *Aphodius* dung beetle assemblage stability at different spatial and temporal scales. *Applied Soil Ecology* 10, s. 27-36
- GITTINGS T., GILLER S. P., 1997. Life history and resource utilisation in an assemblage of north temperate *Aphodius* dung beetles (*Coleoptera: Scarabaeidae*). *Ecography* 20, s. 55-66
- GORDON R. D., 1983. Studies on the genus *Aphodius* of United States and Canada (Coleoptera: Scarabaeidae). *Proceeding of the Entomological Society of Washington* 85, s. 633-652
- GRAUR D., 1985. Gene diversity in Hymenoptera. *Evolution* 39, s. 190-199
- HEDRICK P. W., 1983. Genetic of Populations. Science Books Inc.
- HILLIS D. M., MORITZ G., MABLE B. K., 1996. Molecular Systematic 2nd ed. Sinauer Associates, Inc. Publishers
- HOELZEL A. R., 1991: Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach. IRL Press
- HOLTER P., 1979. Effect of dung-beetles (*Aphodius spp.*) and earthworms on the disappearance of cattle dung. *OIKOS* 32, s. 393-402

- HOLTER P., 2000. Particle feeding in *Aphodius* dung beetles (*Scarabaeidae*): old Hypotheses and new experimental evidence. *Functional Ecology* 14, s. 631-637
- HOLTER P., SCHOLTZ C. H., 2007. What do dung beetles eat? *Ecological Entomology* 32, s. 690-697
- HOLTER P., SCHOLTZ C. H., WARDHAUGH K. G., 2002. Dung feeding in adult *Scarabaeines* (tunnelers and endocoprids): even large dung beetles eat small particles. *Ecological Entomology* 27, s. 169-176
- JABOR A. Statistické postupy v laboratorní medicíně.
URL: < <http://ciselniky.dasta.mzcr.cz/hypertext/200610/hypertext/AJDKR.htm> >
[cit. 10. listopadu 2011]
- LANDIN B-O., 1957. Fam. Scarabaeidae. Skalbagggar, Coleoptera. Bladhorningar, Lamellicornia. Svesk insectfauna 9. Entomologiska Föreningen i Stockholm, Stockholm
- LEPŠ J., 1996. Biostatistika. Jihočeská univerzita, Biologická fakulta, České Budějovice, s. 155- 156
- LEWIS P., ZAYKIN D., 2001. Genetic Data Analysis: Computer program for the Analysis of Allelic Data., Verze 1.0 (d16c).
- MANCHENKO G. P., 1994. Handbook of Detection of Enzymes on Electrophoresis Gels. CRC Press
- MARTÍN-PIERA F., BOTO L., 1999. A reappraisal of the „*fracticornis-opacicollis*“ taxonomic complex of the genus *Onthophagus* Latreille using allozymes (*Coleoptera, Scarabaeoidea*). *J. Zool. Syst. Evol. Research* 37, s. 75-84
- MARTINS E., CONTEL E. P. B., 2001. African dung beetle *Onthophagus gazzela* fabricius (*Coleoptera: Scarabaeidae*) esterase isozymes. *Braz. J. Biol.* 61(4), s. 645-650
- MILANKOV V. R., LUDOŠKI J. Lj., VUJIC' A. A., 2004. Linkage disequilibrium in population of *Merodon avidus* (*Diptera, Syrphidae*). *Matica Srpska Novi Sad* 107, s. 45-53
- MITTAL I. C., 2005. Diversity and Conservation Status of Dung Beetles (*Laparosticti: Scarabaeidae: Coleoptera*) in North India. *Bulletin of the National Institute of Ecology* 15, s. 43-51
- NEI M., 1978. Estimations of average heterozygosity and genetic distance from a small Number of individuals. *Genetics* 89, s. 583-590
- OHTA T., 1982. Linkage disequilibrium due to random drift in finite subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79, s. 1940-44

