

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Diplomová práce

**Genetická variabilita a fylogeografie mšice zhoubné *Diuraphis noxia*
(Aphididae)**

Bc. Anna Sattranová

Školitel: PaedDr. Martina Žurovcová, PhD.

Školitel specialista: Ing. Jan Havelka, PhD.

České Budějovice

2013

Diplomová práce

Satranová, A., 2013: Genetická variabilita a fylogeografie mšice zhoubné *Diuraphis noxia* (Aphididae) [Genetic variability and phylogeography of Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Aphididae). Mgr. Thesis, in Czech.] – 68 pp. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

Genetic analysis of 433 samples of serious crop pest aphid *Diuraphis noxia* was conducted with the use of 8 microsatellites loci. Statistical analysis revealed sexual reproduction of *D. noxia* in temperate regions. The linkage disequilibrium was detected because of the excess of heterozygotes. These results support the theory of RNDr. Starý about the invasion of *D. noxia* to American continent via states of North Africa, Spain and France.

Projekt byl financován GAČR, 522/09/1940, ze záměru Entomologického ústavu Z50070508 a Přírodovědecké fakulty JU.

Prohlašuji, že svoji diplomovou 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 diplomové 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, 13. 12. 2013

.....

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce Martině Žurovcové za odborné vedení, dohled a cenné rady a informace poskytnuté v průběhu mé práce, ing. Janu Havelkovi, RNDr. Pertu Starému a zahraničním kolegům za poskytnutí analyzovaného materiálu. Dále bych ráda poděkovala Daniele Chundelové a Andree Jarošové za podporu a rady a kolektivu celé naší laboratoře za přátelskou atmosféru. Zvlášť ráda bych poděkovala svému manželovi, rodině a přátelům za velkou trpělivost a podporu po celou dobu studia.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
1.1 Biologie mšic a <i>Diuraphis noxia</i> (Kurdjumov).....	1
1.2 Rozšíření a hospodářský význam <i>D. noxia</i>	2
1.3 Dosavadní studie na <i>Diuraphis noxia</i>	3
1.4 Mikrosatelity.....	7
2. CÍLE PRÁCE.....	9
3. MATERIÁL A METODY.....	10
3.1 Materiál.....	10
3.2 Extrakce DNA.....	11
3.2.1 Izolace pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen).....	11
3.3 Primery.....	11
3.4 PCR.....	12
3.5 Gelová elektroforéza.....	13
3.6 Analýza získaných dat.....	16
4. VÝSLEDKY.....	20
4.1 Materiál.....	20
4.2 Mikrosatelitní lokusy a PCR.....	20
4.3 Gelová elektroforéza.....	20
4.3.1 Agarózové gely.....	20
4.3.2 Polyakrylamidové gely.....	21
4.3.3 Enhance IT [®] Polymer Solution (Elchrom Scientific).....	21
4.4 Statistická analýza.....	21
4.4.1 Variabilita lokusů.....	21
4.4.2 Genetická variabilita populací.....	22
5. DISKUZE.....	34
5.1 Izolace DNA.....	34
5.1.1 Izolace pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen).....	34
5.2 Materiál.....	34
5.3 Mikrosatelitní lokusy, PCR a elektroforetická verifikace.....	34
5.4 Enhance IT [®] Polymer Solution (Elchrom Scientific).....	36
5.5 Statistická analýza.....	36
5.5.1 Variabilita lokusů.....	36
5.5.2 Genetická variabilita populací.....	37
5.5.2.1 Mantelův test.....	37
5.5.2.2 PCoA.....	38
5.5.2.3 AMOVA.....	38
5.5.2.4 Program „Alleles In Space“.....	38
5.5.2.5 STRUCTURE.....	39
5.5.2.6 Dendrogram.....	40
6. ZÁVĚR.....	41
7. LITERATURA.....	42
8. PŘÍLOHY.....	55

1. ÚVOD

1.1 Biologie mšic a *Diuraphis noxia* (Kurdjumov)

Mšice zhoubná (*Diuraphis noxia*) se řadí do čeledi mšicovití (Aphididae). Tato čeleď v rámci řádu polokřídli (Hemiptera) a podřádu mšicosaví (Sternorrhyncha) tvoří monofyletickou skupinu. Příbuznými čeleděmi jsou korovnicovití (Adelgidae) a Phylloxeridae (bez českého jména).

Čeleď mšicovití (Aphididae) je rozšířená po celém světě. Počet jejích druhů se odhaduje na více než 4000, ale jen něco kolem 100 druhů se řadí mezi celosvětové škůdce zemědělských plodin, na kterých parazitují a způsobují tak velké ztráty na výnosnosti (DuToit a Walters, 1984; Dixon, 1985; Riedell et al., 1999; Martinez-Torres et al., 2001; Franzen et al., 2008).

Mšice jsou jedním z taxonů, u kterých se vyvinula cyklická partenogeneze. Jedná se o složitý způsob rozmnožování, během kterého může docházet ke střídání pohlavních a nepohlavních generací a hostitelů (Blackman, 1985; Leather, 1992; Hairston et al., 1995). Mšice se rozmnožují tzv. apomiktickou partenogenezí, kdy dceřiní jedinci jsou geneticky úplně shodní s matkou (výjimkou jsou mutace) (Hale et al., 2002; De Meester et al., 2004, Halkett et al., 2005). Ve studených temperátních oblastech Asie a Evropy bylo zjištěno, že se střídá partenogeneze se sexuální generací bez střídání hostitele, zatímco v Americe pohlavní generace chyběly (Kiriak et al., 1990; van Emden a Harrington, 2007). Cyklická partenogeneze se u společného předka Aphidoidea vyvinula před přibližně 200 miliony let (Moran, 1992).

Mšice žijí v symbióze s endosymbiotickou bakterií *Buchnera aphidicola* (Enterobacteriaceae) (Untermann et al., 1989; Munson et al., 1991). Ta ve svém hostiteli žije ve specializovaných buňkách – bakteriocytech. Do dalších generací je přenášena po maternální linii přes vajíčka (Buchner, 1965; Baumann et al., 2000; Wernegreen, 2002). Bakterie mšici poskytuje esenciální aminokyseliny a vitamíny (Lai et al., 1994; Baumann et al., 2000).

Mšice zhoubná (*Diuraphis noxia*) je asi 1,5 – 2,5 mm dlouhá s vřetenovitým tělem žlutozelené až světlezelené barvy. Její siphunculi (cylindrické až kónické struktury na 6. abdominálním článku těla mšice sloužící k vylučování feromonů), končetiny a tykadla jsou v porovnání s jinými druhy mšic kratší (Payton, 2004; Michaud a Sloderbeck, 2005; van Emden a Harrington, 2007). *D. noxia* má bodavě sací ústní ústrojí, které využívá k sání rostlinných šťáv (Hewitt et al., 1984).

Diuraphis noxia je často označována zkratkou RWA, která vychází z anglického pojmenování „Russian wheat aphid“ (ruská pšeničná mšice). Tento název se vžil pravděpodobně proto, že prvním doloženým místem výskytu bylo obilné pole v Mordvilku v jižním Rusku. Tato událost je datována na rok 1900 (Grossheim, 1914; Poprawski et al., 1992).

D. noxia je významným škůdcem hlavně pšenice seté (*Triticum aestivum* L., Poaceae) a ječmene (*Hordeum vulgare* L., Poaceae) (Halbert a Stoetzel, 1998; Belay et al., 2003; Clua et al., 2004). Ačkoli *D. noxia* preferuje obiloviny (Butts a Pakendorf, 1984), žije i na ostatních kulturních i divokých travách čeledi Poaceae (Kriel et al., 1984; Kindler a Spomer, 1986; Kindler a Springer, 1989; van Emden a Harrington, 2007). Mezi její další hostitele patří např. žito (*Secale sp.*), triticales (*Triticosecale*), lipnice (*Poa sp.*), sveřep (*Bromus sp.*) (Clua et al., 2004). Nejlépe se jí daří na pozdně seté plodině v chudé půdě (van Emden a Harrington, 2007). Výskyt na více druzích poskytuje *D. noxia* biotopovou a genetickou diversitu (Butts a Pakendorf, 1984; Kindler a Spomer, 1986). U *D. noxia* může tentýž genotyp v různých přírodních podmínkách produkovat různé fenotypy (Shapiro, 1976).

1.2 Rozšíření a hospodářský význam *D. noxia*

Za původní místo výskytu se považují íránsko-turkmenistánské hory Íránská vysočina odkud expandovala (Kovalev et al., 1991) a poté byla objevena v jižním Rusku (Grossheim, 1914; Poprawski et al., 1992). První zmínka o jejím výskytu mimo Rusko byla ze Španělska (Alfaro, 1947). Od té doby se objevuje po celém světě s výjimkou Austrálie (Quisenberry a Peairs, 1998). Během 70. a 80. let 20. století se *D. noxia* začala rychle šířit a působit velké problémy v hlavních obilí produkujících oblastech Ruska, středního Východu, Malé Asie, Jihoafrické republiky, jižní a střední Ameriky, USA a Evropy (Kovalev et al., 1991; Black et al., 1992; Poprawski et al., 1992; Starý, 1999; Smith et al., 2004). V USA byl první výskyt zaznamenán v roce 1986 v Texasu a v krátké době byla její přítomnost potvrzena po celém území Spojených států amerických a Kanady (Kindler a Springer, 1989; Peairs et al., 1989). V České republice byla prvně popsána v červnu roku 1995 (Starý, 1996).

Jedním z důvodů tak intenzivního výzkumu *D. noxia* je snaha o zabránění jejího rozšíření do Austrálie, kde jsou klimatické podmínky ideální pro její život a množení.

Škodlivost *D. noxia* je dána tím, že během sáním šťáv se do rostliny dostávají sliny obsahující enzymy, které rostlině způsobují chlorózu charakteristickou bílými

nebo žlutými podélnými pruhy a podélným stáčením listů (Hewitt et al., 1984). Sliny také způsobují ultrastrukturální změny a změny na úrovni tkání, které způsobují rozklad floému a signifikantní úbytek chlorofylu a karotenoidů, díky, kterému dojde ke snížení fotosyntézy a nižšímu výtěžku obilí (Smith et al., 1991, Burd a Elliott, 1996; Telang et al., 1999; Heng-Moss et al., 2003; Saheed et al., 2007a, b). Pevné podélné svinutí listů dává mšici možnost schovat se před vnějšími vlivy, přirozenými nepřáteli (např. *Coccinella septempunctata*) a insekticidy (Webster et al., 1987, Hughesa Maywald, 1990; Robinson, 1993)

D. noxia slouží rovněž jako vektor rostlinných chorob. Přenáší např. virus žluté zakrslosti ječmene (barley yellow dwarf virus), virus pruhovité mozaiky ječmene (barley strip mosaic virus) nebo „brome mosaic virus“ (Bush et al., 1989; van Emden a Harrington, 2007).

1.3 Dosavadní studie na *Diuraphis noxia*

Cílem populačně – genetických výzkumů *D. noxia* je snaha o vyjasnění tras její migrace, osidlování jednotlivých kontinentů a hledání variability mezi jejími jednotlivými populacemi, aby bylo možné odhadnout směr jejího dalšího šíření. Aby bylo možné efektivně se škůdci bojovat, je důležité, abychom znali jejich genetickou variabilitu, protože pak můžeme lépe odhadnout, kterým směrem se budou populace potenciálně vyvíjet (Dolatti et al., 2005).

Puterka et al. (1993) se ve své studii zabývali genetickým složením populací *D. noxia* z různých lokalit celého světa. Ke svému výzkumu použili alozymy a RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA) na vzorcích z USA, Ukrajiny, Jihoafrické republiky, Kanady, Mexika, Francie, Moldavska, Kyrgyzstánu, Jordánska, Sýrie a Turecka. Analýzou alozymů bylo zjištěno, že vzorky z Jordánska, Sýrie a Ukrajiny (Krym) měly shodný genotyp. Kyrgyzstán, Moldavsko a Ukrajina (Kerson) měly každá lokalita svůj unikátní genotyp a ostatní vzorky se ve státech nelišily. Pomocí alozymů tedy nebyla prokázána variabilita uvnitř populací, jedinou výjimkou byly ukrajinští zástupci, mezi kterými alozymy prokázaly vysokou variabilitu. Pomocí metody RAPD-PCR bylo naamplifikováno 69 fragmentů v 18 populacích. Díky výsledkům RAPD-PCR byly vypracovány 2 potenciální migrační trasy *D. noxia* do USA. Většina diversity nalezená díky alozymům a RAPD-PCR v této studii byla mezi populacemi východního a severovýchodního Středozeří. Puterka et al. (1993) se domnívají, že na tento jev

mohl mít vliv holocyklus mšic v této oblasti (Kiriak et al., 1990). Pomocí RAPD-PCR a alozymů byla nalezena jen velmi nízká variabilita uvnitř populací.

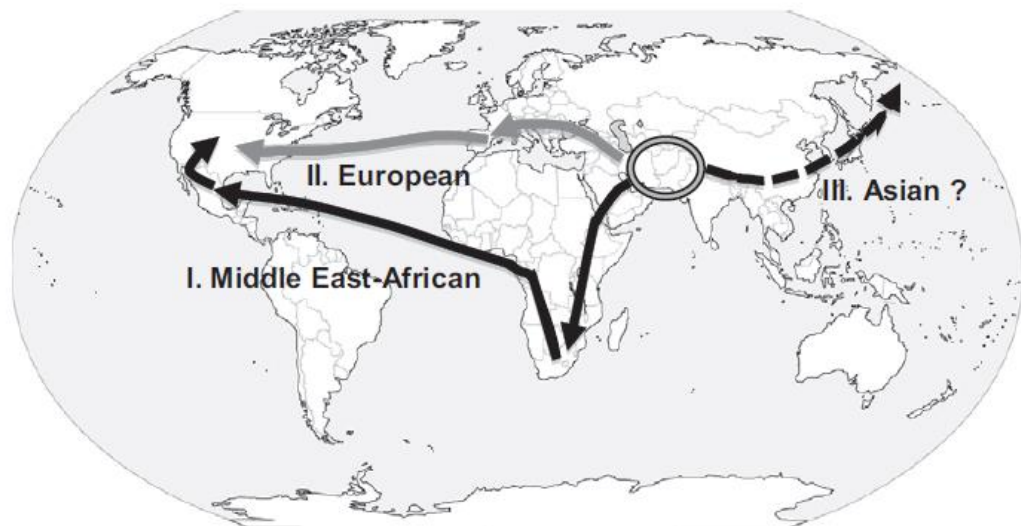
Dolatti et al. (2005) jako vůbec první použili mikrosatelity na výzkum *D. noxia*. Ve své studii testovali 10 mikrosatelitních lokusů na vzorcích z Íránu. Všechny primery byly izolovány ze *Sitobion miscanthi*, přičemž 4 dvojice primerů byly převzaty z práce Simon et al. (1999) a zbylých 6 dvojic přejali ze studie Wilson et al. (2004). Zjistili, že v daném souboru se vyskytuje menší množství (jeden nebo několik málo) široce rozšířených genotypů a velké množství genotypů vyskytujících se jen řídce. Geograficky se větší množství vzácných genotypů objevovalo na severozápadě, kde jsou chladné zimy a teorie o střídání holocyklu a anholocyklu je zde potvrzena právem. Zároveň výsledky studie odpovídají pracem provedenými na *Sitobion avenae* (kyjatka osenní) (Haack et al., 2000; Papura et al., 2003), která má podobné střídání hostitelů jako *D. noxia* (Dolatti et al., 1995).

Shufran et al. (2007) provedli fylogeografický výzkum *D. noxia* s cílem určit původ invaze do USA. K dispozici měli vzorky sbírané mezi lety 1986 – 2006 z celkem 10 amerických států, Mexika, Kanady, Francie, Jihoafrické republiky a Turecka. Mnoho vzorků bylo převzato z práce Puterka et al. (1993). Jako marker byla využita část genu pro cytochromoxydázou podjednotku I (COI) z mtDNA. Její pomocí byla mezi vzorky jejich souboru dat zjištěna ve své podstatě nulová variabilita. Výsledky Shufrana et al. (2007) se shodují se závěry Puterky et al. (1993), že populace *D. noxia* v USA, Kanadě a Mexiku přišly z téhož zdroje. Za nejpravděpodobnější považují invazi z Jihoafrické republiky do Mexika.

V navazující studii Shufran a Payton (2009) vybrali 8 mikrosatelitních lokusů převzatých z prací Simon et al. (1999) a Wilson et al. (2004) a vyzkoušených Dolattim et al. (2005). Dalším vybraným markerem byla RAPD-PCR pro níž byly vybrány mimo jiné i primery, které ve své práci použil Puterka et al. (1993) a vykazovaly variabilitu mezi populacemi. Variabilita mezi populacemi zjištěná pomocí RAPD-PCR byla nulová. Šest mikrosatelitních lokusů nevykazovalo variabilitu – 4 byly homozygotní a 2 byly heterozygotní, ale monomorfní. Tyto výsledky se liší od Dolattiho et al. (2005), nejen v homozygotnosti a heterozygotnosti lokusů, ale i ve velikosti jednotlivých alel lokusů. Na základě zjištěných dat došli k závěru, že populace *D. noxia* v USA jsou si navzájem velmi blízce příbuzné.

Liu et al. (2010) se rovněž zabývali invazním šířením *D. noxia*. Cílem bylo zjistit kolik invází *D. noxia* bylo, místo jejich původu, míra potenciální adaptace a geografický

rozsah expanze. Pro tuto studii byla jako marker vybrána AFLP analýza (amplified fragment length polymorphism). Výsledný fylogenetický strom rozdělil vzorky do dvou invazních skupin – do první skupiny byly zařazeny vzorky z Íránu, Sýrie, Keni, Mexika a USA (tzv. „Middle East-African“), do druhé skupiny pak patřily Etiopie, Česká republika, Španělsko, Maďarsko a USA (tzv. „European“). Získaná data ukazují, že *D. noxia* se do USA dostala po 2 invazních trasách. První vedla z oblasti původního výskytu přes jižní Afriku do Mexika a dále do USA, zatímco druhá trasa do Spojených států směřovala přes státy střední Evropy a Španělsko. Mapa předpokládaného šíření *D. noxia* v těchto dvou invazích je na Obrázku 1.



Obrázek 1. Hypotetické invaze *D. noxia*

Šedočerný kruh označuje místo původu *D. noxia*, černé šipky představují první invazní proud, šedé šipky druhý invazní proud a přerušovaná černá šipka ukazuje hypotetickou invazi přes Asii.

Převzato z Liu et al. (2010)

Zhang et al. (2012) využili 12 mikrosatelitních lokusů – 3 „cross-species“ lokusy izolované z mšice *Sitobion* a převzaté z prací Simon et al. (1999) a Wilson et al. (1997 a 2004) a z 9 nově vytvořených lokusů přímo pro *D. noxia*. Dále amplifikovali 2 úseky z mtDNA (část genu pro COI a delší fragment zahrnující částečně NADH dehydrogenázu podjednotku 4L (ND4L), 2 tRNA geny, celou NADH dehydrogenázu podjednotku 6 (ND6) a částečně cytochrom *b* (*Cytb*)). Vzorky použité ve studii sbírali ve dvou letech, aby porovnali variabilitu nejen v rámci jednotlivých lokalit ale i v rámci času. Během vyhodnocování bylo zjištěno, žádné genotypy v jednom roce sbíraných

vzorků se neopakují v druhém roce. Toto zjištění podporuje výsledky o pohlavním rozmnožování mšic Zhanga et al. (1999). Byla zjištěna vyšší genetická diverzita v severních částech Číny než v jižních – jako možná vysvětlení autoři uvádí různý selekční tlak, různé ekologické podmínky nebo vliv klimatu a zeměpisné polohy.

V naší laboratoři již bylo na *D. noxia* vypracováno několik studií.

Bc. Michala Korandová (2011) provedla RADP-PCR analýzu 49 vzorků z 12 lokalit. Použila k tomu 4 RAPD primery a potvrdila variabilitu nejen mezi populacemi, ale i mezi jedinci jednotlivých populací a tím se jí podařilo potvrdit vhodnost této metody pro určení genetické variability mšice zhoubné. RAPD-PCR sice vykazuje variabilitu, ale jedná se o dominantní marker (nelze rozlišit homozygoty od heterozygotů) a je analýzou velmi citlivou na podmínky, čímž se stává jen velmi těžko opakovatelnou a reprodukovatelnou. Polymorfní fragmenty se nepodařilo dále charakterizovat, a proto nebylo v práci pomocí tohoto markeru pokračováno a pro další výzkumy byly vybrány mtDNA, mikrosatelity a analýza sekundárních endosymbiontů.

