

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Použití mikrosatelitních markerů u populací
entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema***

Bakalářská práce

Michaela Rašková

Školitelka: PaedDr. Martina Žurovcová, Ph.D.

Školitel - specialista, konzultant: RNDr. Vladimír Půža, Ph.D.

České Budějovice 2015

Bakalářská práce

Rašková, M. 2015: Použití mikrosatelitních markerů u populací entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema*. [Using microsatellite markers in populations of entomopathogenic nematodes of the genus *Steinernema*, Bachelor Thesis, in Czech] – 39 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

Genetic analysis of 335 samples of entomopathogenic nematodes *Steinernema affine* was conducted with use of 9 microsatellite loci. Statistical analysis was applied to this data set. Second genetic analysis of 26 samples of entomopathogenic nematodes of various species of *Steinernema* was conducted with the use of 8 microsatellite loci. This is the first use of microsatellite markers in entomopathogenic nematodes.

Tato práce je součástí grantového projektu GA ČR číslo P504/12/2352 a GA JU 137/2010/P.

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

V Českých Budějovicích, 21. 4. 2015

.....

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce PaedDr. Martině Žurovcové, Ph.D. za odborné vedení, dohled, trpělivost a cenné rady, které mi dávala v průběhu celé mé práce, RNDr. Vladimíru Půžovi, Ph.D. za poskytnutí analyzovaného materiálu a za veškeré informace o nematodách. Dále bych ráda poděkovala Martině Flegrové a Monice Šťackové za podporu a udržování dobré nálady v nejtěžších laboratorních chvílích. Nemohu zapomenout poděkovat Mgr. Daniele Chundelové za naučení všech laboratorních technik. Zvláště bych chtěla poděkovat Tereze Novákové, Markétě Rezkové, Pavlíně Kočové a Barboře Bendlové za jejich psychickou podporu. Hlavní poděkování patří mé rodině a přátelům, kteří mi byli oporou po celou dobu mého studia.

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Entomopatogenní hlístice.....	1
1.1.1. Životní cyklus	1
1.1.2. <i>Steinernema affine</i> a biologická ochrana	2
1.2. Genetické markery – mikrosatelity	3
1.3. Použití mikrosatelitů u nematod	4
2. Cíle práce	6
3. Materiál a metody	7
3.1. Materiál	7
3.2. Extrakce DNA	10
3.3. Primery	10
3.4. Reakční směs pro PCR	13
3.5. Gelová elektroforéza	13
3.5.1. Agarózový gel	13
3.5.2. Vertikální polyakrylamidová elektroforéza (PAGE)	14
3.6. Analýza získaných dat	15
4. Výsledky	17
4.1. Materiál	17
4.2. Mikrosatelitní lokusy a PCR	17
4.3. Statistická analýza	18
4.3.1. Variabilita lokusů	19
4.3.2. Genetická variabilita v rámci populací	20
4.3.3. Genetická variabilita mezi populacemi	22
5. Diskuze	26
5.1. Izolace DNA a materiál	26
5.2. Mikrosatelitní lokusy, PCR a elektroforetická verifikace	26
5.3. Statistická analýza	27
5.3.1. Variabilita lokusů	27
5.3.2. Genetická variabilita populací	27
6. Závěr	29
7. Literatura	30
8. Přílohy	34

1. Úvod

1.1. Entomopatogenní hlístice

Entomopatogenní hlístice (kmen Nematoda), tzv. hlístovky se dělí do dvou čeledí *Steinernematidae* a *Heterorhabditidae* a jsou důležitou složkou většiny půdních ekosystémů celého světa.

Od ostatních entomopatogenních hlístic se odlišují svou životní strategií, kdy kombinují parazitaci a saprofytismus (Laumond et al., 1979; Poinar, 1979). Hlístovky parazitují na hmyzu, napadají vůbec nejširší spektrum hostitelů, které zahrnuje hmyz mnoha řádů, vzácněji i jiné bezobratlé (Nermuť et al., 2012). Jejich velikost se pohybuje od 0,7 – 1,8 mm, tělo má válcovitý tvar, na koncích je ztenčené (viz Obrázek 1).



Obrázek 1: Samec *S. affine*. Foto V. Půža

1.1.1. Životní cyklus

Životní cyklus hlístovek probíhá v mrtvém těle hostitele s výjimkou larvy třetího instaru - invazivní larvy (Poinar, 1979). Tyto larvy žijí volně v půdě a jejich úkolem je nalézt a proniknout do nového hostitele. Pro tuto činnost jsou vybaveny – před vnějším prostředím je chráněná zesílená kutikula a uzavřená trávicí soustava. V tomto stádiu nepřijímají potravu, ale mají velké energetické zásoby, které jim umožní přežít v půdě i několik měsíců (Nermuť et al., 2012). Do těla hostitele se dostávají přirozenými otvory (ústa, řitní otvor, průduchy) nebo skrze kutikulu (většinou u *Heterorhabditis*) (Dowds et al., 2002). Když larva úspěšně pronikne do hostitele, uvolní symbiotické bakterie, které se namnoží, a hostitel většinou

během 24 – 48 hodin hyne následkem septikemie (Bird & Akhurst, 1983). Jedná se o symbiotické bakterie rodů *Xenorhabdus* (Bisch et al., 2015) a *Photorhabdus*, které zabraňují v rozvoji cizích mikroorganismů, dokonce vytváří i látky, které odpuzují bezobratlé nekrofágy (Foltan & Půža, 2009).