- OKUMUS I., CIFTCI Y., 2003. Fish Population Genetics and Molecular Markers: II-Molecular Markers and Their Applications in Fisheries and Aquaculture. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 3, s 51-79
- PALESTINI C., ROLANDO C., BARBERO E., 1998. Intra- and interspecific aggregation among dung beetles (*Coleoptera: Scarabaeoidea*) in an Alpine pasture. Journal of Zoology 245, s. 101-109
- PASTEUR N., PASTEUR G., BONHOMME F., CATALAN J., BRITTON-DAVIDIAN J., 1988. Practical Isozyme Genetics. Ellis Horwood Limited
- PEAKALL R., SMOUSE P. E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6, s 288-295
- PORTER J. L., RUSH R. W., 1996. Allozyme variation within five species of *Aegialia* (*Coleoptera: Scarabaeidae*). Annals of the Entomological Society of America 89(5), s. 710-721
- 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, s. 197-211
- RAYMOND M., ROUSSET F., 1995. Genepop: population genetics software for exact tests and ecumenicism. J. Heredity 86, s. 248-249
- RICHARDSON B. J., BAVERSTOCK P. R., ADAMS M., 1986. Allozyme Electrophoresis. Academic Press. Inc.
- RITZENGRUBER O., FÜHRER E., 1986. Isoenzym analyse verschiedener Populationen Von *Pityogenes chalkographus* L. (*Coleoptera: Scolytidae*). Ang. Entomol. 101, s. 187-194
- ROSLIN T., 1999. Spatial ecology of dung beetles
URL: < <http://ethesis.helsinki.fi/julkaisut/mat/ekolo/vk/roslin/spatiale.pdf> >
[cit. 12. října 2011]
- ROSLIN T., 2001. Spatial population structure in a patchily distributed beetle. Molecular Ecology 10, s. 823-837
- ROSLIN T., KOIVUNENE A., 2001. Distribution and abundance of dung beetles in Fragmented landscapes. Oecologia 127, s. 69-77
- ŠLACHTA M., FRELICH J., TONKA T., 2009a. Application of dung-baited pitfall trapping in monitoring study on diversity of coprofagous beetles (*Coleoptera: Scarabaeidae, Geotrupidae, Hydrophilidae*) in cattle pastures. Journal of Agrobiology 26, s. 83-99

- ŠLACHTA M., FRELICH J., TONKA T., 2009b. Složení společenstva koprofágních brouků (*Coleoptera: Scarabaeidae, Geotrupidae, Hydrophilidae*) na pastvině masného skotu v západních Čechách-příklad využití návnadových padacích pastí při monitoringu koprofágní fauny. *Erica* 16, s. 97-112
- ŠLACHTA M., FRELICH J., TONKA T., 2010. Function of coprophagous beetles (*Coleoptera: Scarabaeidae, Geotrupidae, Hydrophilidae*) in cattle pastures inferred from pitfall trapping data. *Journal of Agrobiology* 27. s. 85-91
- 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. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
- TESAŘ Z., 1957. Fauna ČSR 11- Brouci listonozí Lamellicornia II. - Scarabaeidae laparosticti. NČSAV, Praha, s. 244-245
- THOMAS M., 2001a. Dung beetles important to pasture ecosystem.
URL: <<http://www.wordinfo.info/unit/3575?letter=D&spage=5>> [cit. 10.října 2011].
- THOMAS M., 2001b. Dung beetle benefits in the pasture ecosystem.
URL:<<http://www.scribd.com/doc/40825604/Dung-Beetle-Benefits-in-the-Pasture-Ecosystem>> [cit. 10. října 2011].
- VINOD K. V., SABU T. K., 2007. Species composition and community structure of dung Beetles attracted to dung of gaur and elephant in the moist forests of South Western Ghats. *Journal of Insect Science* 7, čl. 56
- VRZALOVÁ M., 2010. Bakalářská práce: Tutoriál statistických metod pro populační asociační studie. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta
- WRIGHT S., 1978. Variability Within and Among Natural Populations. Vol. 4. The University of Chicago Press, Chicago
- YEH F. C., YANG R., BOYLE T., 1999. Popgene version 1.31: Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis.
- ZÚBER M., 2011. Listonozí brouci (*Coleoptera: Scarabaeoidea*) dolního Pojizeří. *Elateridarium* 5: 43-54

8. PŘÍLOHY

PŘÍLOHA 1

Vzdálenosti mezi jednotlivými lokalitami.