Mgr. Andrea Jarošová (2012) zkoušela detekovat endosymbionty pomocí 3 různých metod – diagnostického PCR, RFLP (restriction fragment length polymorphism) a DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis). Jako nejvhodnější se jí jeví metoda DGGE, protože díky ní byli nalezeni i endosymbionti, které jiná metoda neodhalila. U *D. noxia* navíc detekovala 12 druhů endosymbiotických bakterií. Tento výsledek je v rozporu s předcházejícími výzkumy, které ukazovaly, že *D. noxia* žádné sekundární endosymbionty nemá, nicméně se zde neprojevila žádná vazba na geografickou oblast nebo živnou rostlinu.

Mgr. Daniela Chundelová (2012) se zaměřila na nalezení nejvhodnějšího úseku z mtDNA, který by byl schopen prokázat variabilitu mezi populacemi *D. noxia*. Nejprve zkoušela amplifikovat tzv. barcode – část genu pro cytochrom oxidázu podjednotku I (COI) a v souladu se studii Shufan et al. (2007) a Shufan a Payton (2009) variabilitu mezi populacemi ani jedinci nepotvrdila. Po vyzkoušení dalších úseků mtDNA tzv. „AT-region“ a „repeat region“ (nekódující na A, T bohaté části mtDNA) a fragment obsahující geny ATP8 a ATP6 opět nebyla odhalena žádná variabilita (Chundelová – nepublikováno). Po těchto pokusech se zaměřila na osekvenování celé mtDNA *D. noxia* s cílem vytipovat úseky vhodné k rozlišení populací a jedinců. Pomocí nukleotidové analýzy vytipovala 5 částí mtDNA (velká a malá podjednotka rRNA, geny ATP8, ND5 a ND4L), které vykazují nadprůměrně vysokou variabilitu.

Mgr. Jiří Pašíkovský (2011) se zabýval mikrosatelity a zavedením metod EPIC-PCR (exon-primed intron-crossing). K dispozici měl 49 vzorků *D. noxia* z 12 lokalit (vzorky byly shodné jako v práci Korandová (2011)). Metoda EPIC-PCR byla úspěšně zavedena, ale populace *D. noxia* jí nebyly rozděleny podle geografické příslušnosti. Pro práci s mikrosatelity Pašíkovský vybral z literatury 6 lokusů (Simon et al., 1999; Wilson et al., 2004; Dolatti et al., 2005; Weng et al., 2007; Shufrán a Payton, 2009) a následně optimalizoval podmínky PCR a polyakrylamidové gelové separace. Pět lokusů vykazovalo variabilitu a na jejich základě potvrdil teorie o cyklické partenogenezi v temperátních oblastech (Starý, 1996; Liu, et al., 2010).

RNDr. Petr Starý, který se na Entomologickém ústavu AV ČR již dlouhá léta věnuje studiu migračních tras *D. noxia*, preferuje hypotézu, že trasy navržené Liem et al. (2010) neodpovídají skutečné situaci. Jeho teorie zachovává dvě migrační trasy, přičemž jedna vede z území kolem Íránu, přes Turecko a státy severní Afriky do Španělska a odtud pak do USA. Druhá trasa začíná také na území Íránu, ale dále pokračuje přes Moldavsko na severozápad do Maďarska a České republiky (P. Starý, osobní komunikace). Tato teorie je podpořena i výsledky publikace Havelka et al. (v přípravě).

Tato diplomová práce je pokračováním studie provedené Mgr. Jiřím Pašíkovským. Soubor vzorků byl rozšířen o další lokality a byly vybrány další mikrosatelitní lokusy, aby byla zvýšena průkaznost jím zjištěných dat.

1.4 Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou v současné době jedním z nejrozšířenějších genetických markerů v evolučních, populačních a genetických studiích. Jejich popularita pramení z jejich téměř všudypřítomnosti (kódující i nekódující části genomů, jaderná i organelová DNA), obecně vysoké míry polymorfismu, kodominance a relativně snadný skrínig (Morgante a Plivieri, 1993; Powell et al., 1996; Hutchinson et al., 2003; Selkoe a Toonen, 2006; Carlsson, 2008).

Jednoduché sekvenční repetice (simple sequence repeats – SSRs, short tandem repeats – STRs, variable number tandem repeats - VNTR) neboli mikrosatelity jsou krátké úseky DNA složené z tandemově se opakujících jednotek o délce 1 – 6 párů bazí (Tautz, 1989). Počet opakování je nejčastěji kolem 5 – 40, ale mohou být i delší. V genetických studiích jsou nejčastěji využívány di-, tri- a tetranukleotidová opakování (Selkoe a Toonen, 2006).

V genomu se nejčastěji vyskytují dinukleotidové repetice. Mononukleotidové repetice nepatří mezi běžné, protože díky delšímu řetězci složeného jen z jednoho typu nukletidu nastávají během amplifikace problémy (Li et al., 2002). U tri- a hexanukleotidových repetit se předpokládá, že bývají součástí kódujících oblastí, protože díky nim nevzniká posun čtecího rámce („frameshift“) (Toth et al., 2000).

Na základě původu rozlišujeme 2 druhy STRs. První je odvozen od genomové sekvence, druhý pak od oblasti těsně přilehlé k mikrosatelitní sekvenci (tzv. „flanking region“, „expressed sequence tags“ – EST), která bývá u blízce příbuzných druhů stejná. Obecně lze říct, že genomové STRs jsou polymorfnější než EST-STRs. EST-STRs je díky jejich původu možné snadněji použít i pro blízce příbuzné druhy (např. Zhang et al., 2005) než genomové STRs (Weng et al., 2007).

Mikrosatelity se vyznačují vysokou mutační rychlostí (10^{-2} až 10^{-6} mutací na lokus za generaci), díky které se vyvíjí velmi vysoká úroveň alelické diverzity. Ta je nutná v genetických studiích (Schlötterer, 2000). Sklouzáváním polymerázy při replikaci a hromaděním mutací během rekombinace je zajištěna vysoká variabilita v intronových oblastech (Sunnuck, 2000).

Mezi velké výhody mikrosatelitů jako markeru patří, že díky tomu, že se jedná o DNA marker, je třeba pouze malé množství vstupního materiálu. Tato skutečnost spolu s faktem snadné PCR amplifikovatelnosti z nich dělá levný a rychlý genetický marker. Protože DNA je stabilní molekula, je možné vstupní materiál dlouhodobě skladovat a lze použít i starší vzorky, což například v případě bílkovinných markerů možné není (Selkoe a Toonen, 2006). Dalším kladem je délka amplifikovaných úseků, která se pohybuje mezi cca 100 a 300 bp a ta zaručuje, že mikrosatelity bývají snadno amplifikovány a to navzdory degradaci DNA (Taberlet et al., 1999).

Nevýhoda mikrosatelitů je složité získávání druhově specifických lokusů a naše neznalost mutačních mechanismů jednotlivých lokusů. Výskyt nulových alel v populaci přináší problémy při skórování získaných dat, protože má-li heterozygot nulovou alelu, zdá se, jako by byl homozygot. Má-li nulovou alelu homozygot, tak se jeví jako chybějící data. Nicméně Carlsson (2008) provedl výzkum nulových alel a došel k závěru, že i když některé populace vykazovaly vysokou frekvenci nulové alely, tak její vliv byl velmi mírný.

2. CÍLE PRÁCE

- Doplnit a rozšířit zkoumaný soubor populací *D. noxia* o další lokality.
- Pomocí vybraných mikrosatelitních lokusů porovnat genetickou variabilitu populací *D. noxia* z lokalit z 12 zemí.
- Na základě získaných dat analyzovat fylogeografii a možné směry invazí *D. noxia*.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Materiál

Vzorky *Diuraphis noxia* pro analýzu byly poskytnuty od spolupracovníků z různých vědeckých institucí z Afriky, Ameriky a Evropy (viz Příloha 1.), sběry na území ČR provedli RNDr. Petr Starý a Ing. Jan Havelka, který všechny vzorky také determinoval. V rámci jedné lokality bylo sebráno 1 až 9 vzorků reprezentujících tamní populaci. Každý vzorek byl sebrán jen z jedné rostliny, a pokud byl na téže lokalitě odebírán větší počet vzorků, potom byly sbírány z rostlin nacházejících se nejméně jeden metr od sebe, aby bylo zabráněno odběru pouze klonálních jedinců (Dolatti et al., 2005). Každý vzorek naopak obsahoval větší počet jedinců – klonů. Po sběru byly vzorky uchovávány v 98% etanolu. Dále byly použity 2 vzorky *D. noxia* z chovu původně sebrané v České republice (Hrabětice a Strážnice). Celkem bylo zpracováno 433 vzorků z 12 zemí (viz Tabulka 1.)

Tabulka 1. Seznam zemí a počty vzorků

Země	Počet lokalit	Počet vzorků
Alžírsko	8	66
Česká republika	60	98
Egypt	3	10
Francie	1	1
Chile	1	2
Írán	3	26
Maďarsko	1	3
Moldavsko	6	33
Španělsko	7	51
Tunisko	4	8
Turecko	11	99
USA	4	36
Celkem		433

3.2 Extrakce DNA

K analýze bylo použito 3 – 8 jedinců (klonálních) z každého vzorku. Protože byly uchovávány v etanolu, byly vzorky před extrakcí nechány na filtračním papíře asi 3 minuty při pokojové teplotě, aby se všechnen etanol odpařil, protože by mohl způsobit snížení výtěžku extrakce. Pro extrakci DNA byly použity aerosolové špičky, aby bylo zamezeno kontaminaci cizorodou DNA.

3.2.1 Izolace pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)

Izolace DNA byla provedena dle návodu výrobce, pouze závěrečná eluce DNA z membrány sloupečku byla provedena dvakrát. Poprvé v objemu 100 μ l pufru AE, podruhé v objemu 50 μ l pufru AE. První frakce byla uchována ve 4 °C, druhá frakce byla uskladněna v -20 °C.

3.3 Primery

Pro amplifikaci byly nejdříve vzaty primery, které ve své diplomové práci použil Mgr. Jiří Pašíkovský (*ApEST34*, *ApEST39*, *SmS16b*, *SmS23*, *Sgg2*, *Sa4 Σ*) (Pašíkovský, 2011), který je převzal z literatury (Simon et al., 1999; Wilson et al., 2004; Dolatti et al., 2005; Weng et al., 2007; Shufrana a Payton, 2009). Protože výsledky získané pomocí těchto 6 lokusů nebyly dostatečně průkazné, bylo z literatury vybráno dalších 9 lokusů (*Apg01*, *Apg37*, *Apg42*, *ApEST15*, *ApEST16*, *ApEST24*, *ApEST26*, *ApEST36*, *M49*) (Sloane et al., 2001; Weng et al., 2007). Během optimalizace PCR reakce těchto 9 lokusů vyšla práce zabývající se mikrosatelity *D. noxia* v Číně, ze které byly převzaty primery pro lokusy *Dn1*, *Dn13*, *Dn16*, *Dn22*, *Dn25* a *Dn27* (Zhang et al., 2012). Z těchto 6 lokusů byly 4 vyzkoušeny a 3 byly využity pro další analýzy. Kompletní přehled použitých lokusů s některými dalšími detaily je uveden v Tabulce 2.

Tabulka 2: Přehled použitých lokusů a jejich primerů.

Lokus	Typ opakování	Velikost (bp)	Alely	Sekvence primerů (5' → 3')
<i>ApEST34</i> ¹	(TAT) ₂₁	120 - 1150	4	F: TTGATACGAACACAATGGAA R:CGTGTATTTAGGTTATCGCC
<i>ApEST39</i> ¹	(CATA) ₃₅	245 - 365	2	F:TAGATATCGCCCTGCAGTAT R:ATTGATATGCGAGGAAAGAA
<i>SmS16b</i> ²	(CA) ₁₄	120 - 250	2	F:GTAAAAGTAAAGGTTCCACG R:ATAAAACAAAGAGCAATTCC

<i>Sa42</i> ^{2,3}	(AC) ₅ TT(AC) ₁₀	150 - 176	4	F:GACGTCGATATTAGCCTAGCC R:GTGACGTATAACGCGATGCG
<i>Sgg2</i> ¹	(CA) ₂₃	250 – 340	2	F:GGTATTATTCCCCGTAAGTGC R:GCCCCGTATATAGTTAATGTATGACA TGTC
<i>Dn22</i> ⁴	(CA) _n	176 – 242	29	F: ACGGATTTAACGCAAATTTTA R: CGAATGTAATGCGATGTTGC
<i>Dn13</i> ⁴	(GT) _n	158 – 258	33	F: AGATTCTGCCGTATGTGATTC R: CGCAGCCAACAAGCTATTA
<i>Dn16</i> ⁴	(TG) _n	116 - 178	26	F: GTCCTCGTGGATACTCATCAT R: AATCGGTGTCAGGTTTCG

¹Weng et al., 2007

²Dolatti et al., 2005

³Simon et al., 1999

⁴Zhang et al., 2012

3.4 PCR

Amplifikace požadovaných DNA fragmentů probíhala pomocí metody PCR za použití termocyklérů Eppendorf Master Cycler a Bioer XP Cycler.

PCR reakce byla míchána v objemu 12,1 µl na reakci. Do reakce byl přidáván enhancer BSA (bovine serum albumin, Fermentas) o objemu 0,5 µl na reakci (1,25 µg/µl). Amplifikační profily pro jednotlivé lokusy jsou v Tabulce 3. Každý PCR program byl ukončen chlazením na 4 °C. Po vyndání z termocykléru byly vzorky uchovávány v -20 °C.

Tabulka 3: PCR profily jednotlivých lokusů

		1. predenaturace	2c. denaturace	3c. annealing	4c. elongace	5. postelongace	uchování	počet cyklů
<i>ApEST34</i>	teplota (°C)	94	94	51	72	72	4	30
	čas (s)	120	40	50	50	120	∞	
<i>ApEST39</i>	teplota (°C)	94	94	51	72	72	4	30
	čas (s)	120	40	50	50	120	∞	
<i>SmS16b</i>	teplota (°C)	94	94	45	72	72	4	30
	čas (s)	180	30	30	30	120	∞	

Sgg2	teplota (°C)	94	94	57	72	72	4	35
	čas (s)	120	30	40	60	120	∞	
Sa4Σ	teplota (°C)	94	94	62	72	72	4	35
	čas (s)	120	30	50	60	240	∞	
Dn22	teplota (°C)	94	94	53	72	72	4	35
	čas (s)	60	30	45	60	120	∞	
Dn13	teplota (°C)	94	94	55	72	72	4	35
	čas (s)	60	30	45	60	120	∞	
Dn16	teplota (°C)	94	94	53	72	72	4	35
	čas (s)	60	30	45	60	120	∞	

3.5 Gelová elektroforéza

Úspěšnost amplifikace DNA během PCR reakce byla kontrolována pomocí elektroforetické separace. Kromě úspěšnosti byla touto metodou zjišťována i velikost jednotlivých fragmentů a množství DNA v reakci. Elektroforetická separace byla prováděna na agarózových a polyakryamidových gelech.

3.5.1 Elektroforetická verifikace na agarózových gelech

3.5.1.1 SeaKem[®] LE Agarose (Cambrex)

Z předchozí studie provedené v naší laboratoři (Pašíkovský, 2011) bylo patrné, že agarózové gely připravené z agarózy SeaKem[®] LE Agarose (Cambrex) o koncentracích 1%, 1,5%, 2% a 3% nebudou pro dostatečné rozdělení PCR produktu na gelu vyhovující. Proto bylo vyzkoušeno, jestli by zvýšení koncentrace gelu na 5% nepřineslo výsledky, kterých nižší koncentrace nedosáhly.

5% agarózový gel byl připraven podle následujícího protokolu: 5 g agarózy SeaKem[®] LE Agarose (Cambrex) bylo rozmícháno v 95 ml 1x TAE pufru (40 mM TRIS-Acetate; pH = 8,0; 1 mM EDTA). Směs agarózy a pufru byla rozpuštěna v mikrovlnné troubě a poté pod tekoucí vodou zchlazena na cca 40 °C. Do vlažné směsi bylo přidáno 10 µl ethidium bromidu (0,5 µg/µl), aby nanesené DNA vzorky mohly být zviditelněny pod UV světlem. Tekutý gel byl nalit do předem připravené vany s hřebeny pro vytvoření jamek a při pokojové teplotě v temnu byl nechán 30 minut tuhnout. Hotový gel byl použit k nanesení PCR reakcí a nevyužitý zbytek gelu byl uchován v 1x TAE pufru s přidaným ethidium bromidem (10 µl/250 ml) v chladničce při 4 °C.

Na gel byly naneseny 2 µl PCR reakce smíchané s 2 µl LoadingDye (40% vodný roztok glycerolu, 0,05% bromfenolová modř). Jako velikostní marker byl použit

GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas) nebo GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas) (Obrázek 2 a.). Elektroforéza běžela 30 – 60 (dle velikosti gelu) minut při konstantním napětí 120 V.

Ke zviditelnění DNA na gelu byl použit UV transiluminátor (UVP Transilluminator).

3.5.1.2 NuSieve™ GTG™ Agarose (Lonza)

Protože agaróza SeaKem® LE Agarose (Cambrex) v různých koncentracích nepřinášela výsledky ve vizualizaci očekávaného pruhového patternu, bylo přistoupeno k vyzkoušení agarózy NuSieve™ GTG™ Agarose (Lonza). Jedná se o tzv. nízko tající (low-melting) agarózu vhodnou k oddělování DNA fragmentů o velikosti 10 – 1000 párů bází.

Kvůli lepší manipulaci s gelem z low-melting agarózy byl nejdříve připraven 5% gel z agarózy SeaKem® LE Agarose (Cambrex) a to včetně jamek. Z tohoto gelu byl opatrně vyříznut vnitřek, takže ve vaně na přípravu gelu zbyl asi 0,5 cm široký rámeček. V horním okraji s jamkami byl rámeček široký asi 1 cm. Do takto připraveného rámečku byla opatrně nalita rozpuštěná směs agarózy NuSieve™ GTG™ Agarose (Lonza) a 1x TAE pufru (40 mM TRIS-Acetate; pH = 8,0; 1 mM EDTA) v poměru 2 g agarózy: 98 ml pufru, a 10 µl ethidium bromidu (0,5 µg/µl) na 100 ml gelu. Celá vana byla poté umístěna do chladničky, kde byl gel ponechán asi 45 minut, aby ztuhl.

Poté byla celá vana s gelem přendána do elektroforetické vany a opatrně přelita 1x TAE pufrem vychlazeným na 4 °C. Na gel byly nanесeny 2 µl PCR reakce smíchané s 2 µl Loading Dye (40% vodný roztok glycerolu, 0,05% bromfenolová modř). Jako velikostní marker byl použit GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas). Celá elektroforetická vana byla přenesena do chladničky, připojena k elektrickému zdroji a běžela 10 minut při napětí 95 V a poté bylo napětí sníženo na 45 minut na 80 V.

Po doběhnutí byla nalévací vana z elektroforetické opatrně vyjmuta a přenesena k UV transiluminátoru (UVP Transilluminator) ke zviditelnění DNA.

3.5.2 Elektroforetická verifikace na polyakrylamidových gelech

Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE) byla použita pro lepší schopnost rozdělovat malé fragmenty získané během PCR amplifikace. PAGE byla pouštěna v přístroji „Cleaver Scientific omniPAGE Maxi, VS20D“.

Práce probíhala na nativních polyakrylamidových gelech (Harwood, 2000). Pro první sadu primerů (*ApEST34*, *ApEST39*, *Sgg2*, *SmS16b*, *Sa4Σ*) byly podmínky optimalizovány Mgr. Jiřím Pašíkovským. Během optimalizace podmínek pro zbylé vybrané lokusy byly vyzkoušeny 3,5%, 5% a 12% koncentrace gelu. Složení gelů pro jednotlivé koncentrace je uvedeno v Tabulce 4.