Invazivní larvy se v hostitelském těle svlékají do larev čtvrtého instaru a začínají požírat symbiotické bakterie, poté dospívají do první generace dospělců (tzv. obří generace). Dospělci rodu *Steinernema* jsou odděleného pohlaví, ale dospělci rodu *Heterorhabditis* jsou hermafroditičtí. Samice znovu kladou vajíčka a z nich se líhnou larvy, které se vyvíjejí opět přes čtyři instary v dospělé druhé generace (tzv. normální generace). Poté samice nakladou vajíčka, ta se ale vyvíjí jen do larev třetího instaru, které jako invazivní larvy opouštějí hostitele (Poinar, 1979; Adams & Nguyen, 2002).

Celý životní cyklus hlístovek obsahuje šest stádií: vajíčko, 4 juvenilní stádia a stádium dospělé; při optimálních podmínkách jeden cyklus trvá 3 – 7 dní tzv. od vajíčka po vajíčko, ale vývoj invazivní larvy zabere až 14 dní (Miles et al., 2012). Počet generací vyvíjejících se v hostiteli není přesně daný, záleží na obsahu živin v hostitelském těle, ale vždy končí u třetího larválního instaru – invazivní larva (Nermuť et al., 2012).

1.1.2. *Steinernema affine* a biologická ochrana

Hlístovky se vyskytují ve všech podnebních pásech, nejvíce jich bylo objeveno v mírném pásu. Doposud bylo v České republice zaznamenáno 10 druhů *Steinernema* a dva z rodu *Heterorhabditis* (Nermuť et al., 2012). Podle pozorování, které prováděli Mráček et al. (nepublikováno) v okolí Českých Budějovic, byla *S. affine* nejčastěji se vyskytujícím druhem.

Entomopatogenní a molluscicidní hlístice jsou atraktivním prostředkem pro biologickou ochranu rostlin. Existuje ale možnost interakce mezi nepůvodními (komerčními) a domácími patogenními hlísticemi. Rozšíření *S. affine* a populační genetická struktura ve fragmentované zemědělské krajině jsou neznámé. Znalost rozšíření a genetické struktury populací prospěšných hlístic v zemědělské krajině je velmi důležitá, protože populace, které jsou vzájemně propojeny, nejsou tolik náchylné k přechodným změnám v počtu jedinců jako populace, které žijí v izolaci. Tyto informace jsou klíčové v hodnocení dopadu aplikací komerčních preparátů na domácí hlístice.

1.2. Genetické markery - mikrosatelity

Genetické markery jsou snadno identifikovatelná část genetického materiálu – obvykle DNA, která může být použita v laboratoři a umožňuje nám od sebe odlišit jedince, populace nebo druhy (URL 2). Mohou být použity pro odhad mnoha parametrů, které jsou v zájmu každého ekologa; jako například migrace, velikost populace, „bottleneck“, příbuznost a další (Selkoe & Toonen, 2006).

Pokroky v genetické analýze a biotechnologiích vedly i k prudké expanzi molekulárních markerů. Mikrosatelity se v současnosti jeví jako nejpopulárnější a nejuniverzálnější markery (Selkoe & Toonen, 2006), jsou polymorfní a snadno se amplifikují pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) (Otsen et al., 2000). V porovnání s jinými molekulárními markery mají mikrosatelity řadu výhod: jejich množství a rozptýlení v celém genomu, vysoký obsah informací, kodominantní dědičnost, reprodukční a genomová specifčnost, adaptace k automatizaci (Morgante & Olivieri, 1993). Vzestup komerčních služeb, které umožňují izolaci mikrosatelitů pro studium nových druhů a genotypových vzorků za rozumné ceny, představuje nebývalou možnost používat genetické přístupy bez velké investice do specializovaných zařízení (Selkoe & Toonen, 2006).

Mikrosatelity (simple sequence repeats, SSRs; short tandem repeats – STRs; variable number tandem repeat - VNR), jsou krátké elementy obsahující tandemové repetice 1- 6 párů bází, které se často vyskytují ve všech eukaryotických genomech, dále také u prokaryot a u eubakterií (Tautz, 1989; Selkoe & Toonen, 2006). Počet jejich opakování bývá nejčastěji 5 – 40, ale mohou být i delší. V genetických studiích se nejčastěji používají dinukleotidová, trinukleotidová a tetranukleotidová opakování (Selkoe & Toonen, 2006).

Dále rozlišujeme mikrosatelity podle jejich původu na dva typy. První je odvozen od genomové sekvence, druhý od oblasti, která je těsně přilehlá k mikrosatelitní sekvenci (tzv. „flanking region“, „expressed sequence tags“ – EST), ta bývá stejná u blízce příbuzných druhů. Je možné říct, že genomové mikrosatelity jsou polymorfnější než EST-mikrosatelity (Weng, 2007).

Mononukleotidové repetice nejsou běžné kvůli delšímu řetězci složeného jen z jednoho typu nukleotidu, díky tomu nastávají během amplifikace problémy. Nejčastěji se v genomu vyskytují repetice dinukleotidové (Li et al., 2002). Trinukleotidové repetice jsou velmi zajímavé, protože hrají roli v mnoha lidských neurodegenerativních onemocněních (Huntingtonova choroba, myotonická dystrofie, bulbospinální svalová atrofie, atd.) (Warren & Nelson, 1993) a v mnoha dalších typech rakovin (Wooster et al., 1994). Předpokládá se, že

trinukleotidové a hexanukleotidové repetice neposouvají čtecí rámec („frameshift“), proto mohou být součástí kódujících oblastí (Tóth et al., 2000).