Pop1	Pop2	geo vzdal.(Km)
CB	DT	80,1
CB	HT	79,7
CB	RH	36,1
CB	RJ	36,1
CB	SB	28,2
CB	Ti	37,3
CB	VJ	51,5
DT	HT	0,7
DT	RH	97,9
DT	RJ	97,9
DT	SB	105,1
DT	TI	100,7
DT	VJ	39,3
HT	RH	97,3
HT	RJ	97,3
HT	SB	104,6
HT	TI	100,1
HT	VJ	38,7
RH	RJ	1,0
RH	SB	22,8
RH	TI	3,0
RH	VJ	60,0
RJ	SB	22,8
RJ	TI	3,0
RJ	VJ	60,0
SB	TI	21,5
SB	VJ	71,1
Ti	VJ	62,9

PŘÍLOHA 2

Barvicí protokoly použitých enzymů.

MDH- Malate dehydrogenase	
TRIS A	8,75 ml
Malic acid (2 M, pH 7,0)	1 ml
MgCl ₂ (0,5 M)	0,075 ml
NAD 1%	0,5 ml
MTT 1%	0,25 ml
PMS 1%	0,125 ml
Inkubovat ve tmě při 37°C, dokud se neobjeví tmavě fialové proužky na žlutém pozadí	

LDH- Lactate dehydrogenase	
TRIS A	8,75 ml
D,L- Lactic acid (0,5 M)	2 ml
NAD 1%	0,25 ml
MTT 1%	0,375 ml
PMS 1%	0,125 ml
Inkubovat ve tmě při 37°C, dokud se neobjeví tmavě fialové proužky na žlutém pozadí	

HEX- Hexokinase	
TRIS A	10 ml
ATP	20 mg
2-D glukose	500 g
MgCl ₂ (0,5 M)	1 ml
NAD 1%	1 ml
NADP 1%	0,5 ml
MTT 1%	0,5 ml
G6PD	6 µl
PMS 1%	0,5 ml
dH ₂ O	10 ml
Inkubovat ve tmě při 37°C, dokud se neobjeví tmavě fialové proužky na žlutém pozadí	

ADH- Alcohol Dehydrogenase

TRIS A	10 ml
Ethanol	0,4 ml
NAD 1%	0,8 ml
MTT 1%	0,2 ml
PMS 1%	20 µl

Inkubovat ve tmě při 37°C, dokud se neobjeví tmavě fialové proužky na žlutém pozadí.

GK- Glukokinase

TRIS A	10 ml
ATP	20 mg
2-D glukose	50 g
MgCl ₂ (0,5 M)	1 ml
NAD 1%	1 ml
NADP 1%	0,5 ml
MTT 1%	0,5 ml
G6PD	6 µl
PMS 1%	0,5 ml
dH ₂ O	10 ml

Inkubovat ve tmě při 37°C, dokud se neobjeví tmavě fialové proužky na žlutém pozadí

α-AMY- α-Amylase

roztok A:	50 mM Na- acetátový pufr pH 5.6	10 ml
	1M CaCl ₂	0,2 ml
roztok B:	10 mM I ₂	
	14 mM KI	

1) Do gelu se místo vody přidává 0,5% roztok škrobu.

2) Gel přelit roztokem A a inkubovat ve tmě při 37°C asi 1 hodinu.

3) Slít roztok A a gel opláchnout destilovanou vodou.

4) Obarvit roztokem B, gel opláchnout destilovanou vodou.