Tabulka 4. Složení gelů

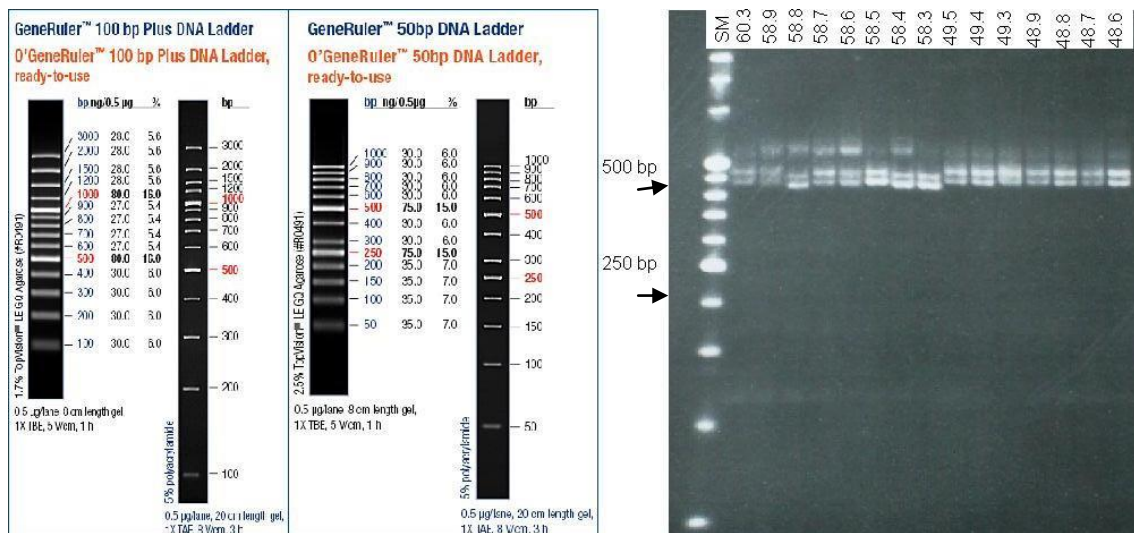
	3,5%	5%	12%
10x TBE pufr	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
zás. roztok 30% akrylamidu	5,8 ml	8,3 ml	20,0 ml
dH₂O	41,3 ml	38,8 ml	27,1 ml
APS	350 μl	350 μl	350 μl

Ze složek uvedených v Tabulce 4. byl připraven roztok, ze kterého bylo odebráno 1,75 ml. Do tohoto malého množství bylo přidáno 17,5 μl APS a 17,5 μl TEMED a tato směs byla rychle nalita mezi připravená elektroforetická skla. Tím byla vytvořena tzv. zátka, která měla zabránit unikání ještě nepolymerizovaného gelu.

Do zbylé části roztoku bylo přidáno 50 μl TEMED, roztok byl dobře promíchán a stříkačkou nalit mezi skla na zátku, následně byly vloženy hřebeny pro tvorbu jamek. Gel byl nechán v pokojové teplotě asi 30 minut polymerizovat.

Do aparatury byly nality 2 – 3 litry 0,5x TBE pufru (spotřeba pufru se odvíjela od potřeby chlazení celé aparatury). Byly vyjmuty hřebeny a pomocí injekční stříkačky a jehly byly jamky vypláchnuty 0,5x TBE puftrem z aparatury. 2 – 4 μl PCR produktu byly smíchány s 3 μl Loading Dye (40% vodný roztok glycerolu, 0,05% bromfenolová modř) nebo 6x DNA Loading Dye (Fermentas) dle návodu výrobce. Jako velikostní marker byl použit GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas) nebo GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas).

Elektroforéza běžela 90 – 120 minut při napětí 230 V. Po doběhnutí byla aparatura rozebrána a gel umístěn do barvicí lázně z 0,5x TBE pufru a ethidium bromidu o konečné koncentraci 1 mg/ml. Gel byl barven přibližně 15 minut. Zviditelnění DNA bylo provedeno na UV transiluminátoru (UVP Transilluminator). Příklad výsledné fotografie gelu je na Obrázku 2 b.



Obrázek 2 a. Size marker GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder a GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder

Obrázek 2 b. Fotografie polyakrylamidového gelu s úspěšně naamplifikovanými vzorky lokusu *Sa4Σ*

3.5.2.1 Použití Enhance IT® Polymer Solution (Elchrom Scientific)

Při práci s polyakrylamidovými gely byl vyzkoušen Enhance IT® Polymer Solution (10x) (Elchrom Scientific). Jedná se o enhancer pro polyakrylamidové gely, které mají poměr akrylamidu vůči bis-akrylamidu 29:1. Cílem přidávání enhanceru byla snaha o větší pružnost gelu a tím lepší manipulaci.

Na jeden gel o velikosti 20 x 20 cm bylo přidáváno 5 ml enhanceru. Pro zachování stejného objemu bylo ubráno poměrné množství vody, aby výsledný roztok měl vždy požadovaných 50 ml.

3.6 Analýza získaných dat

K analýzám populačně – genetických parametrů bylo použito několik programů.

Fotografie polyakrylamidových gelů byly vizuálně odečteny a získaná data zapsána do matice ve formátu Microsoft Excel v programu GenAlEx 6.5 (Peakal a Smouse, 2006). Výsledky pro každý vzorek byly zapisovány číselnými kódy označujícími velikost naamplifikovaných alel. V tomto programu pak byl celý soubor dat i exportován do dalších formátů pro jiný software.

V programu GenClone 2.0 (Arnaud-Haond a Belkhir, 2007) byl pro celý soubor stanoven počet multilokusových genotypů (*MLGs*). *MLGs* jsou genotypy, které vznikají zkombinováním všech použitých mikrosatelitních lokusů u každého jedince. Ze zjištěného počtu *MLGs* byl podle vzorce $DGG = G/N$ vypočten index globální

genotypové diverzity (G je počet $MLGs$ a N počet vzorků v dané populaci). Dále byl vypočten Shannon-Weaverův index diversity (H) dle vzorce $H = -\sum p_i \ln p_i$, kde p_i je frekvence i -tého MLG genotypu (Shannon a Weaver, 1949). Index H lze vyjádřit jako e^H a tento index ukazuje počet jedinců v populaci, kteří v případě ideálního rozšíření budou vykazovat stejnou hodnotu H jako měřený vzorek.

Pomocí programu FSTAT 1.2 (Goudet, 1995) byly spočteny hodnoty F_{ST} a její směrodatné odchylky (SE) pro jednotlivé lokusy.

MicroChecker 2.2.3 (van Oosterhout et al., 2004) byl použit pro vyhledávání nulových alel v jednotlivých populacích. GenePop 4.2 (Rousset, 2008) byl užit pro ověření Hardy-Weinbergovy rovnováhy s důrazem na zjištění nadbytku heterozygotů ($H - excess$) a nedostatku heterozygotů ($H - deficit$). Počet skutečně seskórovaných vzorků pro jednotlivé lokusy a pozorovaný počet alel v lokusech byl zjištěn z programu PopGene v 1.31 (Yeh et al., 1999).

V softwaru GenALEx 6.5 (Peakal a Smouse, 2006) byly vypočteny hodnoty očekávané heterozygotnosti (H_E) a pozorovaná heterozygotnost (H_O) jednotlivých populací, efektivní počet alel (N_e) na populaci, genetická vzdálenost podle Neiho (Nei, 1972), hodnota fixačního indexu F_{IS} pro jednotlivé populace, hodnota F_{ST} pro populace mezi sebou a geografická vzdálenost mezi lokalitami sběru (uváděná v km).

„Isolation by distance“ (IBD) testy slouží ke zhodnocení, jestli geograficky vzdálené populace vykazují genetickou odlišnost a zda existuje korelace mezi genetickou a geografickou vzdáleností. Jedním z možných způsobů jak to zjistit je Mantelův test (Mantel, 1967), v němž byly porovnány matice geografické vzdálenosti a mezipopulačních F_{ST} hodnot, aby bylo možné zhodnotit, jestli je korelace mezi geografickou a genetickou vzdáleností v daném souboru dat. Statistická průkaznost byla stanovena na základě 999 permutací.

Analýza hlavních komponent (principal component analysis, PCoA) je metoda nahrazující velký soubor základních měřených proměnných a často vůči sobě korelovaných hodnot menším množstvím vzájemně nekorelovaných proměnných, které vznikly buď lineární kombinací nebo váženým průměrem měřených proměnných hodnot (Lepš, 1996). Na výsledném grafu je možné posoudit, které populace jsou si bližší, protože společně tvoří klastr.

Analýza molekulární variance (analysis of molecular variance, AMOVA) alelových frekvencí (Wrightovy F – statistiky) porovnává varianci mezi populacemi a uvnitř populací (Excoffier et al., 1992). Aby mohla být otestována genetická struktura

pomocí tohoto modelu, bylo potřeba vzorky z lokalit, kde jich bylo sesbíráno malé množství, sloučit s nejbližší populací. AMOVA byla zadávána ve třech formách, aby byla vypočtena variabilita mezi státy, kontinenty a mezi 2 předpokládanými invazními směry. Počet opakování byl nastaven na 999 a byla zvolena možnost „within individual analysis suppressed“ (potlačení analýzy mezi jedinci).

V programu Alleles In Space (AIS) (Miller, 2005) byly vybrány 2 postupy zobrazující vztahy mezi jednotlivými lokalitami a jejich populacemi. Procedura „Interpole Genetic Landscape Shape“ umožňuje vizualizaci schématu diversity napříč krajinou. Její pomocí jsou vytvářeny trojrozměrné prostorové grafy, kde osy x a y odpovídají zeměpisným souřadnicím a osa z představuje genetické vzdálenosti. Čím vyšší vrchol je zobrazen, tím větší genetickou vzdálenost mají nejbližše položené populace mezi sebou. Druhou procedurou je „Monmonier’s Maximum Difference Algorithm“. Do mapy lokalit uvozené GPS souřadnicemi je umístěna Voroného teselace (rozděljuje rovinu na n oblastí tak, že žádný bod q v oblasti není blíže k bodu p_i než k jakémukoli bodu p_i v rovině (www.natur.cuni.cz/~bayertom/Adk/adk6.pdf)) a přes Delaunayho triangulaci (nejrychlejší a nejpřímější cesta k propojení sousedících oblastí, aby vznikly trojúhelníky) Monmonierův algoritmus propočte biogeografické hranice začínající na maximálních vzdálenostech mezi dvěma populacemi a pokračuje dokud nenarazí na okraj vymezený GPS souřadnicemi, nevytvoří smyčku nebo nenarazí na již spočtenou hranici (Patten a Smith-Patten, 2008).

STRUCTURE (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003) je software pro zpracování populační struktury z genotypových dat ze souboru na sobě nezávislých markerů. STRUCTURE předpokládá model, ve kterém je k populací (k může být neznámá), kdy každá z populací je charakterizována vlastní sadou alelových frekvencí na lokus. Jedinci ze souboru jsou přiřazeni do populací (na základě pravděpodobnosti) nebo pokud se jejich genotypy zdají být smíšené, tak do dvou i více. Předpokládá se, že v populacích jsou vzorky v Hardy – Weinbergově a vazebné rovnováze (Pritchard et al., 2000). Byl zadán set o 4 modelech s následujícími vstupními hodnotami: model A – „admixture“ (o jedincích není možné říct, že jsou příslušníky jen jedné populace), „correlated“ (frekvence alel je sobě závislá), $K = 1 - 10$ (počet předpokládaných klastřů), 10 iterací, model B – „admixture“, „independent“ (frekvence alel je na sobě nezávislá), $K = 1 - 10$, 10 iterací, model C – „no admixture“ (jedinci jsou příslušníky jen jedné populace), „correlated“, $K = 1 - 10$, 10 iterací, model D – „no admixture“, „independent“, $K = 1 - 10$, 10 iterací. Burn-in period: 100 000 a 500 000 opakování

platilo pro všechny simulace. Optimální hodnota ΔK byla vybrána pomocí internetové aplikace Structure Harvester (Earl a von Holdt, 2012).

Dendrogram byl vytvořen metodou NeighborJoining (NJ) v programovém balíčku PHYLIP (pomocí programů NEIGHBOR a CONSENSE; Felsenstein, 1995) a jeho úpravy byly provedeny v programu FigTree verze 1.3.1 (Rambaud, 2009). Strom vychází z Nei - genetic distance (1972), 1000x bootstrap na lokus. Z důvodu malého počtu vzorků v některých populacích, byly takovéto populace sloučeny a v dendrogramu jsou v těchto případech jména populací sloučena.

4. VÝSLEDKY

4.1 Materiál

V této práci byl testován soubor dat o celkovém počtu 441 vzorků z 12 lokalit celého světa, ze kterého bylo 8 vzorků vyřazeno a nebylo dále analyzováno.

4.2 Mikrosatelitní lokusy a PCR

Mikrosatelitní lokusy byly zpracovávány ve třech časově oddělených skupinách.

První skupina obsahovala 6 lokusů zoptimalizovaných Mgr. Jiřím Pašíkovským. Pět se jich podařilo úspěšně naamplifikovat, jeden (*SmS23*) byl vyřazen, protože výsledky nevycházely jednotné.

Pro druhou skupinu stávající se z 9 lokusů (převzaty ze Sloane et al., 2001; Weng et al., 2007) byly vytvořeny 3 základní PCR profily. V základním profilu nefungoval ani jeden lokus tak, aby mohl být rutinně zpracován a během další optimalizace bylo 5 lokusů (*Apg01*, *Apg42*, *ApEST15*, *ApEST24*, *ApEST26*) vyřazeno kvůli špatnému dělení a zbylé 4 lokusy (*Apg37*, *ApEST16*, *ApEST36*, *M49*) nebyly využity z důvodu přechodu k optimalizaci lokusů z publikace Zhang et al. (2012).

Třetí skupina obsahovala specifické mikrosatelitní primery pro *D. noxia* (Zhang et al., 2012). Byly vyzkoušeny 2 PCR profily s teplotou annealingu převzatou z původní studie. Jejich pomocí se podařilo úspěšně naamplifikovat 4 lokusy (*Dn1*, *Dn13*, *Dn16*, *Dn22*), ze kterých byly pro další analýzy použity 3. Zbylé 2 lokusy (*Dn25*, *Dn27*) nebyly dále využity z důvodu nedostatku času.

4.3 Gelová elektroforéza

Lokusy optimalizované J. Pašíkovským a převzaté z publikace Zhang et al. (2012) byly elektroforeticky separovány na 5% nativním polyakrylamidovém gelu.

4.3.1 Agarózové gely

4.3.1.1 SeaKem[®] LE Agarose (Cambrex)

Úspěšnost PCR amplifikace lokusu *Apg42* byla zkoušena na 5% agarózovém gelu. Funkčnost PCR profilu na lokus *Apg42* byla potvrzena, ale nedošlo ke správnému rozdělení fragmentů a práce na gelu z agarózy SeaKem[®] LE Agarose dále nepokračovala.

4.3.1.2 NuSieve™ GTG™ Agarose (Lonza)

Na 2% gel z low-melting agarózy byly nanášeny vzorky lokusu *Apg42* a výsledek byl stejný jako v případě SeaKem® LE Agarose. Funkčnost PCR profilu na lokus *Apg42* byla potvrzena, ale fragmenty nebyly správně rozděleny a proto byly vzorky separovány na polyakrylamidových gelech.

4.3.2 Polyakrylamidové gely

Pro vzorky lokusu *ApEST24* byla kvůli předpokládaným malým fragmentům vyzkoušena 12% koncentrace gelu. Jeho pomocí nedošlo ke zlepšení čitelnosti dat a lokus nebyl dále zpracováván.

ApEST15 vykazoval přítomnost velkých fragmentů a z toho důvodu byla elektroforetická separace vyzkoušena na 3,5% gelu. Lokus vykazoval variabilitu nikoli však polymorfismus a to vedlo k jeho vyřazení.

4.3.3 Enhance IT® Polymer Solution (Elchrom Scientific)

Enhancer pro polyakrylamidové gely Enhance IT® Polymer Solution (Elchrom Scientific) usnadnil manipulaci s gelem, který byl díky němu pružnější a méně náchylný k roztržení. Další výhodou byla lepší čitelnost gelu, protože došlo k zостření pruhů při fotografování gelů.

4.4 Statistická analýza

Polyakrylamidové gely byly vizuálně vyhodnoceny a výsledky byly zapsány do tabulky v programu GenAlEx 6.5 (Peakal a Smouse, 2006) ve formě číselných hodnot udávajících velikost jednotlivých alel. Dále byly vytvořeny vstupní soubory pro programy GenClone, FSTAT, PopGene, GenPop, MicroChecker a STRUCTURE.

Pro statistické analýzy byly použity lokusy uvedené v Tabulce 2.

4.4.1 Variabilita lokusů

V programu PopGen byl pro každý lokus vypočten počet alel, které se nachází ve zkoumaném datasetu a počet vzorků, které byly úspěšně naamplifikovány. Nejvíce alel bylo nalezeno u lokusu *Dn16*, nejméně pak u *SmS16b*. Pozorovaná heterozygotnost vykazuje značné rozdíly, lokus *SmS16b* nemá žádné heterozygoty, *Sa4Σ* naopak nemá žádné homozygoty. Nejmenší variabilita v lokusech mezi populacemi je pozorována u

Sgg2 a nejvariabilnějším lokusem na základě F_{ST} je *ApEST39*. Všechny hodnoty jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5. Použité mikrosatelitní lokusy

Lokus	Počet alel	Počet vzorků	H_o	F_{ST} (SE)
<i>ApEST39</i>	2	400	0,424	0,265 (0,052)
<i>ApEST34</i>	2	433	0,609	0,102 (0,037)
<i>SmS16b</i>	1	425	0,000	---
<i>Sgg2</i>	2	412	0,664	0,083 (0,019)
<i>Sa4Σ</i>	4	428	1,000	0,104 (0,023)
<i>Dn22</i>	2	422	0,702	0,155 (0,040)
<i>Dn13</i>	4	326	0,966	0,150 (0,027)
<i>Dn16</i>	5	417	0,753	0,180 (0,027)

4.4.2 Genetická variabilita populací

Tabulka 6. ukazuje celkové hodnoty pro jednotlivé populace. Všechny vzorky byly rozděleny do 67 populací podle místa sběru.

Pro všech 433 vzorků bylo detekováno celkem 243 různých genotypů, z toho 181 se jich vyskytlo pouze jednou. Nejnižší hodnotu indexu globální genotypové diversity vykazuje populace ze španělského San Marina (0,33), nejvyšší hodnota 1 byla vypočtena pro velké množství populací. Jedná se nejen o populace s malým celkovým počtem vzorků (1 – 3 vzorky na populaci), ale i o populace v rámci datového souboru větší (7 – 9 vzorků v populaci). Geneticky nejchudší jsou populace s jedním zástupcem na populaci, nejbohatším je pak očekávaně populace z okolí moravského Znojma. Efektivní počet alel udává počet stejně častých alel, nejvyšší hodnotu vykazuje populace z okolí Znojma, nejnižší pak opět má velké množství populací. Sledovaná heterozygotnost je u všech populací větší než předpokládaná. V jedné populaci byl zjištěn nedostatek heterozygotů, v převážné části populací se naopak vyskytuje nadbytek heterozygotů. Velké množství populací je ve vazebné nerovnováze. Při porovnání hodnot F_{IS} je patrné, že relativně velké množství populací má jen heterozygoty, všechny tyto populace ale mají pouze 1 – 2 jedince. Nejvyšší hodnotu F_{IS} 0,010 má populace z moldavského Brinzeni.

Tabulka 6. Celkové hodnoty pro jednotlivé populace (jednotlivé zkratky populací jsou uvedeny v Příloze 1.)