Mikrosatelity mají vysokou mutační rychlost (mezi 10^{-6} a 10^{-2} mutací/lokus za generaci), vzhledem k tomu se vyvíjí vysoký stupeň alelické diverzity, která je důležitá v genetických studiích (Schlötterer, 2000). Nevýhodou mikrosatelitů je naše neznalost mutačních mechanismů u jednotlivých lokusů a možný výskyt nulových alel. Jejich velkou výhodou je malé množství potřebného vstupního materiálu (Selkoe & Toonen, 2006).

Nevýhodou mikrosatelitů je jejich druhová specificita – na rozdíl od jiných markerů (alozymy, mtDNA) je nelze snadno používat u dalších druhů. Např. Wilson et al. (2004) testovali mezidruhovou amplifikaci 48 existujících lokusů různých druhů mšic. Amplifikace byla úspěšná u druhů, které patřily do stejného rodu jako cílové (až 80%), u shodného kmene byla úspěšnost 59%, nízká u vzorků mimo čeled' (35%). Tímto ukázali, že mikrosatelitní markery jsou slibným nástrojem pro populační genetiku a evoluční studium mšic a mezidruhové použití je v zásadě možné.

1.3. Použití mikrosatelitů u nematod

Navzdory jejich velké popularitě u vyšších eukaryot, mikrosatelitní markery doposud nejsou běžně u nematod používány (Otsen et al., 2000).

Mezidruhové amplifikace se u nematod neprováděly, asi jedinou srovnávací práci o mikrosatelitech u hlístic lze uvést od Castagnone-Sereno et al. (2010), kteří srovnávali výskyt různých typů mikrosatelitů u pěti druhů nematod a z nich se poté zaměřili na hlístici *Meloidogyne incognita*, celosvětově hlavního parazita rostlin. Identifikovali u ní celkem 4800 mikrosatelitních lokusů a zjistili, že 2245 di- až hexanukleotidových lokusů poskytují adekvátní materiál pro budoucí vývoj mikrosatelitních markerů u tohoto parazita. Jejich výsledky dále nasvědčují, že mikrosatelity mohou ovlivnit evoluci struktury a funkce proteinů.

Pravděpodobně první práce, která se zabývala mikrosatelity u nematod je od Fisher & Viney (1996), kde se zabývali sekvencemi 8 mikrosatelitních lokusů na parazitické hlístici *Strongyloides ratti*. Ale žádné populačně-genetické analýzy neprováděli.

Hlísticí *Haemonchus contortus*, která parazituje na sliznici slezu ovcí a koz, se zabývali Otsen et al. (2000), kteří izolovali a sekvenovali 59 mikrosatelitů, 27 z nich bylo polymorfních. Řada těchto markerů byla použita k detekci inbredních populací. Populačně-genetická analýza byla zřejmě provedena jen u modelového organismu pro nematody, háďátka obecného (*Caenorhabditis elegans*). Sivasundar & Hey (2003) zkoumali 20

mikrosatelitních lokusů na 23 přírodních liniích *C. elegans* pocházejících z celého světa. Celková variabilita mikrosatelitních lokusů byla nízká. Nejistili žádný vztah mezi genetickou a geografickou vzdáleností, dále pozorovali vysoký počet homozygotů, což mohlo být zapříčiněno tím, že tyto lokusy testovali na liniích z chovu. Haber et al. (2005) sledovali u háďátka obecného jeho evoluční minulost za použití 10 polymorfních trinukleotidových a tetranukleotidových mikrosatelitů, které byly odvozeny z celého genomu. Tyto mikrosatelity byly již použity dříve (např. Hodgkin & Doniach (1997) porovnávali jedince z přirozeného prostředí s jedinci chovanými v laboratoři), nyní je však testovali na 23 nových kmenech, které byly izolovány ze severozápadního Německa. Také zjistili celkově nízkou variabilitu u mikrosatelitů. Výsledky ukazují, že linie *C. elegans* lze geneticky rozlišit na základě geografických vzdáleností a také, v menší míře, rozdíly v době izolace kmene. Dále jejich zkoumání potvrzuje předešlé názory, že háďátka obecná jsou kolonizátoři a díky samooplození expandují do nových stanovišť, aniž by se zde mohli sexuálně rozmnožovat.

Dále Jung et al. (2009) u háďátka borového (*Bursaphelenchus xylophilus*), které je fylogeneticky nejbližší k *S. affine*, testovali nově vyvinuté mikrosatelitní lokusy. K definitivním závěrům však nedošli, protože lokusy testovali na nízkém počtu vzorků, nicméně výsledky znovu potvrdily užitečnost mikrosatelitních markerů.

Tato bakalářská práce se poprvé zaměřuje na použití mikrosatelitních markerů u entomopatogenních hlístovek, a to na souboru populací z laboratorních chovů *S. affine* i na dalších druhzích rodu *Steinernema*.

2. Cíle práce

- Otestovat vhodnost mikrosatelitních lokusů u entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema* a optimalizovat profily vybraných mikrosatelitních lokusů.
- Provést skríníng u vybraných populací druhu *Steinernema affine* a statisticky vyhodnotit výsledky.
- Otestovat možnosti mezidruhové amplifikace na příbuzných druzích rodu *Steinernema*.