ME- Malic acid

TRIS A	5 ml
Malic Acid (2 M, pH 7,0)	0,5 ml
MgCl ₂ (0,5 M)	0,75 ml
NADP 1%	0,1 ml
MTT 1%	0,2 ml
PMS 1%	0,1 ml
dH ₂ O	5 ml

Inkubovat ve tmě při 37°C, dokud se neobjeví tmavě fialové proužky na žlutém pozadí

IDH- Isocitrate Dehydrogenase

TRIS A	10 ml
D,L- isocitric acid (0,1 M)	1 ml
MgCl ₂ (0,5 M)	1 ml
NADP 1%	0,3 ml
MTT 1%	0,3 ml
PMS 1%	0,3 ml

Inkubovat ve tmě při 37°C, dokud se neobjeví tmavě fialové proužky na žlutém pozadí

CAT- Catalase

A: 3% H₂O₂

B: 2% Pottasium ferricyanide

C: 2% Ferrie chloride

1. Inkubovat v roztoku A 15 minut.
 2. Vylít a vymýt destilovanou vodou
 3. Ponořit do směsi B a C v poměru 1:1
-

EST- Esterase

- a. Inkubovat v 50 ml fosfátového pufru (14,1 g Na₂HPO₄ v 50 ml objemu, pH 7,0)
 - b. Přidat 0,5 g Fast Blue RR do 1,5 ml substrátového pufru (1 g 2-naftylacetátu, 50 ml acetonu)
 - c. Smíchat substrátový pufr s Fast Blue RR se 45 ml fosfátového pufru a gel inkubujte 15 minut v 37°C
-

PŘÍLOHA 3

Alelové frekvence u jednotlivých lokalit.

Lokus	Alela /n	Populace							
		CB	DT	HT	RH	RJ	SB	Ti	VJ
ADH	n	0	14	6	0	0	3	0	33
	1	0,000	0,571	0,833	0,000	0,000	1,000	0,000	0,212
	2	0,000	0,429	0,167	0,000	0,000	0,000	0,000	0,788
AMY	n	45	49	58	58	57	52	13	43
	1	0,356	0,010	0,224	0,284	0,325	0,375	0,308	0,233
	2	0,256	0,092	0,060	0,216	0,114	0,212	0,000	0,140
	3	0,244	0,051	0,000	0,121	0,079	0,048	0,000	0,221
	4	0,144	0,020	0,405	0,302	0,325	0,250	0,308	0,233
	5	0,000	0,827	0,310	0,078	0,158	0,115	0,385	0,174
CAT	n	12	16	27	14	8	5	2	14
	1	0,292	0,406	0,352	0,321	0,438	0,800	0,500	0,857
	2	0,708	0,594	0,648	0,679	0,563	0,200	0,500	0,143
EST	n	41	43	28	27	30	0	0	57
	1	0,268	0,733	0,554	0,667	0,667	0,000	0,000	0,605
	2	0,732	0,267	0,446	0,333	0,333	0,000	0,000	0,395
GK	n	6	8	0	11	3	5	7	7
	1	0,500	0,500	0,000	0,455	0,167	0,400	0,714	0,571
	2	0,500	0,500	0,000	0,545	0,833	0,600	0,286	0,429
HEX	n	11	9	12	7	19	11	8	7
	1	0,409	0,389	0,583	0,000	0,842	0,818	0,750	0,143
	2	0,591	0,611	0,417	1,000	0,158	0,182	0,250	0,857
IDH	n	8	19	10	0	10	11	0	32
	1	0,688	0,684	0,600	0,000	0,300	0,364	0,000	0,266
	2	0,313	0,316	0,400	0,000	0,700	0,636	0,000	0,734
LDH	n	12	20	11	0	8	17	0	15
	1	0,083	0,425	0,818	0,000	0,688	0,206	0,000	0,700
	2	0,917	0,575	0,182	0,000	0,313	0,794	0,000	0,300
MDH	n	32	28	34	22	2	12	2	59
	1	0,891	0,018	0,426	0,591	0,500	0,500	0,500	0,059
	2	0,109	0,982	0,574	0,409	0,500	0,500	0,500	0,941
ME	n	14	19	22	0	5	4	0	42
	1	0,643	0,737	0,432	0,000	0,800	0,500	0,000	0,012
	2	0,214	0,263	0,568	0,000	0,200	0,500	0,000	0,988
	3	0,143	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

PŘÍLOHA 4

Hardy-Weinbergova rovnováha pro jednotlivé lokality.