	N	$MLGs$	DGG	e^H	N_e	H_o	H_E	P <i>deficit</i>	P <i>excess</i>	Multilocus F_{IS}
IRBirBP11	9	6	0,67	5,313053	1,667	0,592	0,349	ns	*	-0,476
IRBir10	8	5	0,63	4,455655	1,800	0,607	0,383	ns	*	-0,565
IRKer9	9	6	0,67	5,349376	1,756	0,569	0,379	ns	*	-0,387
EGRaf8	1	1	1,00	1,000000	1,625	0,625	0,313	-	-	-1,000
EGEls6	4	3	0,75	2,828425	2,114	0,625	0,426	ns	*	-0,476
EGEls7	5	4	0,80	3,789288	1,897	0,575	0,383	ns	*	-0,408
TRCuKo17	9	8	0,89	7,715105	2,201	0,569	0,462	ns	*	-0,155
TRCuKo18	9	7	0,78	6,240192	2,142	0,649	0,456	ns	*	-0,318
TRCuKo19	9	6	0,67	5,349376	1,937	0,667	0,445	ns	*	-0,483
TRKaKo14	9	6	0,67	4,888455	1,864	0,611	0,392	ns	*	-0,562
TRKaKo15	9	5	0,56	4,326724	1,732	0,583	0,370	ns	*	-0,573
TRKaKo16	9	7	0,78	6,240192	2,119	0,625	0,450	ns	*	-0,277
TRCaKo13	9	8	0,89	7,715105	2,133	0,597	0,452	ns	*	-0,219
TRMeKo20	9	9	1,00	8,999879	2,124	0,625	0,441	ns	*	-0,298
TRSaKo12	9	9	1,00	8,999879	2,065	0,556	0,407	ns	*	-0,349
TRBeKo21	9	7	0,78	6,613738	2,227	0,667	0,480	ns	*	-0,317
TRBeKo22	9	7	0,78	6,613738	2,120	0,667	0,460	ns	*	-0,382
MDCini35	2	2	1,00	1,999999	1,250	0,375	0,188	ns	*	-1,000
MDZabEd65	3	3	1,00	2,999995	1,945	0,458	0,378	*	ns	-0,187
MDHanc63	6	6	1,00	5,999803	2,247	0,529	0,471	ns	*	-0,094
MDBuel64	7	7	1,00	7,000123	1,982	0,518	0,426	ns	*	-0,151
MDBridz61	6	5	0,83	4,762096	2,119	0,479	0,444	ns	*	0,010
MDBaVe50	9	9	1,00	8,999879	2,125	0,493	0,442	ns	*	-0,015
HUBuda42	3	3	1,00	2,999995	1,823	0,417	0,278	ns	*	-0,492
CRNJ	2	2	1,00	1,999999	1,400	0,375	0,219	ns	*	-0,667
CRUH	2	2	1,00	1,999999	1,708	0,625	0,328	ns	*	-0,920
CROP	1	1	1,00	1,000000	1,250	0,375	0,188	-	-	-1,000
CRZLKM	10	10	1,00	9,999885	2,136	0,565	0,462	ns	*	-0,194
CRHO	3	3	1,00	2,999995	1,948	0,625	0,424	ns	*	-0,441
CRVY	6	6	1,00	5,999803	1,999	0,521	0,442	ns	*	-0,131
CRBV	1	1	1,00	1,000000	1,625	0,625	0,313	-	-	-1,000
CRZN	49	41	0,84	38,669240	2,304	0,546	0,492	ns	*	-0,075
CRTR	1	1	1,00	1,000000	1,375	0,375	0,188	-	-	-1,000
CRHB	2	2	1,00	1,999999	1,825	0,688	0,422	ns	*	-0,619
CRJN	1	1	1,00	1,000000	1,375	0,375	0,188	-	-	-1,000
CRNBKOKH	3	3	1,00	2,999995	2,200	0,625	0,472	ns	*	-0,300
CRPETA	7	7	1,00	7,000123	2,083	0,640	0,456	ns	*	-0,380

CRCL	1	1	1,00	1,000000	1,375	0,375	0,188	-	-	-1,000
CRPZ	1	1	1,00	1,000000	1,500	0,500	0,250	-	-	-1,000
CRCBPTJH	6	6	1,00	5,999803	2,085	0,646	0,464	ns	*	-0,397
CRKL	1	1	1,00	1,000000	1,375	0,500	0,250	-	-	-1,000
CRTP	1	1	1,00	1,000000	0,875	0,250	0,125	-	-	-1,000
TNSou3	2	2	1,00	1,999999	1,375	0,500	0,250	ns	*	-1,000
TNHer4	2	1	0,50	1,000000	1,625	0,625	0,313	ns	*	-1,000
TNHer5	2	1	0,50	1,000000	1,625	0,625	0,313	ns	*	-1,000
TNEnf2	2	2	1,00	1,999999	1,575	0,563	0,297	ns	*	-0,867
DZKais25	9	6	0,67	5,349376	1,833	0,556	0,389	ns	*	-0,413
DZAinKe23	9	9	1,00	8,999879	2,042	0,549	0,403	ns	*	-0,273
DZEIKhr26	9	8	0,89	7,715105	1,871	0,538	0,376	ns	*	-0,190
DZBou30	9	6	0,67	5,349376	2,080	0,618	0,387	ns	*	-0,575
DZTzou29	8	8	1,00	4,756823	1,915	0,522	0,410	ns	*	-0,133
DZHam27	9	4	0,44	3,999996	2,001	0,681	0,458	ns	*	-0,485
DZAinDjaS28	4	4	1,00	3,999996	1,985	0,510	0,402	ns	*	-0,267
DZAinDja24	9	7	0,78	6,240192	1,898	0,528	0,335	ns	*	-0,570
FrMont1	1	1	1,00	1,000000	1,500	0,500	0,250	-	-	-1,000
ESSalt44	1	1	1,00	1,000000	1,500	0,500	0,250	-	-	-1,000
ESCa149	5	4	0,80	3,789288	1,756	0,475	0,331	ns	*	-0,424
ESSanMa46	9	3	0,33	2,888842	1,622	0,556	0,312	ns	*	-0,780
ESCube48	9	5	0,56	4,585728	1,673	0,528	0,340	ns	*	-0,445
ESlaPob47	9	6	0,67	5,669596	1,744	0,528	0,373	ns	*	-0,408
ESAlgua43	9	5	0,56	4,166414	1,842	0,500	0,349	ns	*	-0,419
ESVen45	9	4	0,44	3,369912	1,692	0,500	0,325	ns	*	-0,528
CLChi41	2	2	1,00	1,999999	2,250	0,500	0,344	ns	ns	-0,500
USAHead34	9	6	0,67	4,860235	1,757	0,514	0,360	ns	*	-0,290
USAPear33	9	5	0,56	4,166414	1,745	0,514	0,368	ns	*	-0,325
USAJunCa31	9	6	0,67	4,860235	1,913	0,556	0,355	ns	*	-0,581
USATur32	9	6	0,67	4,860235	1,883	0,542	0,351	ns	*	-0,545

Program MicroChecker byl použit pro vyhledání nulových alel. Nulové alely byly detekovány u 3 lokusů – *Dn16*, *ApEST34* a *ApEST39* a 7 populací. Lokusy *Dn16* a *ApEST39* vykazovaly nulovou alelu u 2 a lokus *ApEST34* u 3 populací. Žádná z populací však neměla nulovou alelu nalezenou ve více než jednom lokusu.

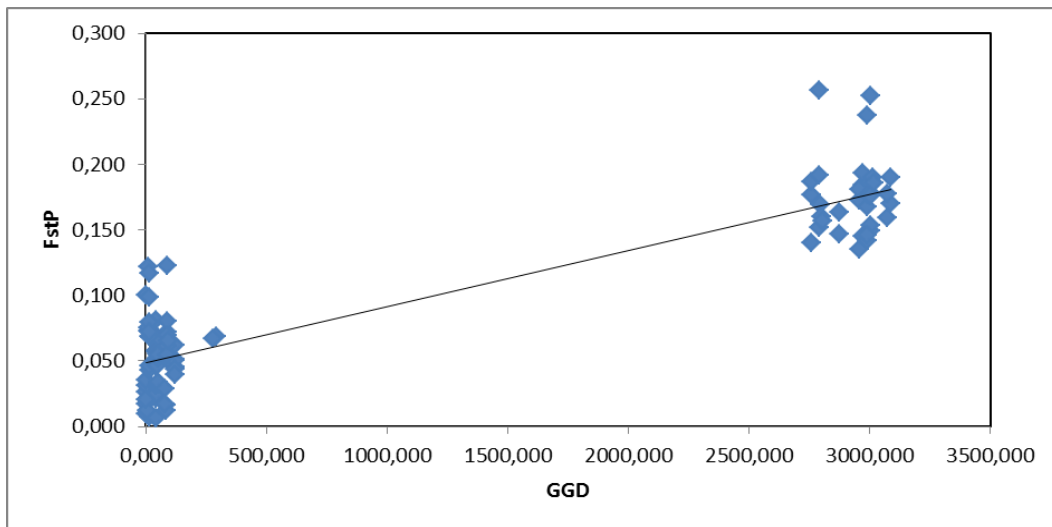
V programu GenALEx byla vytvořena matice genetických vzdáleností podle Neiho (1972) a geografických vzdáleností mezi jednotlivými lokalitami sběru (uváděná v kilometrech). Z důvodu její velikosti je zařazena jako Příloha 2.

Pomocí Mantelova testu v programu GenAlEx byly porovnány hodnoty F_{ST} mezi populacemi a geografickou vzdáleností pro zjištění závislosti geografické a genetické vzdálenosti. Model byl zadán pro státy a ty pak byly děleny na africkou invazi, evropskou invazi a nakonec pro kontinenty. (V testu Afrika - regiony byly porovnány všechny africké populace mezi sebou, v testu Afrika – státy pak byly hodnoty pro výpočet shluknuty z jednoho státu do jedné populace. Stejným způsobem bylo postupováno u všech modelů.) Asie a Amerika nemohly být spočteny kvůli malému zastoupení zemí. Zjištěné hodnoty P Mantelova testu jsou uvedeny v Tabulce 7. Na základě Mantelova testu byla zjištěna korelace mezi genetickou a geografickou vzdáleností u 3 modelů: Asie – regiony, Evropa – regiony a africká invaze - regiony. Ostatní modely vyšly neprůkazné. Průkazné výsledky Mantelova testu ukazuje obrázek 3 a-c.

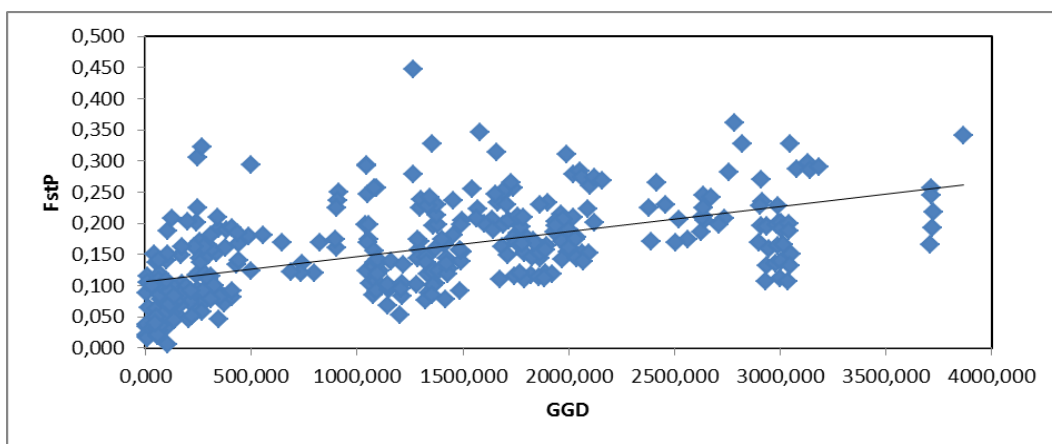
Tabulka 7: Výsledné hodnoty P Mantelova testu a průkaznost

Lokalita	Zjištěná hodnota P	Průkaznost při P<0,05
Afrika - regiony	0,284	ns
Afrika - státy	0,319	ns
Amerika - regiony	0,081	ns
Amerika - státy	---	---
Asie - regiony	0,001	*
Asie - státy	---	---
Evropa - regiony	0,001	*
Evropa - státy	0,312	ns
Invaze evropská - regiony	0,121	ns
Invaze evropská - státy	0,420	ns
Invaze africká – regiony	0,001	*
Invaze africká - státy	0,344	ns

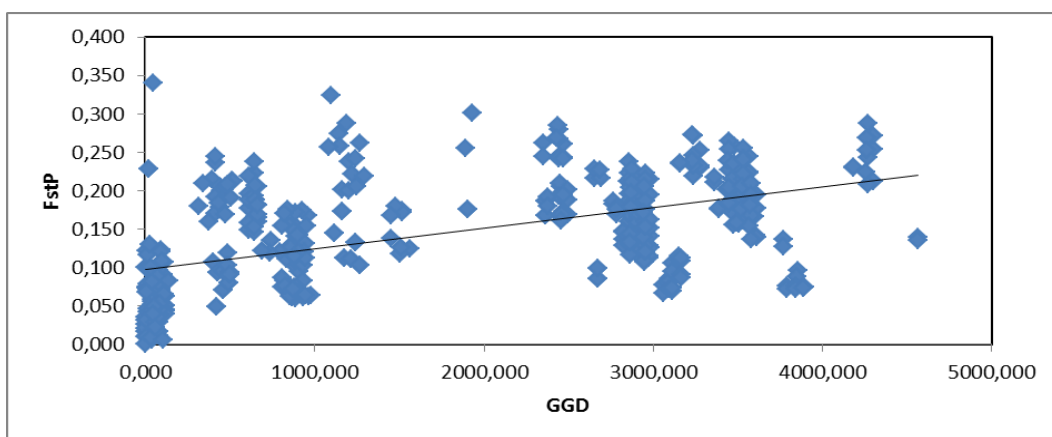
a – Asie – regiony



b – Evropa – regiony



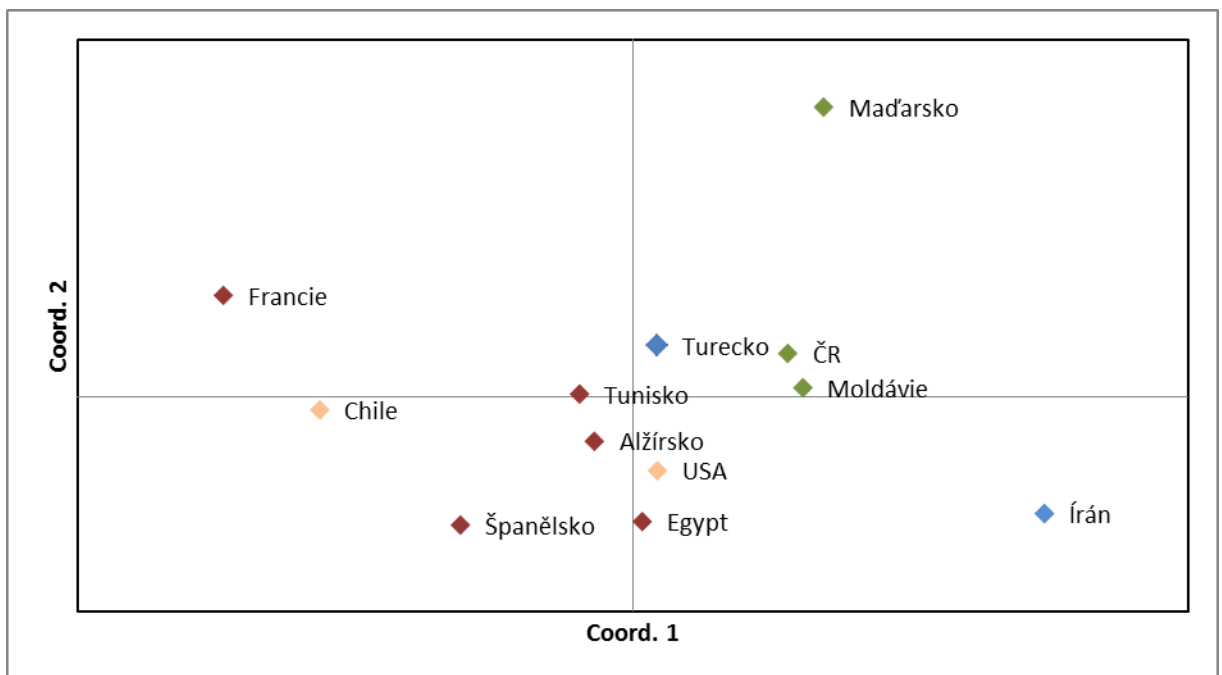
c – Invaze africká – regiony



Obrázek 3 a - c: Průkazné výsledky Mantelova testu

Metodou PCoA byl programem GenAlEx vytvořen graf (Obrázek 4.), na kterém je vidět shoda a podoba proměnných v populacích. Populace, které jsou si příbuznější, tvoří v grafu skupiny.

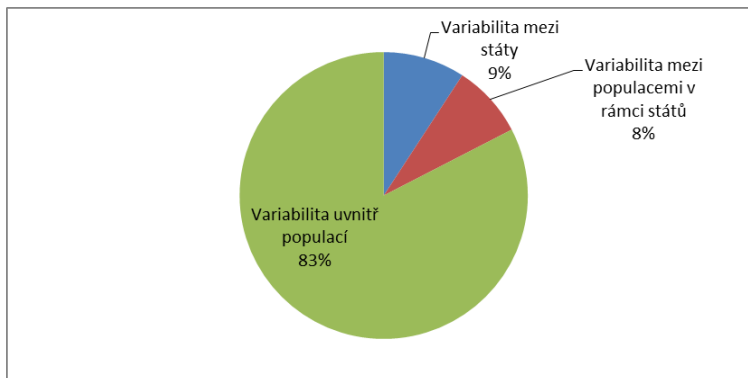
Jednotlivé body v grafu jsou obarveny podle migračních tras, které předpokládá RNDr. Starý. Modrou barvou jsou označeny populace z Íránu a Turecka, které předpokládáme jako východisko africké i evropské migrační trasy. Zeleně je označena evropská trasa, červeně severoafrická trasa a oranžově jsou znázorněny populace z Chile a Ameriky. PCoA graf sestavený z jednotlivých lokalit je zařazen jako Příloha 3.



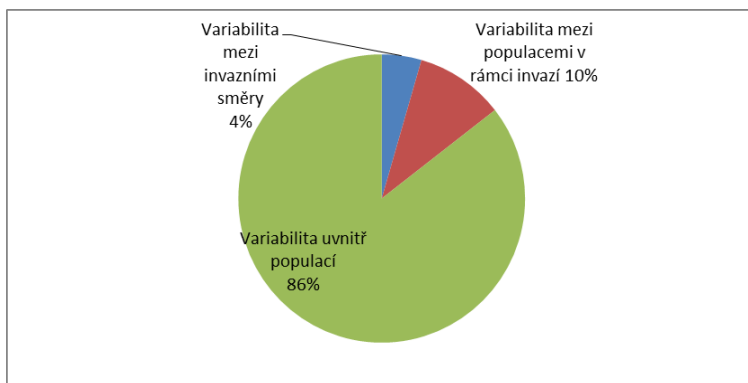
Obrázek 4. Genetická příbuznost zobrazená pomocí modelu PCoA

Analýza molekulární variance – AMOVA zjišťuje, jaká část z celkové variance je mezi populacemi, uvnitř populací a mezi regiony. Největší variabilita byla detekována uvnitř populací, mezi jednotlivými populacemi, státy, kontinenty a mezi jednotlivými invazními směry byly zjištěné velmi malé rozdíly. Grafy pro jednotlivé modely jsou na Obrázku 5 a - c.