3. Materiál a metody

Vzorky různých druhů hlístic byly analyzovány standardním postupem - po DNA extrakci probíhala amplifikace vybraných markerů a následně jejich statistická analýza.

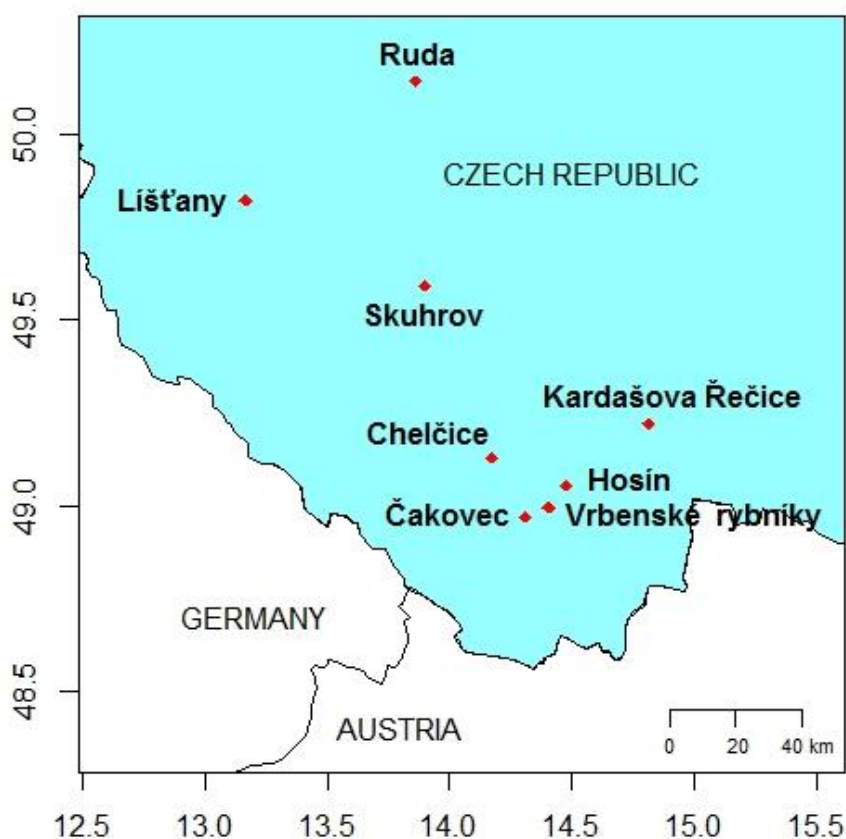
3.1. Materiál

Vzorky hlístic mi poskytl RNDr. Vladimír Půža, PhD., které pocházely ze sbírky Laboratoře entomopatogenních hlístic, Entomologický ústav, Biologické centrum AV ČR. V předchozích letech byly prováděny terénní odběry, izolace a morfologická identifikace odebraných jedinců. Každý odběr se skládal z pěti dílčích odběrů, lopatkou se z oblasti o velikosti cca 100 m² odebrala půda do hloubky 16 cm, která se poté smíchala dohromady.

Vzorky půdy pak byly rozděleny Petriho misek, izolace z jedné poloviny byla prováděna při laboratorní teplotě (22°C), z druhé poloviny probíhala při teplotě 15°C. Principem metody izolace invazivních larev je jejich vychytávání z půdního vzorku do opakovaně nastrožených těl housenek zavíječe voskového (*Galleria mellonella*). Tyto housenky po nakažení hlístovkami po šesti dnech hynou, poté jsou pitvány za účelem zjištění počtu a určení dospělých jedinců hlístovek. Izolované hlístovky poté byly použity pro založení chovů pro další výzkum entomopatologické laboratoře. Počty a seznam lokalit populací *S. affine* jsou uvedeny v Tabulce 1 a Obrázek 1 zobrazuje část mapy České republiky, kde jsou vyznačeny lokality sběru. V Tabulce 2 jsou vypsány informace o dalších analyzovaných druzích rodu *Steinernema*.

Tabulka 1: Seznam lokalit a počty populací *Steinernema affine*.

Název	Zkratka	Počet	Lokalita	Souřadnice GPS
1151	Lista	18	ČR, Lišťany	N49° 49' 25.852" E13° 10' 03.671"
CAKO 01 (1122)	Cako	47	ČR, Čakovec	N48° 58' 08.1" E14° 18' 35.16"
CB1B (1247)	Skuh	45	ČR, Skuhrov	N49° 35' 33.824" E13° 54' 02.909"
HOS2 (1210)	Hos	30	ČR, Pod Hosínem	N49° 03' 19.44" E14° 28' 41.4"
KŘ7	KaRe	45	ČR, Kardašova Řečice	N49° 13' 17.18" E14° 49' 00.689"
LON (Londres)	Lond	30	Francie, Londres	N48° 26' 56.4" E14° 49' 00.689"
MB3E (1260)	Ruda	30	ČR, Ruda	N50° 08' 43.404" E1° 5' 13.2"
R-17	Chel	30	ČR, Chelčice	N49° 07' 46.43" E14° 10' 21.431"
ROME	Rome	30	Francie, Glatigny	N48° 25' 12" E1° 5' 42"
V aff (710)	VrbR	30	ČR, Vrbenské rybníky	N48° 59' 41.717" E14° 24' 28.596"
Celkem		335		



Obrázek 2: Mapa lokalit sběru (zkratky lokalit viz Tabulka 1) v České republice.