V tabulce jsou vypsány lokusy, u nichž je odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Populace	χ^2 test	Fisherův test discard	Fisherův test infer
ČB	AMY ***	AMY ***	AMY ***
	EST ***	EST ***	EST *
	HEX **	HEX **	LDH *
	IDH *	LDH *	MDH ***
	LDH ***	MDH ***	ME *
	MDH ***	ME ***	
	ME ***		
DT	AMY ***	AMY ***	AMY ***
	CAT *	CAT *	EST *
	EST *	EST *	ME *
	GK ***	GK **	
	LDH *	HEX *	
	ME **	IDH *	
		LDH ***	
	ME **		
HT	ADH *	AMY ***	AMY ***
	AMY ***	HEX *	CAT *
	CAT *	IDH **	HEX *
	HEX *	LDH **	LDH *
	IDH **	MDH ***	MDH ***
	LDH ***	ME **	
	MDH ***		
ME ***			
RH	AMY ***	AMY ***	AMY ***
	CAT **	CAT **	MDH **
	GK *	MDH ***	
	MDH ***		
RJ	AMY ***	AMY ***	AMY ***
	CAT *	CAT *	GK *
	EST *	EST *	ME *
	HEX ***	HEX ***	
	IDH **	IDH **	
	LDH *		
ME *			
SB	AMY ***	AMY ***	AMY ***
	CAT *	GK *	HEX *
	GK *	HEX **	
	HEX ***	IDH **	
	IDH ***	MDH ***	
	MDH ***		
	ME *		

Ti	AMY ***	AMY ***	AMY ***
	GK **	GK *	
	HEX **	HEX *	

VJ	ADH ***	ADH ***	ADH ***
	AMY ***	AMY ***	AMY ***
	CAT ***	CAT **	EST **
	EST **	EST **	IDH **
	GK **	GK *	
	HEX **	IDH ***	
	IDH ***	LDH **	
	LDH **		

PŘÍLOHA 5

Výsledky testu homogenity na různé geografické úrovni.

ns-nesignifikantní odchylka

p-hladina významnosti

Oblast	Locus	χ^2 test	Fisherův test discard	Fisherův test infer
České Budějovice	ADH	-	-	-
	AMY	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
	CAT	ns	ns	ns
	EST	P < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
	GK	ns	ns	ns
	HEX	p < 0,01	p < 0,01	ns
	IDH	p < 0,05	ns	ns
	LDH	p < 0,001	p < 0,05	ns
	MDH	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,01
	ME	p < 0,001	p < 0,001	ns
Hartmanice	ADH	p < 0,05	p < 0,05	ns
	AMY	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
	CAT	ns	ns	ns
	EST	p < 0,05	ns	ns
	GK	p < 0,01	p < 0,01	ns
	HEX	p < 0,01	p < 0,01	ns
	IDH	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,05
	LDH	p < 0,001	p < 0,001	ns
	MDH	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
	ME	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Dolní Dvořiště	ADH	-	-	-
	AMY	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
	CAT	p < 0,001	p < 0,001	ns
	EST	ns	ns	ns
	GK	p < 0,05	ns	ns
	HEX	p < 0,001	p < 0,001	ns
	IDH	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,05
	LDH	p < 0,01	p < 0,01	ns
	MDH	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,01
	ME	p < 0,05	ns	ns
Novohradské hory	ADH	-	-	-
	AMY	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
	CAT	ns	ns	ns
	EST	-	-	-
	GK	p < 0,001	p < 0,001	ns
	HEX	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,05
	IDH	p < 0,01	p < 0,05	p < 0,01
	LDH	ns	ns	ns
	MDH	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
	ME	p < 0,05	ns	ns

Šumava	ADH	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
	AMY	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
	GK	p < 0,01	p < 0,05	ns
	HEX	p < 0,01	ns	ns
	IDH	p < 0,001	p < 0,001	ns
	LDH	p < 0,01	p < 0,01	ns
	MDH	ns	ns	ns
	ME	ns	ns	ns

Všechny	Locus	χ^2 test	Fisherův test discard	Fisherův test infer
	ADH	p < 0,001	p < 0,001	ns
	AMY	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
	CAT	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,05
	EST	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
	GK	p < 0,001	p < 0,001	ns
	HEX	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
	IDH	p < 0,001	p < 0,001	ns
	LDH	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
	MDH	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
	ME	p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001