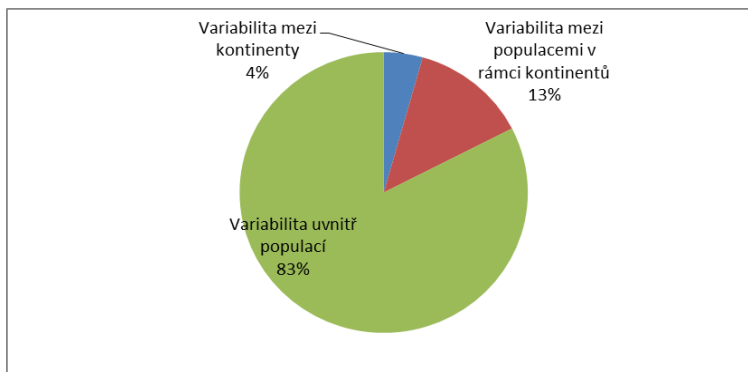
a - variance mezi státy, populacemi a uvnitř populací



b – variance mezi invazemi, populacemi a uvnitř populací



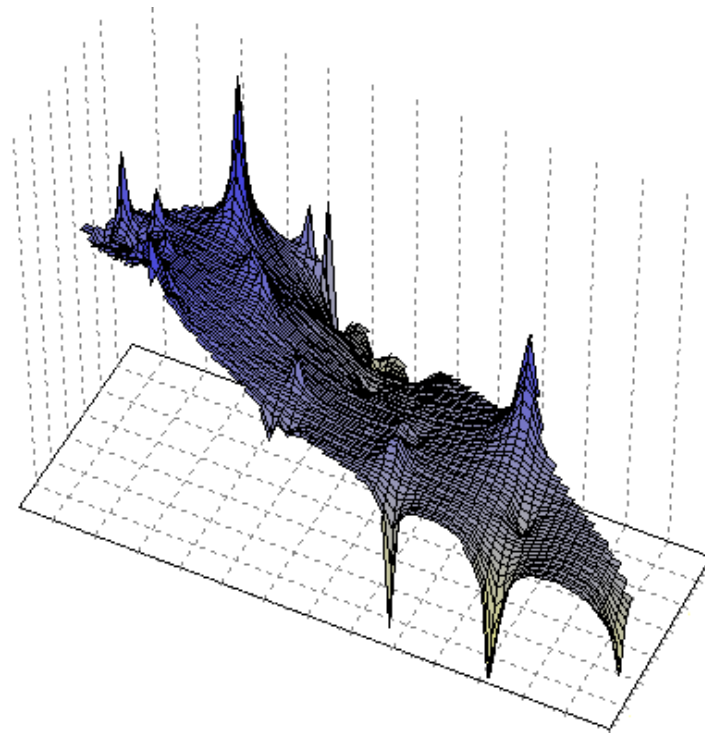
c – variance mezi kontinenty, populacemi a uvnitř populací



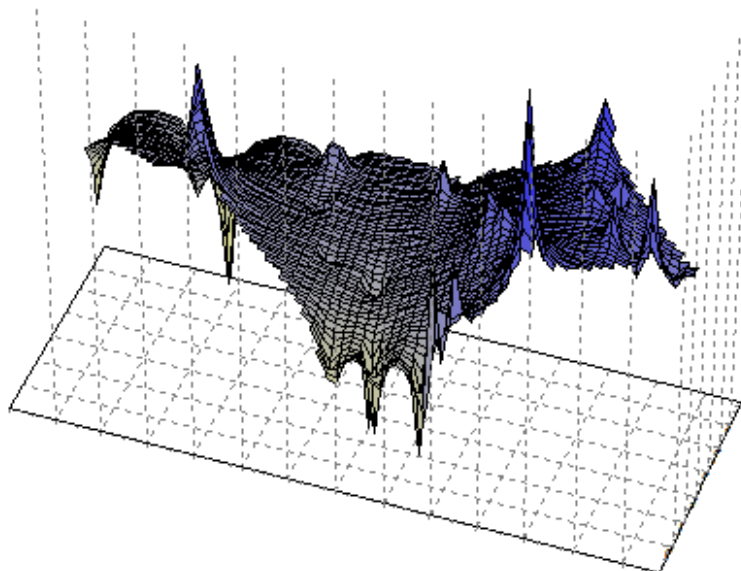
Obrázek 5. a - c Výsledné grafy modelu AMOVA

V programu Alleles In Space byl metodou „Interpole Genetic Landscape Shape“ vytvořen trojrozměrný graf ukazující na místa s nejvyšší genetickou variabilitou (Obrázek 6 a, b). Metodou Monmonier’s Maximum Difference Algorithm byly do prostoru vsazeny bariéry. Jejich počet byl stanoven na 2. Grafická síť s vyznačenými bariérami byla následně implementována do mapy (Obrázek 7.). Základny obou obrázků se shodují, a proto lze snadno zjistit, kde leží vrcholy označující největší

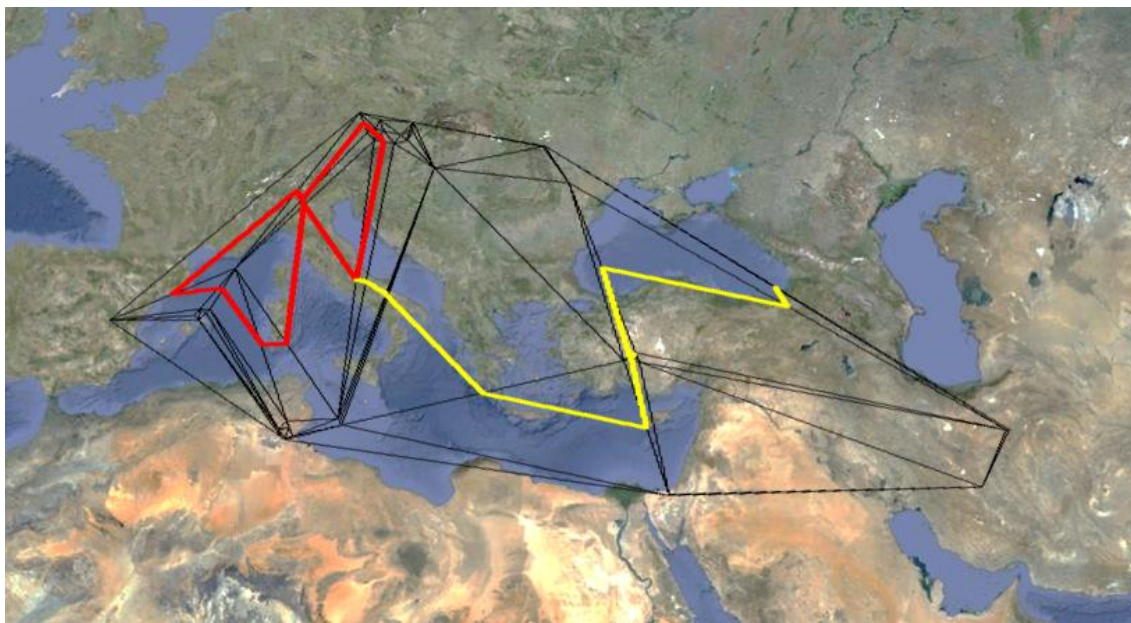
genetickou variabilitu. Z této analýzy byly vyřazeny všechny vzorky z USA a Chile kvůli jejich velké geografické vzdálenosti od ostatních lokalit.



Obrázek 6 a. Trojrozměrný graf ukazující genetickou variabilitu. Sever je na grafu situován nahoře.



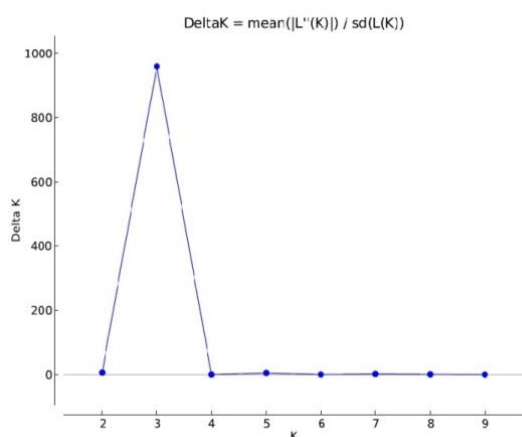
Obrázek 6 b. Trojrozměrný graf ukazující genetickou variabilitu. Sever je na grafu situován dole.



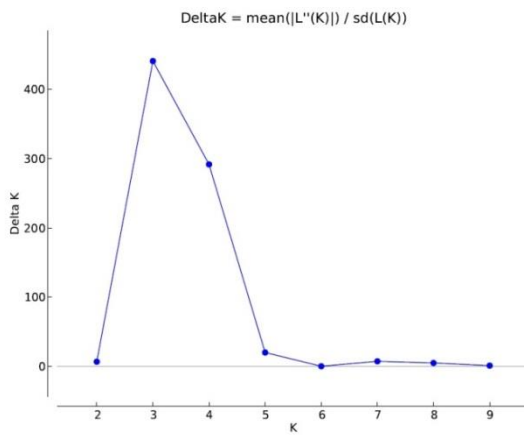
Obrázek 7: Mapa s grafickou sítí s biogeografickými bariérami (v obrázku jsou biogeografické bariéry vyznačeny žlutou a červenou barvou)

Internetová aplikace programu STRUCTURE pro vyhodnocení nejvhodnějšího ΔK , StructureHarvester, vyhodnotila pro model D (no admixture, independent) jako nejlepší $K = 4$, pro ostatní modely (A = admixture, correlated, B = admixture, independent, C = no admixture, correlated) bylo vyhodnoceno jako nejlepší $K = 3$ (Obrázek 8 a, b, c, d). K je hodnota určující počet „klastřů“, do kterých jsou vzorky řazeny. Výstupem programu STRUCTURE jsou barevné „bargrafy“ (Obrázek 9 a, b, c, d), které ukazují rozdělení vzorků v populacích na příbuzné „klastry“. Každá čára představuje jedince, u něhož je procento „náležitosti“ do jednotlivých klastřů vyznačeno barevně. Čísla pod „bargrafy“ ukazují rozložení v rámci států.

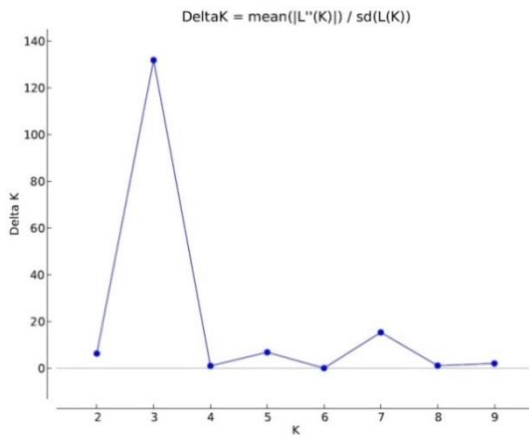
a – grafické vyhodnocení pro model A (admixture, correlated)



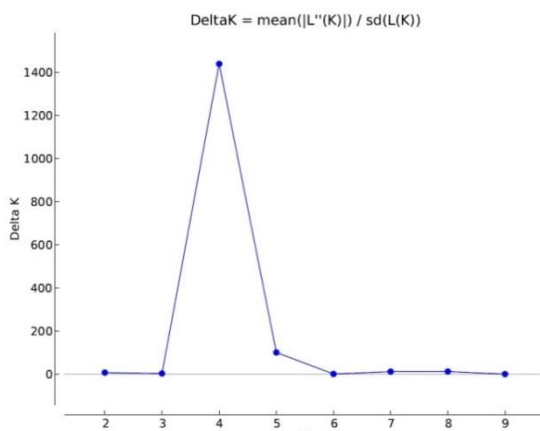
b - grafické vyhodnocení pro model B (admixture, independent)



c – grafické vyhodnocení pro model C (no admixture, correlated)

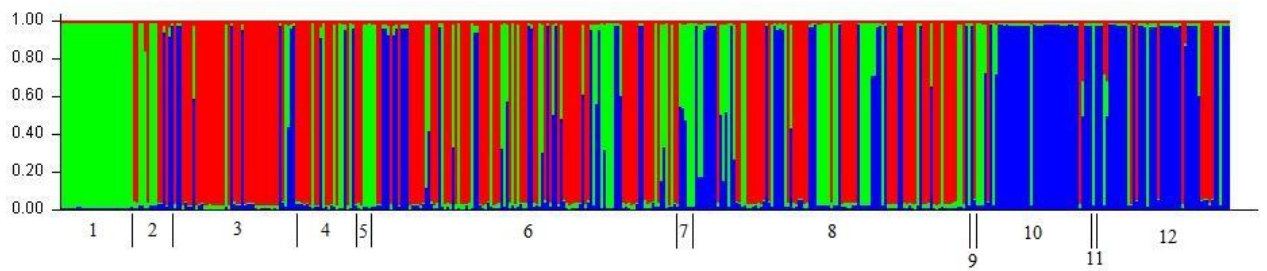


d – grafické vyhodnocení pro model D (no admixture, independent)

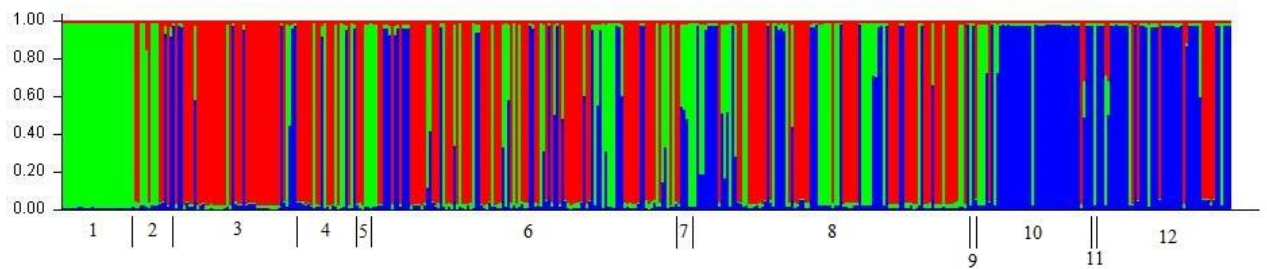


Obrázek 8. Grafické vyhodnocení nejvhodnějšího K

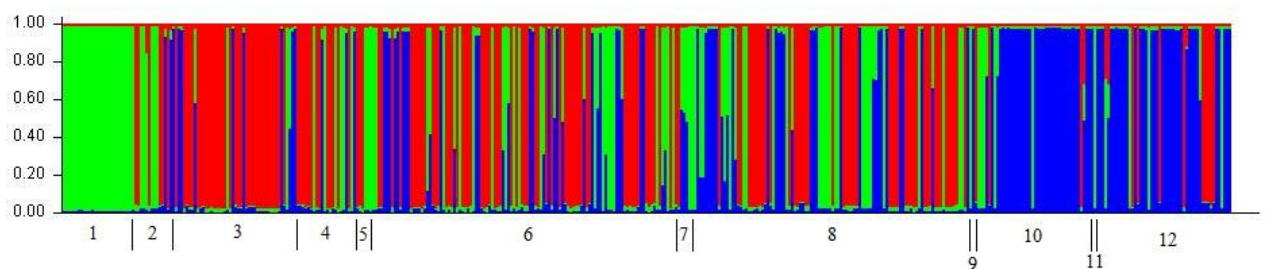
a – „bargraf“ zobrazující model A (admixture, correlated)



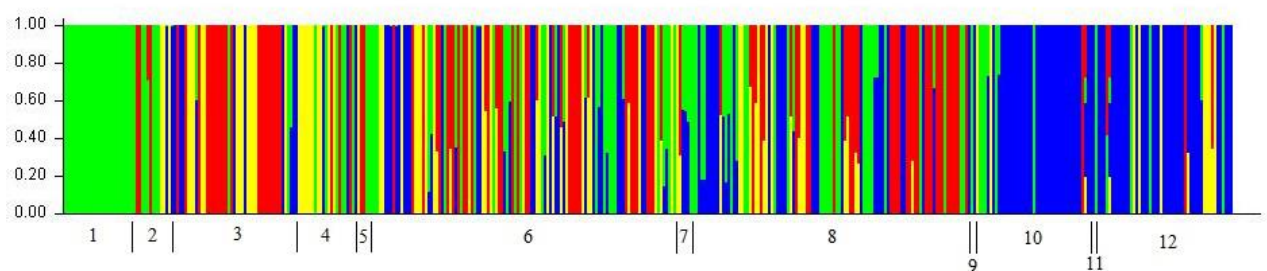
b - „bargraf“ zobrazující model B (admixture, independent)



c - „bargraf“ zobrazující model C (no admixture, correlated)



d - „bargraf“ zobrazující model D (no admixture, independent)



Obrázek 9. „Bargrafy“ zobrazující rozložení vzorků v populacích do „klastřů“

(1 – Írán, 2 – Egypt, 3 – Turecko, 4 – Moldávie, 5 – Maďarsko, 6 – Česká republika, 7 – Tunisko, 8 – Alžírsko, 9 – Francie, 10 – Španělsko, 11 – Chile, 12 – USA)

Na základě získaných dat byl metodou NeighborJoining vytvořen dendrogram vycházející z Nei-genetic distance (1972), 1000x bootstrap na lokus (Obrázek 10).

5. DISKUZE

5.1 Izolace DNA

5.1.1 Izolace pomocí DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)

Izolace DNA byla provedena dle návodu výrobce, pouze závěrečná eluce DNA z membrány sloupečku byla provedena dvakrát a do menšího množství AE pufru než výrobce uvádí. Důvodem této modifikace postupu byla snaha o získání co nejkonzentrovanejšího roztoku DNA, jaké bylo možné.

5.2 Materiál

Soubor dat pro tuto práci obsahoval celkem 441 vzorků z 12 lokalit z celého světa. Dva vzorky chované v laboratoři RNDr. Starého na Entomologickém ústavu AV ČR byly vyřazeny z důvodu kontaminace chovu. Šest vzorků mělo po dokončení odčítání výsledků z gelů velké množství chybějících dat, a proto do dalších analýz nebylo zahrnuto.

5.3 Mikrosatelitní lokusy, PCR a elektroforetická verifikace

Celkem byla zahájena optimalizace 21 lokusů, ta probíhala ve třech časově oddělených skupinách.

V první skupině byly lokusy optimalizovány Mgr. Jiřím Pašíkovským. Lokusy *ApEST39*, *ApEST34*, *SmS16b*, *Sgg2* a *Sa4Σ* byly pak dle jím zjištěných podmínek rutinně zpracovány. Lokus *SmS23* byl vyřazen, protože i přes několikeré opakování vycházely výsledky nejednotné a nebylo možné je jednoznačně interpretovat. Dolatti et al. (2005) s tímto lokusem problémy neměli, v jejich studii byl jedním z polymorfních lokusů a detekovali u něj 3 alely. Shufrán a Payton (2009) ve své práci uvádí lokus *SmS23* jako monomorfní a Zhang et al. (2012) museli *SmS23* vyřadit kvůli velkému množství chyb během skórování.

Pro 9 lokusů převzatých z publikací Sloane et al. (2001) a Weng et al. (2007) byly vytvořeny tři základní profily, ve kterých byl zohledněn počet G/C v primerech a předpokládaná délka amplifikovaných fragmentů. Ze základních profilů žádný nefungoval a bylo nutné přistoupit k optimalizaci jednotlivých primerových dvojic.

Pašíkovský (2011) ve své diplomové práci zkoušel 1%, 1,5%, 2% a 3% agarózový gel pro separaci jednotlivých fragmentů mikrosatelitních lokusů, bohužel žádná z jím zkoušených koncentrací nebyla pro tento marker vhodná. Proto bylo vyzkoušeno dělení lokusu *Apg42* na 5% gelu z agarózy SeaKem[®] LE Agarose (Cambrex). Agarózový gel o 5% koncentraci nebyl schopen uspokojivě rozdělit jednotlivé fragmenty a vznikal tak pouze zdánlivý monomorfní obraz.

Pro další práci byla vybrána agaróza NuSieve[™] GTG[™] Agarose (Lonza). Jedná se o tzv. low-melting (agaróza s nízkou teplotou tání) agarózu, která je vhodná pro dělení fragmentů od 10 do 1000 bp. Práce s touto agarózou je náročná, protože kvůli nízkému bodu tání je třeba připravit rámeček z klasické agarózy, do kterého je poté low-melting agaróza nalita, aby byla manipulace s ní jednodušší. Celá elektroforetická aparatura musí být po celou dobu chlazená. Locus *Apg42* nicméně i na tomto typu agarózy vykazoval stejné výsledky jako v případě SeaKem[®] LE Agarose a dále byl nejen tento lokus, ale i všechny ostatní analyzovány na nativních polyakrylamidových gelech.

U lokusu *ApEST24* byl předpoklad, že fragmenty budou malé (Sloane et al., 2001) a proto byl vyzkoušen 12% nativní polyakrylamidový gel. Čitelnost dat se nezvýšila, jednotlivé fragmenty od sebe nebyly dostatečně odděleny, a proto nebylo možné výsledky jednoznačně odečíst. Toto byl důvod k vyřazení lokusu *APEST24* a práce s ním nepokračovala.

Fragmenty lokusu *ApEST15* při dělení na 5% polyakrylamidovém gelu po standardní ani prodloužené době zapojení elektroforézy vůbec nevycestovaly z jamek. Při použití 3,5% polyakrylamidového gelu byl výsledek stejný jako v případě gelu 5% a proto byl také tento lokus vyřazen.

Lokusy *Apg01* a *ApEST26*, stejně jako lokus *SmS23*, vykazovaly velmi nejednotné výsledky a kvůli nejednoznačnosti jejich interpretace byly vyřazeny.

Lokusy přejaté z publikace Zhang et al. (2012) byly převzaty i s doporučenými annealingovými teplotami a základní profily fungovaly bez větších problémů okamžitě. Z 6 předvybraných lokusů byly úspěšně naamplifikovány v první řadě tři - *Dn1*, *Dn13* a *Dn16*. Při analyzování získaných dat bylo zjištěno, že lokus *Dn1* vykazuje v mnoha populacích známky nulové alely a proto byl nahrazen lokusem *Dn22*. Zhang et al. (2012) ve své studii u lokusu *Dn1* taktéž našli nulové alely, nezjistili ale, že by nulové alely tohoto lokusu způsobovaly odchylky od Hardy - Weinbergovy rovnováhy.

Se zbylými dvěma lokusy (*Dn25* a *Dn27*) nebylo pro nedostatek času dále pracováno.

5.4 Enhance IT[®] Polymer Solution (Elchrom Scientific)

Enhancerem Enhance IT[®] Polymer Solution byla v polyakrylamidovém gelu nahrazována část vody. Díky použití této specifické komponenty se zlepšila nejen manipulace s gelem, který díky ní byl pružnější a méně se trhal, ale došlo k i výraznému zlepšení čitelnosti pruhových patternů na gelu. Po přidání enhanceru byly totiž jednotlivé pruhy ostřejší a lépe od sebe navzájem odděleny.