Tabulka 2: Seznam lokalit a počty vzorků dalších druhů rodu *Steinernema*.

Název	Druh	Počet	Lokalita
MB3E*	<i>S. affine</i>	1	ČR, Ruda
JEG*	<i>S. arenarium</i>	1	Ukrajina, Černobyl
S2SP	<i>S. arenarium</i>	1	Španělsko
SA	<i>S. arenarium</i>	1	Rusko
SLOV	<i>S. arenarium</i>	1	SK, Lakšár
P1360*	<i>S. bicornutum</i>	1	Polsko
W06	<i>S. bicornutum</i>	1	bývalá Jugoslávie
1418*	<i>S. carpocapsae</i>	1	ČR, Ostrov
ALL	<i>S. carpocapsae</i>	1	USA
DD 136	<i>S. carpocapsae</i>	1	USA
NCR	<i>S. carpocapsae</i>	1	Rusko, St. Petersburg
1155*	<i>S. feltiae</i>	1	ČR, Lužnice
ENT	<i>S. feltiae</i>	1	Komerční linie, Koppert
KR*	<i>S. kraussei</i>	1	ČR, Vrbenské rybníky
OS	<i>S. kraussei</i>	1	ČR, Beskydy - Ostravice
SK 89	<i>S. kraussei</i>	1	Německo
SUB NH3	<i>S. kraussei</i>	1	ČR, Třeboň – Holičky
VA 7.2.	<i>S. kraussei</i>	1	Bulharsko, Vitosha
VČ 2	<i>S. kraussei</i>	1	ČR, Velký Černoháj
1160*	<i>S. sp</i>	1	ČR, Skleněná huť
8 ca	<i>S. sp</i>	1	Kanada, Langley
1025 W*	<i>S. weiseri</i>	1	ČR, Vyškov
1128	<i>S. weiseri</i>	1	ČR, Klášterec
583	<i>S. weiseri</i>	1	ČR, Kaliště u Lipí
DUB 04	<i>S. weiseri</i>	1	ČR, Dubné
TUR	<i>S. weiseri</i>	1	Turecko
Celkem		26	

Pozn.: *S. affine* – použita jako kontrola, další druhy označené hvězdičkou byly použity při první PCR amplifikaci a separaci na agarózovém gelu.

3.2. Extrakce DNA

U každé populace byla prováděna DNA extrakce z jednotlivých hlístovek. Do každé uzavíratelné zkumavky s jedním jedincem bylo přidáno 17,7 µl dH₂O, 2 µl PCR pufru (Top-Bio 10x Taq Buffer complete), 0,2 µl 1% Tween, 0,1 µl proteináza K. Poté se vzorky s tímto pufrem promíchaly, centrifugovaly a daly na 20 minut do chladicího zařízení (4 °C). Po uplynutí 20 minut byly vzorky dány na 60 minut do vodní lázně, která měla 65 °C, a poté byly inkubovány 8 minut při 95 °C. Všechna DNA se uchovávala v chladícím zařízení při 4 °C.

3.3. Primery

K amplifikaci mikrosatelitní DNA nám bylo poskytnuto firmou Genoscreen cca 218 párů primerů, ze kterých vybrali RNDr. Vladimír Půža, Ph.D. a Mgr. Daniela Chundelová primery pro celkem 20 lokusů. Tento výběr probíhal pomocí aplikace Oligocalc - testem na self komplementaritu (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>) a dalším kritériem bylo, aby páry jednotlivých primerů měly podobné teploty nasedání. Vybrané primery byly jednak trinukleotidy - *StTri 1*, *StTri 2*, *StTri 3*, *StTri 4*, *StTri 5*, *StTri 6*, *StTri 7*, *StTri 8*, *StTri 9*, *StTri 10*; a dále dinukleotidy: *StDi 1*, *StDi 2*, *StDi 3*, *StDi 4*, *StDi 5*, *StDi 6*, *StDi 7*, *StDi 8*, *StDi 9*, *StDi 10*. Kompletní přehled všech použitých primerů s detaily je uveden v Tabulce 3.

Tabulka 3: Přehled použitých primerů, PCR produkt – předpokládaná velikost amplifikovaného úseku.

Název primeru	PCR produkt (bp)	Sekvence 5'→3'	Motiv
<i>StTri 1</i>	313	F: CTTCGTTATGTGAGCGCCG R: GGATTTAGGAGGAACTGAACTGA	(CTT) ₅
<i>StTri 2</i>	193	F: ATGGGTCTGACTTCGATTGG R: CTGTTCGGATCCATTTTACACA	(AGG) ₅
<i>StTri 3</i>	190	F: TAGTTTCTGACAAGGCGGC R: TTCATTTTCTTTTCCGGGAC	(AGA) ₅
<i>StTri 4</i>	183	F: TGTGCTGTGCATGTGTCTCT R: CAGCACATCTGCCTGTTTGT	(AAG) ₅
<i>StTri 5</i>	145	F: TTAAACGCTTCGACAGCAGC R: GGTGGAGGAGCAGAAAATGA	(CTT) ₅
<i>StTri 6</i>	140	F: AGGGGTAGTTGTATGTTTAGCAGTG	(GAT) ₅