5.5 Statistická analýza

5.5.1 Variabilita lokusů

Pro každý lokus byl vypočten počet alel, pozorovaná heterozygotnost (H_O) a F_{ST} . Nejvíce a to sice 5 alel bylo nalezeno u lokusu *Dn16*, pozorovaná heterozygotnost tohoto lokusu je 0,753. Zhang et al. (2012) u téhož lokusu našli alel dokonce 26. Vyšší počet zjištěných alel v původní publikaci je dán jinou použitou metodou pro detekci jednotlivých alel v lokusech (Zhang et al., 2012). Podobně pak u lokusů *Dn13* a *Dn22* Zhang et al. (2012) našli větší množství alel (33, resp. 29) než bylo nalezeno během analyzování dat této práce (4, resp. 2). Velké rozdíly v počtech alel jsou stejně jako v předchozím případě dány jinou metodou. V případě lokusů *ApEST39* a *Sgg2* se počet nalezených alel shodoval s původním autorem, u obou lokusů byly detekovány 2 alely (Weng et al., 2007). Dvě alely byly nalezeny v případě lokusu *ApEST34*. Weng et al. (2007) zjistili ve své práci 4 alely. U lokusu *Sa4Σ* byly nalezeny 4 alely a zjištěná heterozygotnost byla rovna 1. Na rozdíl od Dolattiho et al. (2005), kteří našli také 4 alely, ale pozorovaná heterozygotnost byla 0,066, byly ve studii Shufrana a Paytona (2009) u téhož lokusu objeveny pouze 2 alely. Posledním analyzovaným lokusem byl *SmS16b*, v tomto případě byla zjištěna pouze jedna alela, celá populace byla monomorfní. Stejný výsledek dostali i Shufrana a Payton (2009), ale v případě práce Dolattiho et al. (2005) vykazoval tento lokus polymorfismus – detekovali u něj 2 alely. Mikrosatelity jsou velmi variabilní, ale díky rychlému šíření *D. noxia* a jejímu parthenogenetickému rozmnožování lze předpokládat, že čím déle se *D. noxia* v dané lokalitě vyskytuje, tím větší má potenciál k vyššímu počtu alel na lokus.

5.5.2 Genetická variabilita populací

Pro 433 vzorků bylo detekováno celkem 243 genotypů a z toho 74,5 % jich bylo unikátních. Dolatti et al. (2005) ve svém souboru našli 50 genotypů u 376 jedinců, z toho se 66 % genotypů objevilo jen jednou. Stejně tak Zhang et al. (2012) identifikovali velké množství genotypů. Takto vysoká čísla unikátních MLGs a velká globální genotypová diversita odpovídá možnosti pohlavního rozmnožování *D. noxia* (Dolatti et al., 2005).

Sledovaná heterozygotnost je ve všech populacích vyšší než očekávaná. S tím souhlasí i fakt, že v pouze v jedné z analyzovaných populací je nedostatek heterozygotů naopak ve většině populací se vyskytuje jejich nadbytek. Stejně jako v publikaci Zhang et al. (2012) byla i této práci odhalena vazebná nerovnováha. Jedním z ukazatelů vazebné nerovnováhy byl zjištěný přebytek nebo nedostatek heterozygotů (Zhang et al., 2012). Vzhledem k tomu, že *D. noxia* se v temperátních oblastech množí po většinu roku parthenogeneticky, je vazebná nerovnováha s největší pravděpodobností způsobena tímto způsobem rozmnožování.

U 3 lokusů byly nalezeny nulové alely – *Dn16*, *ApEST34* a *ApEST39*. Celkem byly detekovány v 7 populacích. Žádná populace neměla nulovou alelu nalezenou ve víc než jednom lokusu. Nicméně Carlsson (2008) prokázal, že u mikrosatelitů i v případě vysokého výskytu nulových alel je jejich vliv na statistické analýzy velmi mírný a z tohoto důvodu nebyly lokusy z analýz vyřazeny ani korigovány.

5.5.2.1 Mantelův test

Mantelův test pro porovnání genetické a geografické vzdálenosti byl vytvořen pro několik modelů. Z celkového množství 12 modelů nemohly být dva spočteny kvůli malému zastoupení vzorků v dané lokalitě. Konkrétně se jednalo o modely Amerika – státy a Asie – státy, kde v obou případech byly pouze dvě lokality na kontinent. Ze zbylých deseti modelů vyšly signifikantní pouze 3 – Asie – regiony, Evropa – regiony a invaze africká - regiony. Z těchto výsledků vyplývá, že závislost genetické vzdálenosti na geografické je u všech vzorků z Evropy, Asie a v modelu „invaze africká – regiony“ se jedná o vzorky z Turecka, Egypta, Tuniska, Alžírsko, Španělska a Francie. Ve všech ostatních případech nebyla prokázána závislost genetické vzdálenosti na geografické. V případě, že test IBD (Isolation By Distance) vychází nesignifikantní, lze usuzovat, že se jedná o recentní invazi a šíření invazního organismu je podporováno nejen přirozenými přírodními faktory a podmínkami, ale i lidským faktorem – např.

mezinárodním obchodem. Testy IBD jsou mimojiné založeny na předpokladu stejného poměru pohlavního a nepohlavního rozmnožování ve všech zkoumaných lokalitách a to v případě tohoto souboru dat není jisté. (Havelka et al., v přípravě).

5.5.2.2 PCoA

Metodou PCoA byl vytvořen graf, ve kterém se jednotlivé populace, které jsou si příbuznější, shlukují do klastrů. Z grafu je patrné, že populace z České republiky, Moldávie a Maďarska jsou nad diagonálou a jejich zařazení do společné skupiny není neopodstatněné, velká vzdálenost Maďarska od České republiky a Moldávie je pravděpodobně zapříčiněna velmi malým počtem maďarských vzorků. Podobně je tomu tak u druhé skupiny vzorků z Tuniska, Alžírsko, Egypta, Španělska a Francie. Francie byla zastoupena pouze jedním vzorkem a to s největší pravděpodobností vedlo k tak velkému oddělení v grafu. Je též patrné, že vzorky z USA a Chile jsou příbuznější červeně vyznačené skupině africké invaze. Tak patrné oddělení íránské populace od zbytku je pravděpodobně zapříčiněno relativně homogenní populací, která se i dle výsledku programu STRUCTURE na tomto území vyskytuje.

5.5.2.3 AMOVA

Pomocí metody AMOVA bylo zjištěno, jaká část celkové variance je mezi populacemi, regiony a uvnitř populací. Z výsledných grafů je patrné, že největší část variance je uvnitř populací a mezi skupinami a jednotlivými regiony je variabilita velmi nízká. Tento výsledek byl očekáván, protože prvotní předpoklad byl, že se jedná o recentní invaze. Z tohoto důvodu je variabilita nejvyšší uvnitř populací, protože díky nedávné migraci do nových lokalit ještě nedošlo k diferenciaci na úrovni populací a vyšší.

5.5.2.4 Program „Alleles In Space“

V programu Alleles In Space byl metodou „Interpole Genetic Landscape Shape“ vytvořen trojrozměrný graf, na kterém jsou jako vrcholy nad plochou zobrazena místa s vysokou genetickou variabilitou a pod plochou pak naopak místa s nízkou genetickou variabilitou. Základna grafu je rovna ploše v mapě, která je vymezena analyzovanými vzorky. Z důvodu velké geografické vzdálenosti byly z této analýzy vyřazeny vzorky z Chile a USA. Při pohledu na graf můžeme zjistit, že místa s vysokou genetickou

variabilitou jsou v oblasti odpovídající České republice, Španělska a části Moldávie. Nízká genetická variabilita se pak ukazuje v oblasti Egypta, Íránu a části Moldávie.

Pomocí modelu „Monmonier's Maximum Difference Algorithm“ byly do prostoru vsazeny bariéry, jejichž počet byl na základě geografických bariér stanoven na 2. Obrázek grafické sítě s bariérami byl vložen na mapu. Je zde vidět, že žlutě zvýrazněná bariéra kopíruje vodní plochy Černého a Středozemního moře a navazuje na červeně zvýrazněnou bariéru, která se nachází v oblasti vysokých evropských horstev (Alpy a část Pyrenejí). Toto grafické zobrazení podporuje původní předpoklad o invazi evropské a africké. Evropská invaze směřuje z místa původního výskytu (Íránu) přes Turecko, kde se obě invaze potkávají, dále do Moldávie a přes jihovýchodní Evropu (Maďarsko) do Evropy střední (Česká republika). Africká invaze pak vychází také z Íránu přes Turecko, ale dále se odklání do Afriky a přes Egypt a další severoafrické státy (Tunisko, Alžírsko) se dostává do evropského Španělska a Francie. Tato teorie není zcela ve shodě s teorií Liu et al. (2010), kteří předpokládají, že do Francie a Španělska se *D. noxia* dostává přes území Evropy a nikoli severní Afriky. V této publikaci však nejsou zastoupeny vzorky ze severoafrických států. Je předpoklad, že k překonávání větších vodních ploch a dalších přirozených bariér dochází díky obchodu s obilím.

5.5.2.5 STRUCTURE

V programu STRUCTURE byly puštěny 4 modely a pomocí internetové aplikace Structure Harvester následně vybrány nejvhodnější ΔK pro jednotlivé modely. Ve třech případech (model A – admixture, correlated; B – admixture, independent a C – no admixture, correlated) bylo jako nejvhodnější ΔK vyhodnoceno $K = 3$, v případě modelu D (no admixture, independent) to bylo $K = 4$. Z grafických výstupů programu STRUCTURE (tzv. „bargrafů“) je patrné, že modely se liší pouze v malých detailech. V případě modelů, kde $K = 3$ je zcela patrné, že se jedná o opravdu minimální rozdíly, v případě modelu D ($K = 4$) se v předchozích modelech červená skupina rozdělila do 2 (červené a žluté) skupiny. Z těchto výsledků, kdy se jednotlivé barvy v „bargrafech“ téměř 100% shodují, byl vyhodnocen závěr, že se jedná o natolik robustní data, že ani různá nastavení jednotlivých modelů výsledky nezměnila.

Při bližším prozkoumání „bargrafů“ je patrné, že navržené invazní směry jsou podpořeny i výsledky programu STRUCTURE. Íránské populace jsou velmi konzervativní a jsou zastoupeny hlavně zelenou barvou. Zbylé populace, které jsou

označeny zeleně, jsou z valné většiny příslušné k africké migrační trase. Turecké populace jsou do velké míry příslušníky červené skupiny. Červené populace se vyskytují ve stejné míře v evropské i africké migrační trase. V případě modelu D, kde se vyskytuje ještě žlutá barva, je červená spolu se žlutou téměř plnou alternativou červené skupiny ostatních modelů. Modře je označena většina populací Španělska, USA a Chile. Zbylé modře označené populace jsou většinou součástí africké invazní skupiny.

Program STRUCTURE spolu s programem Alleles In Space a grafem vytvořeným metodou PCoA podporují teorii navrženou RNDr. Starým, která v rozporu s teorií Liu et al. (2010) říká, že k invazi *D. noxia* do Ameriky došlo po invazní trase z Íránu přes Turecko, státy severní Afriky, Španělsko a Francii.

5.5.2.6 Dendrogram

Dendrogram byl vytvořen metodou Neighbor – Joining (NJ) a vychází z Nei - distance (1972), 1000x bootstrap na lokus.

Dendrogram až na pár populací podporuje výše popsanou teorii. K rozdílnému přiřazení některých populací došlo s největší pravděpodobností kvůli malému počtu vzorků z některých lokalit.

6. ZÁVĚR

Podařilo se úspěšně zoptimalizovat, naamplifikovat a zanalyzovat 8 z 21 původně vytipovaných mikrosatelitních lokusů pro 433 vzorků *Diuraphis noxia* z celkem 12 zemí.

Populační analýza potvrdila pohlavní rozmnožování *D. noxia* v temperátních oblastech (Dolatti et al., 2005). Na základě nadbytku heterozygotů ve většině analyzovaných populací byla zjištěna vazebná nerovnováha. Největší genetická variabilita se vyskytovala v populacích na území České republiky, nejmenší pak v iránských populacích a v části populací z Moldávie.

Byla potvrzena teorie RNDr. Starého, která na rozdíl od hypotézy Lia et al. (2010) mluví o invazi *D. noxia* na americký kontinent přes státy severní Afriky, Španělska a Francie a nikoli přes střední Evropu (Starý, nepublikováno; Havelka et al., v přípravě).

7. LITERATURA

Alfaro, A., 1947. Notes on *Brachycolus noxius* (Mordvilko): A new pest of wheat and barley. *Bulletin of Plant Pathology and Agricultural Entomology* 15: 125-130.

Arnaud-Haond, S., Belkir, K., 2007. GENCLONE: a computer program to analyse genotypic data, test for clonality and describe spatial clonal organisation. *Molecular Ecology Notes* 7: 15-17.

Baumann, P., Moran, N. A., Baumann, L., 2000. Bacteriocyte-associated endosymbionts of insects. *The prokaryotes* 1: 403-438.

Belay, T., Smith, C. M., Stauffer. Ch., 2003. Biotypic status of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia*, in Ethiopia, *Mitteilungen der Deutschen Gesellschaft für Allgemeine und Angewandte Entomologie* 15: 1-4.

Black, W. C. IV, Du Teau, N. M., Puterka, G. J., Nechols, J. R., Pettorini, J. M., 1992. Use of the random amplified polymorphic DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* 82: 151-159.

Blackman, R. L., 1985. Aphid cytology and genetics. In: Szelegiewicz, H (ed.) *Evolution and Biosystematics of Aphids*, Proceedings of the International Aphid Symposium, Jabolona, Poland, pp. 171-237.

Buchner, P., 1965. Endosymbiosis of animal with plant microorganisms. New York: John Wiley. 909 pp.

Burd, J. D., Elliot, N. C., 1996. Changes in chlorophyll a fluorescence induction kinetics in cereals infested with Russian wheat aphid. *Journal of Economic Entomology* 89: 1332-1337.

Bush, L., Slosser, J. E., Worrall, W. D., 1989. Variation in damage to wheat caused by Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) in Texas. *Journal of Economic Entomology* 82: 466-471.

Butts, P., Pakendorf, K., 1984. Wheat breeding for resistance to *Diuraphis noxia*, methodology and progress. In: Walters M. C. (ed.): *Progress in Russian Wheat Aphid (Diuraphis noxia, Mordv.). Research in the Republic of South Africa*. Repub. S. Africa, Dept. Agric. Tech. Communication 191: 47-52.

Carlsson, J., 2008. Effects of microsatellite null alleles on assignment testing. *Journal of Heredity* 99(6): 616-623.

Clua, A., Castro, A. M. Ramos, S., Gimenez, D. O., Vasicek, A., Chidichimo, H. O., Dixon, A. F. G., 2004. The biological characteristic and distribution of the greenbug, *Schizaphis graminum*, and Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Hemiptera: Aphididae), in Argentina and Chile. *European Journal of Entomology* 101: 193-198.

Cooper, W. R., Dillwith, J. W., Puterka, G. J., 2010. Salivary proteins of Russian wheat aphid (Hemiptera: Aphididae). *Environmental Entomology* 39 (1): 223-231.

De Meester, L., Gómez, A., Simon, J. C., 2004. Evolutionary and ecological genetics of cyclical parthenogens. In: *Evolution from Molecules to Ecosystems* (ed. Moya, A., Font, E.) pp. 122-134. Oxford University Press, Oxford, UK.

Dixon, A., 1985. *Aphid Ecology*. Blackie and Son, Ltd. Glasgow. 136 pp. (ISBN: 0-41200381-3).

Dolatti, L., 1995. Study of the biology and distribution of the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) in Tehran province. MS thesis. Tehran University, Karaj, Iran.

Dolatti, L., Ghareyazie, B., Moharramipour, S., Noori-Daloi, M. R., 2005. Evidence for regional diversity and host adaptation in Iranian populations of the Russian wheat aphid. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 114: 171-180

Du Toit, F., Walters, M. C., 1984. Damage assessment and economic threshold values for the chemical control of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko) on winter wheat. Progress in Russian Wheat Aphid (*Diuraphis noxia* Mordvilko) Research in the Republic of South Africa (ed. by Walters, M. C.), Technical Communication, No.191, Department of Agriculture, Division of Agricultural Information, Pretoria, South Africa, pp. 58-62.

Earl, D. A., von Holdt, B. M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4(2): 359-361.

Excoffier, L., Smouse, P., Quattro, J., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

Falush, D., Stephens, M., Pritchard, J. K., 2003. Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587.

Felsenstein, J., 2009. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.69. Distributed by the author. Department of Genome Sciences of Biology, University of Washington, Seattle.

Franzen, L. D., Gutsche, A. R., Heng-Moss, T. M., Higley, L. G., Macedo, T. B., 2008. Physiological response of wheat and barley to Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko) and bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hemiptera: Aphididae). *Arthropod-plant Interaction* 2: 227-235.

Goudet, J., 1995. FSTAT (version 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* 86: 485-486.

Grossheim, N. A., 1914. The barley aphid, *Brachycolus noxius* Mordvilko. *Memoirs of the National History Museum of the Zemstvo of the Government of Taurida, Sinferopol* 3: 35-78. (*The Review of Applied Entomology Series A* (1915) 3: 307-308).

- Haack, L., Simon, J. C., Gauthier, J. P., Plantegenest, M., Dedryver, C. A., 2000.** Evidence for predominant clones in a cyclically parthenogenetic organism provided by combined demographic and genetic analysis. *Molecular Ecology* 9: 2055-2066.
- Hairston, N. G., Vanbrunt, R. A., Kearns, C. M., Engstrom, D. R., 1995.** Age and survivorship of diapausing eggs in a sediment egg bank. *Ecology* 76: 1706-1711.
- Halbert, S. E., Stoetzel, M. B., 1998.** Historical overview of the Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae), pp. 12-30. In S. S. Quisenberry and F. B. Pearis (eds.). Response Model for an Introduced Pest: The Russian wheat aphid, *Entomological Society of America, Lanham, MD*.
- Hales, D. F., Wilson, A. C. C., Sloane, M. A., Simon, J. C., Le Gallic, J. F., Sunnucks, P., 2002.** Lack of detectable genetic recombination on the X chromosome during the parthenogenetic production of female and male aphids. *Genetical Research* 79: 203-209.
- Halkett, F., Simon, J.-C., Balloux, F., 2005.** Tackling the population genetics of clonal and partially clonal organisms. *Trends in Ecology and Evolution* 20(4): 194-201.
- Harwood, A. J., 2000.** The Nucleic Acid Protocol Handbook: Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis. Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Havelka, J., Chundelová, D., Sattranová, A., Žurovcová, M., Laamari, M., Ben Halima Kamel, M., El-Heneidy, A., Vitou, J., Pons, X., Starý, P., (v přípravě).** Ancient refugium of Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Homoptera: Sternorrhyncha, Aphididae) in North Africa and Southwestern Europe.
- Heng-Moss, T. M., Ni, X., Macedo, T., Markwell, J. P., Baxendale, F. P., Quisenberry, S. S., Tolmay V., 2003.** Comparison of chlorophyll and carotenoid concentrations among Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) – infested wheat isolines. *Journal of Economic Entomology* 96: 75-81.

Hewitt, P. H., van Niekerk, G. J. J., Walters, M. C., Kriel, C. F., Fouche, A., 1984. Aspects of the ecology of Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia*, in the Bloemfontein district. I. The colonization of sown wheat identification of summer hosts and cause of infestation symptoms, pp. 3-13. *In: Walter, M. C. (ed.), Progress in Russian wheat aphid (Diuraphis noxia Mordvilko) research in the Republic of South Africa Department of Agriculture Technical Communication, Pretoria, Republic of South Africa.*

Hughes, R. D., Maywald, G. F., 1990. Forecasting the favourableness of the Australian environment for the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia*, (Homoptera: Aphididae), and its potential impact on Australian wheat yields. *Bulletin of Entomological Research* 80: 165-175.

Hutchinson, W. F., Van Oosterhout, C., Rogers, S. I., Carvalho, G. R., 2003. Temporal analysis of archived samples indicates marked genetic changes in declining North Sea cod (*Gadus marhua*). *Proceedings of the Royal Society London B* 270: 2125-2132.

Chundelová, D., 2012. Molekulární analýza mitochondriálního genomu *Diuraphis noxia* (Aphididae). Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Jihočeská universita. 84 pp.

Jarošová, A., 2012. Analýza sekundárních endosymbiontů u vybraných druhů mšic (Aphididae a Adelgidae). Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Jihočeská universita. 59 pp.

Kindler, S. D., Spomer, S. D., 1986. Biotypic status of six greenbug (Homoptera: Aphididae) isolates. *Environmental Entomology* 80: 394-397.

Kindler, S. D., Springer, T. L., 1989. Alternate hosts of Russian Wheat Aphid (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 82: 1358-1362.

Kiriac, I., Gruber, F., Poprawski, T., Halbert, S., Elberson, L., 1990. Occurrence of sexual morphs of Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae), in

several locations in the Soviet Union and the northwestern United States. *Proceedings of the Entomological Society of Washington* 92: 544-547.

Korandová, M., 2011. Genetická variabilita přírodních populací *Diuraphis noxia* (Aphididae). Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Jihočeská universita. 61 pp.