		R: ATCTGTCACGCATGTCTCCC	
<i>StTri 7</i>	139	F: TCTATCGCCGTATCTCACCTG R: CAGACGGAGCGAAACTCTTC	(TTC) ₅
<i>StTri 8</i>	139	F: AGCTGATGACTCATTTGGAGC R: AACGAGCGTGCAAATACAA	(GTT) ₅
<i>StTri 9</i>	107	F: TTCGCCGAGTTATATTTTCCC R: TTCTTCAGCTTTCTGACCGC	(ACA) ₅
<i>StTri 10</i>	100	F: TCGCTCTCGGTTCTTTTCTG R: ACGGAAAAGGGAAGCCAAC	(CAG) ₅
<i>StDi 1</i>	299	F: TGTTTGTAAGCCTGCACACTG R: CCGTATTGTTTCCGTTCCAA	(TG) ₅
<i>StDi 2</i>	256	F: AAAGACAAAGAATCATCGCCA R: AGCACATTGTTTTCCCAAG	(CA) ₆
<i>StDi 3</i>	240	F: TAAGAGTCAAGAAGTCACCTTCCC R: TTGCTGCTGTCGTCATTTG	(GA) ₈
<i>StDi 4</i>	240	F: CTCCTTCCCCAGTTGTCAGA R: TGATGTTTTCTGTAGACTTCTTTTCG	(CT) ₆
<i>StDi 5</i>	218	F: AAAGTAGAAGTCGGTCCCGC R: GATGTTTATTGCCAGCGGAT	(AG) ₅
<i>StDi 6</i>	212	F: TTGATTTGATGAACGAACGG R: TTGTACTGTTGTTTCGTTCCAAGTT	(GT) ₆
<i>StDi 7</i>	195	F: TATTAACCGCGTTTGCCG R: AAGAGGTGTGCTATTCCGTTG	(TG) ₅
<i>StDi 8</i>	195	F: ATTTTGCGAATCACATCCCT R: CCTCCTGTCTTGAAGTGGCT	(AG) ₈
<i>StDi 9</i>	190	F: AGAAGAAGGAAAAGTCACCACG R: AACGGTACCTAAAGCAGACTCC	(CT) ₇
<i>StDi 10</i>	190	F: GAAGGGCCATCGACACAT R: CACTCTGTTAGTCACCACCACTC	(GA) ₅

Pozn.: F – forwardový/souběžný primer – ve směru transkripce, R – reverzní/zpětný primer – proti směru transkripce.

Amplifikace těchto fragmentů DNA byla prováděna na přístroji Bioer XP cycler. Po dokončení programu byly vzorky chlazeny a uchovávány při teplotě 4°C. PCR profily jsou vypsány v Tabulce 4 a 5, teplota nasedání primeru byla u každého několikrát měněna, aby bylo zjištěno, při které z teplot se nejlépe amplifikuje.

Tabulka 4: Přehled PCR profilů (trinukleotidy).

Primer	Predenatureace		Denaturace*		Nasedání*		Elongace*		Postelongace		Uchovávání	
	[°C]	[s]	[°C]	[s]	[°C]	[s]	[°C]	[s]	[°C]	[s]	[°C]	[s]
<i>StTri 1</i>	94	60	94	30	55/57/63/65	45	72	60	72	120	4	∞
<i>StTri 2</i>	94	60	94	30	53/55/57	45	72	60	72	120	4	∞
<i>StTri 3</i>	94	60	94	30	51/53/55	45	72	60	72	120	4	∞
<i>StTri 4</i>	94	60	94	30	53/55/57	45	72	60	72	120	4	∞
<i>StTri 5</i>	94	60	94	30	57/59/61/65	45	72	60	72	120	4	∞
<i>StTri 6</i>	94	60	94	30	57/59/61/65	45	72	60	72	120	4	∞
<i>StTri 7</i>	94	60	94	30	57/59/61	45	72	60	72	120	4	∞
<i>StTri 8</i>	94	60	94	30	51/53/55/59	45	72	60	72	120	4	∞
<i>StTri 9</i>	94	60	94	30	55/57	45	72	60	72	120	4	∞
<i>StTri 10</i>	94	60	94	30	53/55/57	45	72	60	72	120	4	∞

* Tyto kroky se opakovaly v cyklu 35x.

Tabulka 5: Přehled PCR profilů (dinukleotidy).

Primer	Predenatureace		Denaturace*		Nasedání*		Elongace*		Postelongace		Uchovávání	
	[°C]	[s]	[°C]	[s]	[°C]	[s]	[°C]	[s]	[°C]	[s]	[°C]	[s]
<i>StDi 1</i>	94	60	94	30	53/55/59	45	72	60	72	120	4	∞
<i>StDi 2</i>	94	60	94	30	53/55	45	72	60	72	120	4	∞
<i>StDi 3</i>	94	60	94	30	51/53/55/62	45	72	60	72	120	4	∞
<i>StDi 4</i>	94	60	94	30	57/59/61/65	45	72	60	72	120	4	∞
<i>StDi 5</i>	94	60	94	30	53/55/57/59	45	72	60	72	120	4	∞
<i>StDi 6</i>	94	60	94	30	51/53/55/60	45	72	60	72	120	4	∞
<i>StDi 7</i>	94	60	94	30	49/51/53/58	45	72	60	72	120	4	∞
<i>StDi 8</i>	94	60	94	30	51/53/57/59	45	72	60	72	120	4	∞
<i>StDi 9</i>	94	60	94	30	59/61/63/65	45	72	60	72	120	4	∞
<i>StDi 10</i>	94	60	94	30	51/53/55/62	45	72	60	72	120	4	∞

* Tyto kroky se opakovaly v cyklu 35x.

3.4. Reakční směs pro PCR

Reakční směs pro PCR byla míchána v 200 μ l zkumavkách, pokaždé na ledu. Reakční směs (pro 1 vzorek) se skládala: 7,25 μ l dH₂O, 1,25 μ l PCR pufru (Top-Bio 10x Taq Buffer complete), 1 μ l dNTPs (Thermo Scientific Fermentas), 0,75 μ l Primer Forward, 0,75 μ l Primer Revers, 0,1 μ l „UNIS“ Taq polymeráza (Top-Bio s.r.o.). Konečný objem namíchané směsi byl 11,1 μ l a poté byl přidán 1 μ l DNA extraktu.

3.5. Gelová elektroforéza

Po dokončení PCR reakce nižšího počtu vzorků (6 jedinců *S. affine* z různých populací) byla úspěšnost amplifikace DNA fragmentů, jejich množství a velikosti, ověřena elektroforetickou separací. Tato verifikace byla prováděna jednak na agarózovém gelu, a jestli zde byl viditelný produkt, tak druhá separace (po provedení nové PCR reakce u všech testovaných vzorků viz Tabulka 1 a 2) byla provedena na gelu polyakrylamidovém.

3.5.1. Agarózový gel

Elektroforetická verifikace probíhala na 1,5% gelu: 3g agarózy (SERVA Agarose) byly rozpuštěny v 200 ml 1x TAE pufru (40 mM TRIS-Acetate, pH=8,0, 1 mM EDTA). Tato směs byla poté rozeřhávána v mikrovlnné troubě, po zahřátí byla ochlazena pod tekoucí vodou na cca 40 - 50 °C. Do tohoto roztoku bylo přidáno 15 μ l ethidium bromidu o koncentraci 0,5 μ l/ μ g pro zviditelnění amplifikované DNA pod UV světlem. Takto rozpuštěný agarózový gel byl nalit do připravené formy s hřebínky, které zajišťovaly vznik jamek. Gel byl ponechán ve tmě přibližně 30 minut při pokojové teplotě, dokud zcela nezuhnul. Hotový gel byl buď použit rovnou k elektroforéze, nebo byl uchován v 1x TAE pufru s ethidium bromidem v chladničce (4°C).

Na gel se nanášelo 4-6 μ l vzorku smíchaného s 2 μ l nanášecího pufru „Loading Dye“ (70% dH₂O, 30% glycerol, 0,05% bromfenolová modř), elektroforéza běžela cca 40 minut při napětí 120 V. Pomocí velikostního markeru (GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, Fermentas) byla odhadnuta velikost i množství naamplifikovaného DNA fragmentu. Tato DNA byla v gelu zviditelněna pomocí UV transiluminátoru (UVP Transilluminator) s digitální kamerou, která nám zajistila zachycení výsledné fotografie gelu.

3.5.2. Vertikální polyakrylamidová elektroforéza (PAGE)

Pro přesnější separaci PCR produktů byl použit polyakrylamidový gel. Tento gel umožňuje jemnější rozdělení naamplifikovaných DNA fragmentů, kterého není možné docílit na agarózovém gelu. Polyakrylamidová elektroforéza byla prováděna na přístroji „Cleaver Scienfitic Ltd“.

Tato elektroforetická verifikace byla prováděna na 5% polyakrylamidovém gelu (rozměry gelu: 15 x 15 cm). Gel obsahoval: 2,5 ml 10x TBE pufr, 8,3 ml 30% roztoku akrylamidu, 38,8 ml dH₂O, 350 µl 10% APS a 50 µl TEMED (který se přidával až po „zátce“ – viz další odstavec).

Po smíchání všech chemikálií (až na TEMED) potřebných pro výrobu gelu a před samotným naléváním roztoku mezi skla elektroforézy, byl připraven druhý gel tzv. „zátka“, která sloužila k utěsnění spodního konce skel. Již zmiňovaná „zátka“ byla připravena z 1,75 ml již namíchaného roztoku, 17,5 µl 10% APS a 17,5 µl TEMED. Tento gel rychleji polymerizuje (tuhne) a díky tomu zabrání možnému vytékání gelu ze skel elektroforézy.

Do původního roztoku bylo poté přidáno 50 µl TEMED, promícháno a poté nalito mezi skla (cca 23 ml). Po nalití roztoku po okraj byly vloženy hřebínky pro vytvoření jamek. Gel byl nechán 20 minut polymerizovat.

Během tuhnutí byl do elektroforetické nádoby nalit 0,5x TBE pufr (2 l).

Po polymerizaci gelu byly hřebínky vytaženy a do připravených jamek bylo nepipetováno 6 µl PCR produktu s 2 µl nanášecího pufru (70% dH₂O, 30% glycerol, 0,05% bromfenolová modř). K odhadnutí velikosti naamplifikovaného DNA fragmentu byl použit velikostní marker GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas).

Vertikální elektroforéza trvala 180 minut při napětí 220 V.