Kovalev, O. V., Poprawski, T. J., Stekolshchinov, A. V., et al., 1991. *Diuraphis Aizenberg* (Hom., Aphididae): key to apterous viviparous females and a review of Russian language literature on the natural history of *Diuraphis noxia* (Kudjumov, 1913). *Journal of Applied Entomology* 112: 425-436.

Kriel, C. F., Hewitt, P. H., De Jager, J., Walters, M. C., Fouche, A., Van der Westhuizen, M. C., 1984. Aspects of the ecology of the Russian Wheat Aphid, *Diuraphis noxia*, in the Bloemfontein district. II. Population dynamics. In: Walters M. C. (ed.): *Progress in Russian Wheat Aphid (Diuraphis noxia, Mordv.)*. Research in the Republic of South Africa. Technical communication of the departement of agriculture (Republic of South Africa) 191: 14-21.

Lai, C. Y., Baumann, L., Baumann, P., 1994. Amplification of *trpEG*; adaptation of *Buchnera aphidicola* to an endosymbiotic association with aphids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91: 3819-3823.

Landry, P. A., Koskinen, M. T., Primmer, C. R., 2002. Deriving evolutionary relationship among populations using microsatellites and $(\delta\mu)^2$: all loci are equal, but some are more equal than others. *Genetics* 161: 1339-1347.

Leather, S. R., 1992. Aspects of aphid overwintering (Homoptera: Aphidinea: Aphididae). *Entomologia Generalis* 17: 101-113.

Lepš, J., 1996. Biostatistika. Jihočeská universita, Biologická fakulta, České Budějovice, 166 pp.

- Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E., 2002.** Microsatellites: genomic distribution, stative functions and mutation mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11: 2453-2465.
- Liu, X., Marshall, J. L., Stary, P., Edwards, O., Puterka, G., Dolatti, L., Bouhssini, M. E., Malinga, J., Lage, J., Smith, C. M., 2010.** Global phylogenetics of *Diuraphis noxia* (Hemiptera: Aphididae), an invasive aphid species: evidence for multiple invasion into North America. *Journal of Economic Entomology* 103(3): 958-965.
- Mantel, N., 1967.** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Martinez-Torres, D., Buades, C., Latorre, A., Moya, A., 2001.** Molecular systematics of aphids and their primary endosymbionts. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 3: 437-449.
- Michaud, J. P., Sloderbeck, P. E., 2005.** Russian wheat aphid: An introduction pest of small grains in the High Plains. Kansas State University, MF-2666.
- Miller, M. P., 2005.** Alleles In Space (AIS): Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity* 96: 722-724.
- Moran, N. A., 1992.** The evolution of aphid lifecycles. *Annual Review of Entomology* 37: 321-348.
- Morgante, M., Plivieri, A. M., 1993.** PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal* 3: 175-182.
- Munson, M. A., Baumann, P., Kinsey, M. G., 1991.** Buchnera gen. nov. and Buchnera aphidicola sp. nov., a Taxon Consisting of the Mycetocyte-Associated, Primary Endosymbionts of Aphids. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41, 566-568.

- Nei, M., 1972.** Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- Papura, D., Simon, J. C., Halkett, F., Delmote, F., Le Gallic, J. F., Dedryver, C. A., 2003.** Predominance of sexual reproduction in Romanian populations of the aphid *Sitobion avenae* inferred from phenotypic and genetic structure. *Heredity* 90: 397-404.
- Pašíkovský, J., 2011.** Fylogeografie a genetická variabilita *Diuraphis noxia* (Aphididae). Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Jihočeská universita. 48 pp.
- Patten, M. A., Smith-Patten, B. D., 2008.** Biogeographical boundaries and Monmonier's algorithm: a case study in the northern Neotropics. *Journal of Biogeography* 35, 407–416.
- Payton, T. L., 2004.** Genetic variation within and between Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Kurdjumov), biotypes found in the United States. MS Thesis, Horticulture Oklahoma State University Stillwater, Oklahoma, 51 pp.
- Peakall, R., Smouse, P. E., 2006.** GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Biology Notes* 6: 288-295.
- Pearis, F. V., Brooks L., Hein, G., Johnson G., Massey B., McBride, D., Morrison, W. P., Schultz, J. T., Spackman, E., 1989.** Economic impact of the Russian wheat aphid in the western United States: 1987-88. *Great Plain Agricultural Council Publication* 129: 23 pp.
- Poprawski, T. J., Underwood, N. L., Mercadier, G., Gruber, F., 1992.** *Diuraphis noxia* (Mordvilko) – a bibliography on the Russian wheat aphid. 1985-1992. Agricultural Research Service – United States Department of Agriculture.
- Powell, W., Morgante, M., Andre, C., Henfey, M., Vogel, J., Tingy, S., et al., 1996.** The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-238.

Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.

Puterka, G. J., Black, W. C., Steiner, W. M., Burton, R. L., 1993. Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collection of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. *Heredity* 70: 604-618.

Quisenberry, S. S., Peairs, F. B., 1998. A response model for an introduced pest-the Russian wheat aphid. Thomas Say Publications in Entomology, *Entomological Society America*, Lanham, MD.

Rambaud, A., 2009. FigTree v 1.3.1 Produce High-quality figures of phylogenetic trees. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, U.K.

Riedell, W. E., Kieckhefer, R. W., Haley, S. D., Langham, M. A. C., Evenson, P. D., 1999. Winter wheat responses to bird cherry-oat aphids and barley yellow dwarf virus infection. *Crop Science* 39: 158-163.

Robinson, J., 1993. Conditioning host plant affects antixenosis and antibiosis to Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae). *Journal of Economic Entomology* 86: 602-606.

Rousett, F., 2008. GENPOP '007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Biology Resources* 8: 103-106.

Saheed, S. A., Botha, C. E. J., Liu, L., Jonsson, L., 2007 a. Comparison of structural damage caused by the Russian wheat aphid and Bird cherry-oat aphid in leaves of a susceptible barley cultivar *Hordeum vulgare* L cv Clipper. *Physiologia plantarum* 129: 429-435.

Saheed, S. A., Liu, L., Jonsson, L., Botha, C. E. J., 2007 b. Xylem as well as phloem – sustains severe damage due to feeding by Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*

Mordvilko) in leaf blades of susceptible and resistant wheat (Betta and Betta-Dn1). *South African Journal of Botany* 73: 593-599.

Selkoe, K. A., Toonen, R. J., 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters* 9: 615-629.

Shannon, C. E., Weaver, W., 1949. The Mathematical Theory of Communication. University of the Illinois Press, Urbana, III.

Shapiro, A. M., 1976. Seasonal polyphenism, *Evolutionary Biology* 9: 259-333.

Shufran, K. A., Kirkman, L. R., Puterka, G. J., 2007. Absence of Mitochondrial DNA Sequence variation in RWA (*Hemiptera: Aphididae*) populations consistent with a single introduction into the United States, *Journal of the Kansas entomological society* 80 (4): 319-320.

Shufran, K. A., Payton, T. L., 2009. Limited genetic variation within and between RWA (*Hemiptera: Aphididae*) biotypes in the US. *Journal of Economic Entomology* 102: 440-445.

Schlötterer, C., 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109: 365-371.

Simon, J. C., Baumann, S., Sunnucks, P., et al., 1999. Reproductive mode and population genetic structure of the cereal aphid *Sitobion avenae* studied using phenotypic and microsatellite markers. *Molecular Ecology* 8: 531-545.

Sloane, M. A., Sunnucks, P., Wilson, A. C. C., Hales, D. F., 2001. Microsatellite isolation, linkage group identification and determination of recombination frequency in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (*Hemiptera: Aphididae*). *Genetical Research* 77, 251-260.

Smith, C. M., Belay, T., Stuffer, C., et al., 2004. Identification of Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) populations virulent to the *Dn4* resistance gene. *Journal of Economic Entomology* 97: 1112-1117.

Smith, C. M., Schotzko, D., Zemetra R. S., Souza, E. J., Schroeder-Teeter, S., 1991. Identification of Russian wheat aphid (Homoptera: Aphididae) resistance in wheat. *Journal of Economic Entomology* 84: 328-332.

Starý, P., 1996. The expansit Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordv.) detected in the Czech Republic. *Anzeiger für Schädlingskunde Pflanzenschutz Umweltschutz* 69: 19-20.

Starý, P., 1999. Distribution and ecology of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Kurdj.), expanded to Central Europe (Homoptera: Aphididae). *Journal of Pest Science* 72: 25-30.

Sunnuck, P., 2000. Efficient genetic markers for population biology. *TREE, Elsevier Science Ltd.* 15: 199-203.

Taberlet, P., Walts, L. P., Lulkart, G., 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Tree* 14: 323-327.

Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research* 17: 6463-6470.

Telang, A., Sandstrom, J., Dyreson, E., Moran, N. A., 1999. Feeding damage by *Diuraphis noxia* result in a nutritionally enhanced phloem diet. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 91: 403-412.

Toth, G., Gaspari, Z., Jurka, J., 2000. Microsatellite in different eucaryotic genomes: surfy and analysis. *Genome Research* 10: 967-981.

Unterman, B. M., Baumann, P., McLean, D. L., 1989. Pea Aphid Symbiont Relationships Established by Analysis of 16S rRNAs. *Journal of Bacteriology* 171, 2970-2974.

van Emden, H. F., Harrington, R., 2007. Aphids as crop pests. *CAB International, Oxford*, 699 pp.

van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., Shipley, P., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.

Webster, J. A., Starks, K. J., Burton, R. L., 1987. Plant resistance studies with *Diuraphis noxia* (Homoptera: Aphididae), a new United States wheat pest. *Journal of Economic Entomology* 80: 944-949.

Weng, Y., Azhaguvel, P., Michels Jr, G. J., Rudd, J. C., 2007. Cross-species transferability of microsatellite markers from six aphid (Hemiptera: Aphididae) species and their use for evaluating biotypic diversity in two cereal aphids. *Insect Molecular Biology* 16(5): 613-622.

Wernegreen, J., 2002. Genom evolution in bacterial endosymbionts of insects. *Nature reviews Genetics* 3: 850-851.

Wilson, A. C. C., Massonnet, B., Simon, J.-C., Prunier-Leterme, N., Dolatti, L., Llewellyn, K. S., Figueroa, C. C., Ramirez, C. C., Blackman, R. L., Estoup, A., Sunnucks, P., 2004. Cross-species amplification of microsatellite loci in aphids: assessment and application. *Molecular Ecology Notes* 4: 104-109.

Wilson, A. C. C., Sunnucks, P., Hales, D. F., 1997. A microsatellite linked to the X-chromosome in males. *Genetical Research, Cambridge* 69: 233-236.

Yeh, F. C., Yang, R., Boyle, T., 1999. PopGene vision 1.31. Microsoft Window-based Freeware for population genetic analysis. Department of Renewable Resources, University of Alberta, Edmonton, Canada.

Zhang, B., Edwards, O. R., Kang, L., Fuller, S. J., 2012. Russian wheat aphids (*Diuraphis noxia*) in China: native range expansion or recent introduction? *Molecular Ecology* 21: 2130-2144.

Zhang, L. Y., Bernard, M., Leroy, P., Feuillet, C., Sourdille, P., 2005. High transferability of bread wheat EST-derived SSRs to other cereals. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 742-751.

Zhang, R. Z., Liang, H. B., Zhang, G. X., 1999. Research on Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* Kordjumov, in China. *Acta Entomologica Sinica* 42S: 11-17.

INTERNETOVÉ ZDROJE

www.natur.cuni.cz/~bayertom/Adk/adk6.pdf

8. PŘÍLOHY

Seznam příloh:

Příloha 1: Tabulka vzorků

Příloha 2: Matice genetických vzdáleností podle Neiho (1972) a geografických vzdáleností mezi jednotlivými lokalitami sběru (km) – volná příloha

Příloha 3: PCoA graf z jednotlivých lokalit

Příloha 4: Mapy států s vyznačenými místy sběru

Příloha 1: Tabulka vzorků

Číslo vzorku	Lokalita	Zkratka	Počet jedinců	Datum sběru	Hostitelská rostlina	Způsob uchování
1	Francie, Montpellier	FrMont1	1	12.2.2008	Hordeum vulgare	Etanol
2	Tunisko, Nfidha	TNEf2	2	22.4.2008	Hordeum vulgare	Etanol
3	Tunisko, Sousse, Kondar	TNSou3	2	9.4.2008	Hordeum vulgare	Etanol
4	Tunisko, Hergla	TNHer4	2	21.4.2008	Triticum aestivum	Etanol
5	Tunisko, Hergla	TNHer5	2	21.4.2008	Lolium perenne	Etanol
6	Egypt, El-Sheikh Zweid, North Sinai	EgEls6	4	19.4.2008	Hordeum vulgare	Etanol
7	Egypt, El-Sheikh Zweid, North Sinai	EgEls7	5	5.4.2008	Hordeum vulgare	Etanol
8	Egypt, Rafah, North Sinai	EgRaf8	1	20.3.2008	Hordeum vulgare	Etanol
9	Írán, Kerma, Kerman Province	IRKer9	9	20.4.2008	Triticum aestivum	Etanol
10	Írán, Birjand, South Khorasan Province	IRBir10	8	20.5.2008	Triticum aestivum	Etanol
11	Írán, Birjand, Bojd Plain, South Khorasan Province	IRBirBP11	9	21.5.2008	Triticum aestivum	Etanol
12	Turecko, Sareyönü-Konya	TRSaKo12	9	26.6.2008	Triticum aestivum	Etanol
13	Turecko, Campus-Konya, Selguklu	TRCaKo13	9	26.6.2008	Triticum aestivum	Etanol
14	Turecko, Karetay-Konya, Bahri Darkas 1, Agronomy Parcel	TRKaKo14	9	27.6.2008	Triticum aestivum	Etanol
15	Turecko, Karetay-Konya, Bahri Darkas 2, Agronomy Parcel	TRKaKo15	9	27.6.2008	Triticum aestivum	Etanol
16	Turecko, Karetay-Konya, Bahri Darkas 3, Agronomy Parcel	TRKaKo16	9	27.6.2008	Triticum aestivum	Etanol
17	Turecko, Gumra-Konya 01	TRCuKo17	9	2.7.2008	Triticum aestivum	Etanol
18	Turecko, Gumra-Konya 02	TRCuKo18	9	2.7.2008	Triticum aestivum	Etanol
19	Turecko, Gumra-Konya 03	TRCuKo19	9	2.7.2008	Triticum aestivum	Etanol
20	Turecko, Meram-Konya	TRMeKo20	9	10.7.2008	Triticum aestivum	Etanol
21	Turecko, Beysehir 01-Konya	TRBeKo21	9	12.7.2008	Triticum aestivum	Etanol
22	Turecko, Beysehir 02-Konya	TRBeKo22	9	12.7.2008	Triticum aestivum	Etanol
23	Alžírsko, Ain Kercha (Oum El Bouaghi Dept.)	DZAinKe23	9	17.4.2008	Hordeum vulgare	Etanol
24	Alžírsko, Ain Djasser (Batna Dept.)	DZAinDja24	9	21.4.2008	Hordeum vulgare	Etanol

25	Alžírsko, Kais (Khenchela Dept.)	DZKais25	9	9.5.2008	Hordeum vulgare	Etanol
26	Alžírsko, Khroub (Constantine Dept.)	DZEIKhr26	9	12.5.2008	Triticum durum	Etanol
27	Alžírsko, Hemla (Batna Dept.)	DZHam27	9	14.5.2008	Triticum durum	Etanol
28	Alžírsko, Ain Djasser (Batna Dept.)	DZAinDjaS28	4	15.5.2008	Triticum durum	Etanol
29	Alžírsko, T'zouket (Batna Dept.)	DZTzou29	8	23.5.2008	Triticum durum	Etanol
30	Alžírsko, Bouhmar (Batna Dept.)	DZBou30	9	23.5.2008	Triticum durum	Etanol
31	USA, County line - Juniper Canyon, Bickleton WA	USAJunCa31	9	24.6.2008	Triticum aestivum	Etanol
32	USA, Turpint Ridge Rd., Bickleton, WA, Yakima Co.	USATur32	9	24.6.2008	Triticum aestivum	Etanol
33	USA, Pear Ac. IAREC, Prosser, WA, Benton Co.	USAPear33	9	24.6.2008	Triticum aestivum	Etanol
34	USA, Headquarter Unit IAREC Field H-21, Prosser, WA, Benton Co.	USAHead34	9	24.6.2008	Hordeum vulgare	Etanol
35	Moldavsko, Ciniseuti	MDCini35	2	10.7.2009	Triticum sp.	Etanol
36	ČR, Hodonice, jižní Morava	CRHod36 (CRZN)	1	1.7.2008	Hordeum vulgare	Etanol
37	ČR, Hrádek, jižní Morava	CRHrad37 (CRZN)	2	1.7.2008	Hordeum vulgare	Etanol
38	ČR, Litobratřice, jižní Morava	CRLito38 (CRZN)	1	1.7.2008	Hordeum vulgare	Etanol
39	ČR, Bystřice pod Hostýnem, severní Morava	CRBys39 (CRZLKM)	1	16.7.2008	Hordeum vulgare	Etanol
40	ČR, Třebíč, jižní Čechy	CRTre40 (CRTR)	1	16.7.2008	Hordeum vulgare	Etanol
41	Chile, Chillan	CLChi41	2	xx. 5. 2008	Triticum aestivum	Etanol
42	Maďarsko, Budapešť	HUBuda42	3	xx. 7. 2008	Triticum aestivum	Etanol
43	Španělsko, Algvare, Leida Distr.	ESAlgua43	9	30.4.2008	Hordeum vulgare	Etanol
44	Španělsko, Salt, Girona	ESSalt44	1	7.5.2008	Hordeum vulgare	Etanol
45	Španělsko, Vencilló	ESVen45	9	6.5.2008	Hordeum vulgare	Etanol
46	Španělsko, Santa Maria del Camí (Barcelona Distr.)	ESSanMa46	9	14.5.2008	Hordeum vulgare	Etanol
47	Španělsko, La Pobla de Cérvoles (Lleida Distr.)	ESlaPob47	9	16.5.2008	Hordeum vulgare	Etanol
48	Španělsko, Cubells (Lleida Distr.)	ESCube48	9	4.6.2008	Hordeum vulgare	Etanol
49	Španělsko, Calaf (Barcelona Distr.)	ESCa49	5	4.6.2008	Hordeum vulgare	Etanol

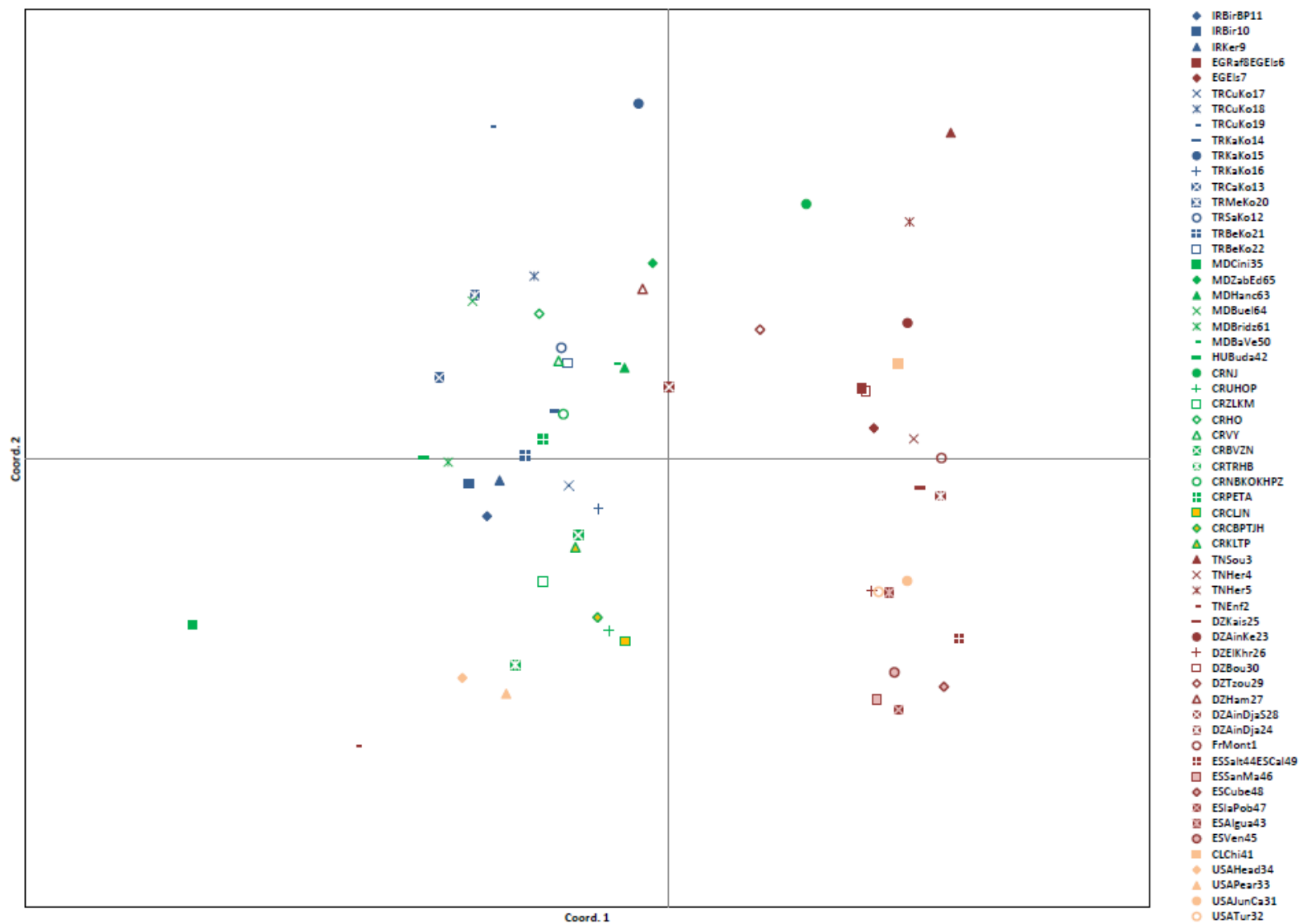
50	Moldavsko, SE, Rezina district, Ciniseuti	MDBaVe50	9	11.7.2009	Triticum aestivum	Etanol
51	ČR, Hevlín, jižní Morava	CRHev51 (CRZN)	8	15.6.2009	Hordeum vulgare	Etanol
52	ČR, Hrádek, jižní Morava	CRHrad52 (CRZN)	8	15.6.2009	Hordeum vulgare	Etanol
53	ČR, Slavkov u Brna, jižní Morava	CRSlav53 (CRVY)	6	18.6.2009	Hordeum vulgare	Etanol
55	ČR, Znojmo, jižní Morava	CRZnoj55 (CRZN)	1	6.7.2009	Hordeum vulgare	Etanol
61	Moldavsko, Edinet, Brinzeni (road to Boedroi)	MDBridz61	6	15.6.2010	Hordeum vulgare	Etanol
63	Moldavsko, Edinet, Brinzeni (road to Hancautsy)	MDHanc63	6	17.6.2010	Hordeum vulgare	Etanol
64	Moldavsko, Edinet, Brinzeni (road to Bunesti)	MDBuel64	7	14.6.2010	Hordeum vulgare	Etanol
65	Moldavsko, Edinet, Zabriceni	MDZabEd65	3	18.6.2010	Hordeum vulgare	Etanol
71A	ČR, Hrádek, jižní Morava	CRHrad71A (CRZN)	6	10.6.2009	Hordeum vulgare	Etanol
71B	ČR, Hrádek, jižní Morava	CRHrad71B (CRZN)	6	10.6.2009	Hordeum vulgare	Etanol
72	ČR, Odry, severní Morava	CROdry72 (CRNJ)	1	15.7.2009	Hordeum vulgare	Etanol
73	ČR, Chropyně, Morava	CRChrop73 (CRZLKM)	4	7.7.2009	Hordeum vulgare	Etanol
74	ČR, Hrobčice, severní Čechy	CRHrob74 (CRTP)	1	7.7.2009	Hordeum vulgare	Etanol
75	ČR, Hrabětice, chov	CRHrab75 (CRZN)	4	15.8.2011	Hordeum vulgare	Etanol
76	ČR, Hrabětice	CRHrab76 (CRZN)	1	xx.xx.201 1		Etanol
77	ČR, Strážnice, chov	CRStraz77 (CRHO)	1	xx.xx.200 9		Etanol
A8	ČR, Znojmo, Dyjákovice	CRZnDyjA8 (CRZN)	1	7.7.1999	Hordeum vulgare	Etanol
A9	ČR, Tábor, Františkov	CRTaFrA9 (CRPETA)	1	23.7.2000	Hordeum vulgare	Etanol
A10	ČR, Znojmo, Hodonice	CRZnHodA10 (CRZN)	1	15.5.1996	Hordeum vulgare	Etanol
A13	ČR, Havlíčkův Brod, Chýska	CRHBChysA1 3 (CRHB)	1	20.7.2000	Hordeum vulgare	Etanol
A14	ČR, Znojmo, Hrabětice	CRZnHrabA14	1	28.6.2000	Hordeum vulgare	Etanol

A16	ČR, České Budějovice, Lhotice	CRCBLhotA1 6 (CRCBPTJH)	1	27.7.2000	Hordeum vulgare	Etanol
A18	ČR, Znojmo, Hodonice	CRZnHodA18 (CRZN)	1	8.6.2000	Hordeum vulgare	Etanol
A24	ČR, Znojmo, Valtrovice	CRZnValtrA24 (CRZN)	1	28.6.2000	Hordeum vulgare	Etanol
A28	ČR, České Budějovice, Záboří	CRCBZabA28 (CRCBPTJH)	1	13.7.1998	Hordeum vulgare	Etanol
A31	ČR, Jindřichův Hradec, Třeboň	CRJHTrebA31 (CRCBPTJH)	1	20.7.1998	Hordeum vulgare	Etanol
A33	ČR, Havlíčkův Brod, Petrkov	CRHBPetrA33 (CRHB)	1	30.6.1999	Hordeum vulgare	Etanol
A40	ČR, Znojmo, Hrádek	CRZnHradA40 (CRZN)	1	1.7.1999	Hordeum vulgare	Etanol
A45	ČR, Uherské Hradiště, Bánov	CRUHBanA45 (CRUH)	1	9.7.1998	Hordeum vulgare	Etanol
A46	ČR, Prachatice, Lhenice	CRPTLhenA4 6 (CRCBPTJH)	1	23.7.1998	Hordeum vulgare	Etanol
A47	ČR, Uherské Hradiště, Bojkovice	CRUHBojA47 (CRUH)	1	9.7.1998	Hordeum vulgare	Etanol
A51	ČR, Kroměříž, Zahnasovice	CRKMZahA51 (CRZLKM)	1	10.7.1998	Hordeum vulgare	Etanol
A53	ČR, Kroměříž, Hlinsko	CRKMHlinA5 3 (CRZLKM)	1	10.7.1998	Hordeum vulgare	Etanol
A57	ČR, Znojmo, Hodonice	CRZnHodA57 (CRZN)	1	15.5.1996	Hordeum vulgare	Etanol
A62	ČR, Znojmo, Hrádek	CRZnHradA62 (CRZN)	1	7.10.1997	Hordeum vulgare	Etanol
B4	ČR, Kroměříž, Bystřice pod Hostýnem	CRBysB4 (CRZLKM)	1	18.7.2007	Hordeum vulgare	Etanol
B5	ČR, Kutná Hora, Čáslav	CRCasB5 (CRNBKOKH)	1	19.6.2007	Hordeum vulgare	Etanol
B7	ČR, Česká Lípa, Česká Lípa	CRCeLiB7 (CRCL)	1	6.7.2007	Hordeum vulgare	Etanol
B8	ČR, České Budějovice, České Budějovice	CRCBB8 (CRCBPTJH)	1	19.6.2007	Hordeum vulgare	Etanol
B9	ČR, Pelhřimov, Čížkov	CRCizB9 (CRPETA)	1	7.7.2007	Hordeum vulgare	Etanol

B10	ČR, Tábor, Františkov	CRFrantB10 (CRPETA)	1	6.7.2007	Hordeum vulgare	Etanol
B11	ČR, Nový Jičín, Fulnek	CRFulB11 (CRNJ)	1	18.7.2007	Hordeum vulgare	Etanol
B12	ČR, Kroměříž, Holešov	CRHoIB12 (CRZLKM)	1	28.6.2007	Hordeum vulgare	Etanol
B13	ČR, Pelhřimov, Horní Cerekev	CRHorCerB13 (CRPETA)	1	7.7.2007	Hordeum vulgare	Etanol
B14	ČR, Praha - západ, Jesenice	CRPrJesB14 (CRPZ)	1	23.6.2007	Hordeum vulgare	Etanol
B17	ČR, Jablonec nad Nisou, Jílové	CRJiloB17 (CRJN)	1	21.6.2007	Hordeum vulgare	Etanol
B18	ČR, Kolín, Kolín	CRKolB18 (CRNBKOKH)	1	7.6.2007	Hordeum vulgare	Etanol
B20	ČR, Pelhřimov, Lukavec	CRLukaB20 (CRPETA)	1	21.6.2007	Hordeum vulgare	Etanol
B21	ČR, Břeclav, Mikulov	CRMikuB21 (CRBV)	1	27.6.2007	Hordeum vulgare	Etanol
B22	ČR, Jindřichův Hradec, Mláka	CRMIakB22 (CRCBPTJH)	1	8.7.2007	Hordeum vulgare	Etanol
B23	ČR, Opava, Opava - Nový Dvůr	CROpNDB23 (CROP)	1	7.6.2007	Hordeum vulgare	Etanol
B24	ČR, Pelhřimov, Pelhřimov	CRPelhB24 (CRPETA)	1	7.7.2007	Hordeum vulgare	Etanol
B26	ČR, Nymburk, Poděbrady	CRPodebB26 (CRNBKOKH)	1	6.7.2007	Hordeum vulgare	Etanol
B29	ČR, Kladno, Slaný	CRSlanB29 (CRKL)	1	6.7.2007	Hordeum vulgare	Etanol
B30	ČR, Hodonín, Strážnice	CRStrazB30 (CRHO)	1	27.6.2007	Hordeum vulgare	Etanol
B30b	ČR, Hodonín, Strážnice	CRStrazB30b (CRHO)	1	27.6.2007	Triticum aestivum	Etanol
B32	ČR, Pelhřimov, Těchobuz	CRTechobB32 (CRPETA)	1	7.7.2007	Hordeum vulgare	Etanol
B33	ČR, Zlín, Tlumačov	CRTlumB33 (CRZLKM)	1	27.6.2007	Hordeum vulgare	Etanol
B40	ČR, Znojmo, Znojmo	CRZnojB40 (CRZN)	1	4.6.2007	Hordeum vulgare	Etanol
12a	ČR, Znojmo, Hrabětice	CRHrab12a (CRZN)	2	xx.xx.201 2		Etanol

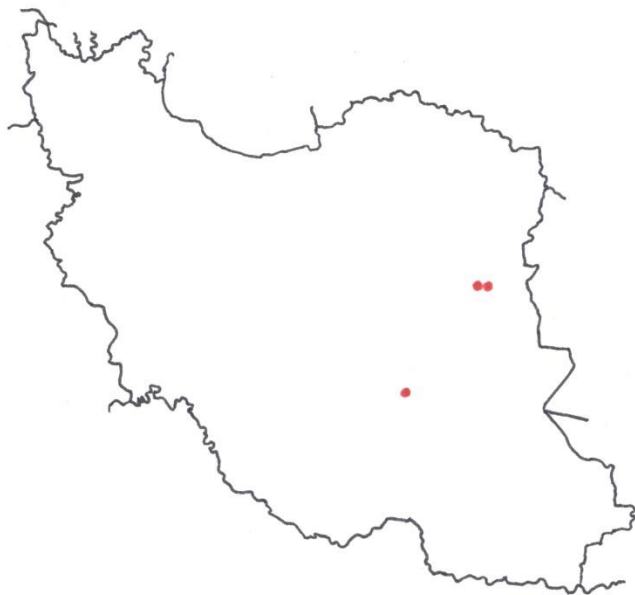
Příloha 2: volná příloha – vložena v kapse na deskách - Matice genetických vzdáleností podle Neiho (1972) a geografických vzdáleností mezi jednotlivými lokalitami sběru (km)

Příloha 3: PCoA graf z lokalit

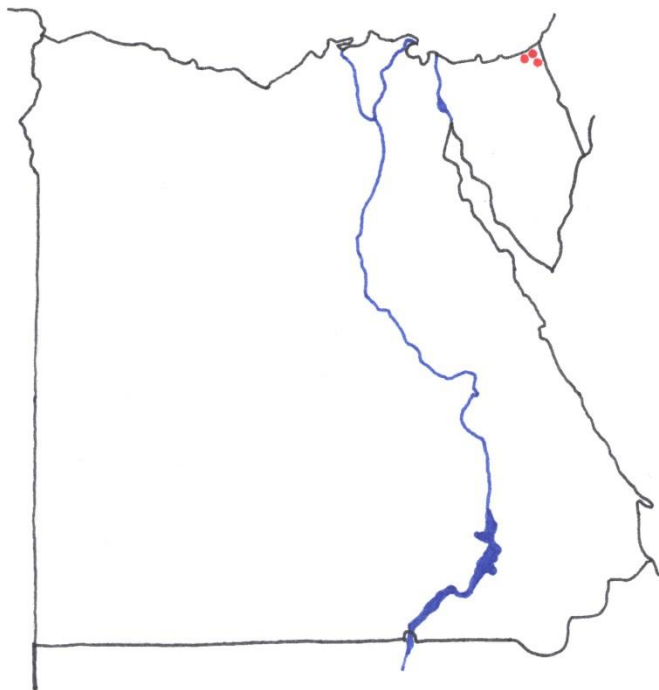


Příloha 4 a – k: Mapy států s vyznačenými místy sběru (červené body)

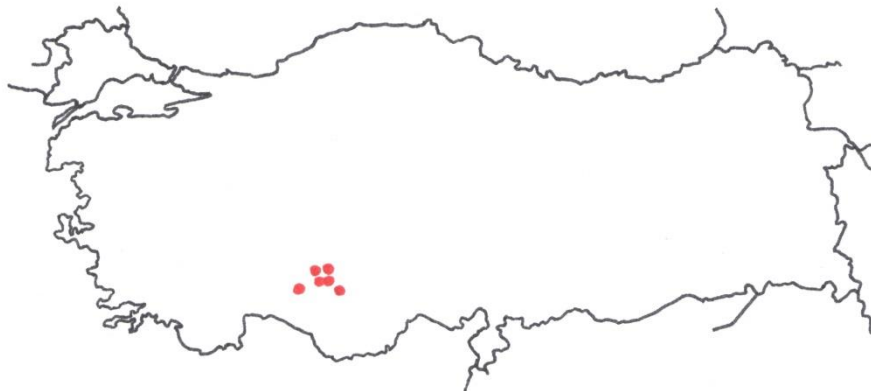
Příloha 4 a: Írán



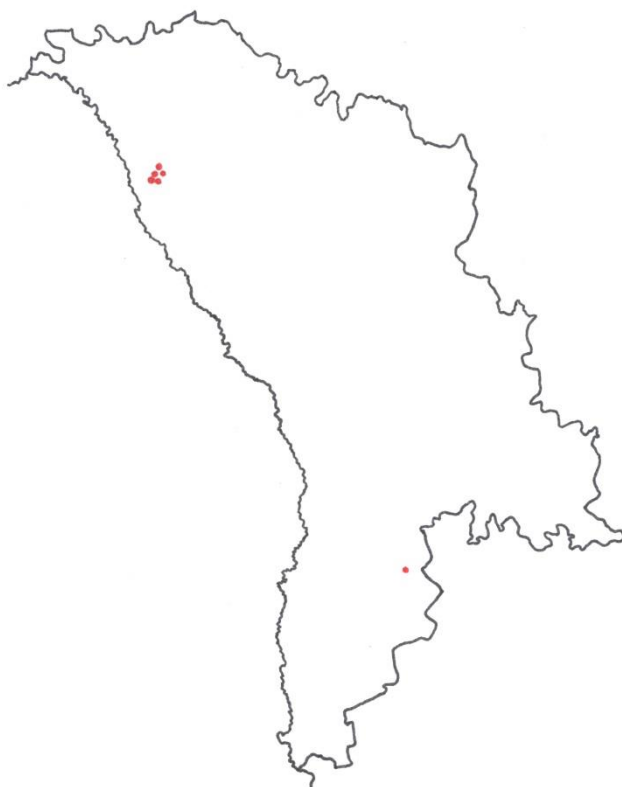
Příloha 4 b: Egypt



Příloha 4 c: Turecko



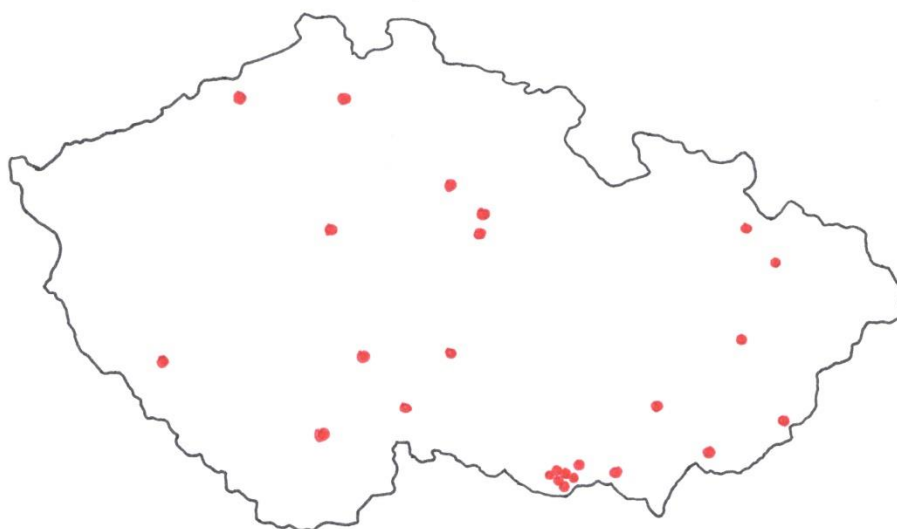
Příloha 4 d: Moldávie



Příloha 4 e: Maďarsko



Příloha 4 f: Česká republika



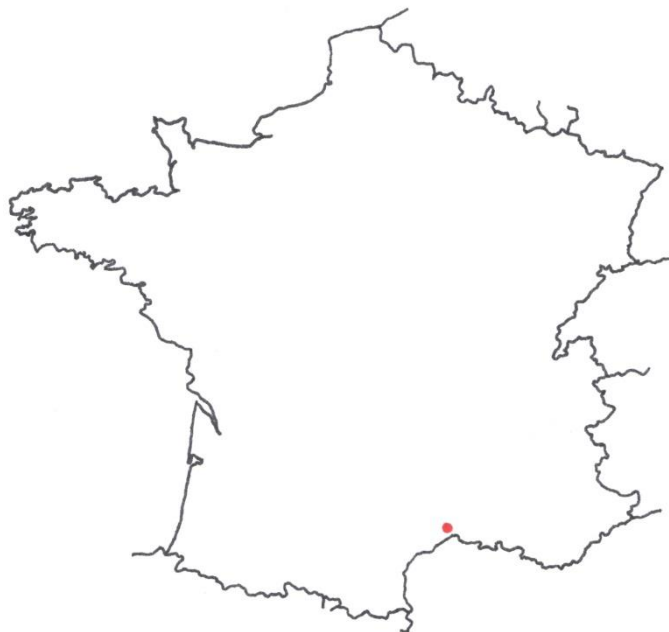
Příloha 4 g: Tunisko



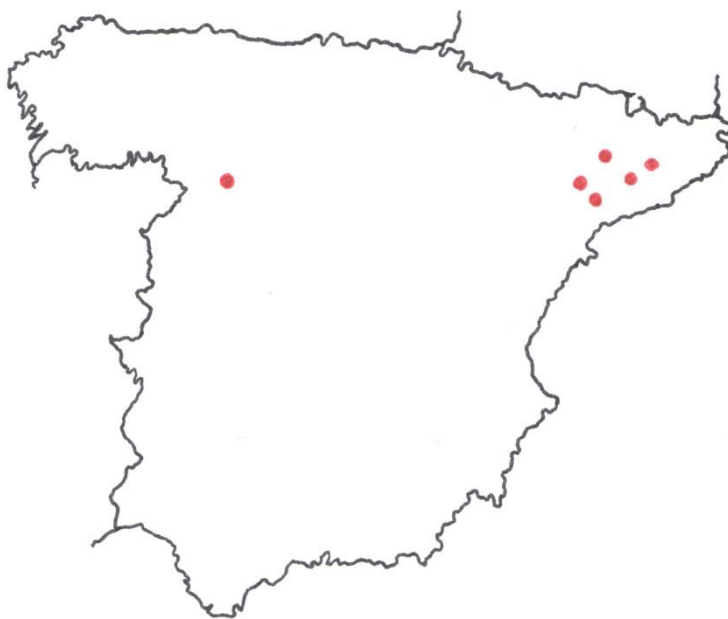
Příloha 4 h: Alžírsko



Příloha 4 ch: Francie



Příloha 4 i: Španělsko



Příloha 4 j: Chile



Příloha 4 k: USA