Po uplynutí této doby byla aparatura rozebrána a gel byl umístěn do barvicí lázně skládající se z 0,5x TBE pufru s ethidium bromidem o konečné koncentraci 1 mg/ml. Barvení probíhalo asi 20 minut. DNA byla v gelu zviditelněna pomocí UV transiluminátoru (UVP Transilluminator) s digitální kamerou, která nám zajistila zachycení výsledné fotografie gelu.

3.6. Analýza získaných dat

K výpočtu a vyhodnocování genetických parametrů bylo použito více programů. Z fotografií polyakrylamidových gelů byla vizuálně odečtena získaná data a zapsána do matice ve formátu Microsoft Excel v programu GenAlEx 6.501 (Peakall & Smouse, 2006). Výsledky každého vzorku byly zapsány číselnými kódy, které označovaly velikost naamplifikovaných alel. Díky tomuto souboru byl poté celý soubor dat exportován do dalších formátů pro zpracování pomocí dalších programů.

V programu GenAlEx 6.501 (Peakall & Smouse, 2006) byly dále vypočteny hodnoty očekávané heterozygotnosti (H_E) i 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 (uvedena v km).

Korelace mezi geografickou a genetickou vzdáleností (tzv. „Isolation by distance“) byla ověřena pomocí Mantelova testu (Mantel, 1967), ve kterém byly porovnávány matice geografické vzdálenosti a párových genetických distancí (Nei, 1972) mezi populacemi. Statistická průkaznost byla stanovena na základě 999 permutací.

Analýza hlavních komponent (PCoA, principal component analysis) je metoda, která nahrazuje velký soubor základních měřených proměnných a často vůči sobě korelovaných hodnot menším množstvím vzájemně nekorelovaných proměnných, které vznikly váženým průměrem nebo lineární kombinací měřených proměnných hodnot (Lepš, 1996). Její použití umožňuje stanovit genetickou příbuznost populací promítnutím do souřadnic vyjadřujících největší podíl variability.

Analýza molekulární variance (AMOVA, analysis of molecular variance) alelových frekvencí (Wrightovy F – statistiky) porovnává varianci uvnitř populace a mezi populacemi (URL 1). AMOVA byla zadána pro tři úrovně, pro výpočet variability mezi populacemi, uvnitř populací a mezi regiony (Francie a ČR). Počet opakování byl 999.

MicroChecker 2.2.0.3 (van Oosterhout et al., 2004) byl použit pro vyhledávání nulových alel v jednotlivých populacích.

Pomocí programu GenePop 4.2 (Rousset, 2014) byla testována Hardyho-Weinbergova rovnováha s důrazem na zjištění, jestli populace obsahují nadbytek heterozygotů ($H - excess$) nebo nedostatek heterozygotů ($H - deficit$).

Počet multilokusových genotypů (*MLGs*) byl stanoven v programu GenClone 2.0 (Arnaud-Haond & Belkhir, 2007). *MLGs* jsou genotypy vznikající kombinací všech použitých mikrosatelitních lokusů u každého jedince.

Bottleneck 1.2.02 (Piry et al., 1997) byl použit k detekci nedávné redukci velikosti populace (test porovnává očekávanou a předpokládanou heterozygotnost, která je vypočtena na základě alelových frekvencí).

4. Výsledky

4.1. Materiál

V této práci byly testovány dva soubory vzorků: populace *S. affine* o celkovém počtu 335 jedinců z 10 - ti lokalit a 26 vzorků různých druhů rodu *Steinernema* z 26 lokalit.

4.2. Mikrosatelitní lokusy a PCR

Mikrosatelitní lokusy byly zpracovávány ve dvou časově oddělených fázích.

V první fázi jsem optimalizovala se separací na agarózovém gelu profily všech 20 - ti lokusů u různých populací *S. affine* (6 jedinců *S. affine* z různých populací), z nichž bylo vybráno 9 lokusů, které byly elektroforeticky separovány na 5% polyakrylamidovém gelu Mgr. Danielou Chundelovou, Mgr. Andreou Jarošovou a mnou (Tabulka 6).

Tabulka 6: Optimalizované profily v první fázi skríningu.

Primer	Optimalizovaná teplota nasedání	Skrínung proveden
<i>StDi 1</i>	55°C	Chundelová, Jarošová
<i>StTri 1</i>	53°C	Chundelová, Jarošová
<i>StTri 2</i>	55°C	Chundelová, Jarošová
<i>StTri 4</i>	55°C	Chundelová, Jarošová
<i>StTri 7</i>	57°C	Chundelová, Jarošová
<i>StDi 8</i>	57°C	Chundelová, Jarošová
<i>StTri 9</i>	55°C	Chundelová, Jarošová
<i>StTri 10</i>	53°C	Rašková
<i>StTri 3</i>	53°C	Rašková

Druhá fáze se podobala první, optimalizovala jsem s následnou separací na agarózovém gelu profily všech 20 - ti lokusů, ale u různých druhů rodu *Steinernema* (viz Tabulka 2, vybrané linie označené hvězdičkou). Na základě této optimalizace jsem vybrala 8 lokusů a znovu provedla PCR reakci pro všech 26 vzorků, které byly poté separovány na 5% polyakrylamidovém gelu (Tabulka 7). Tato mezidruhová amplifikace nebyla příliš úspěšná, proto u nich nebylo možné udělat statistické analýzy.

Tabulka 7: Optimalizované profily v druhé fázi skrínungu.

Primer	Optimalizovaná teplota nasedání	Úspěšnost na PAGE (počet naamplifikovaných vzorků)
<i>StTri 3</i>	53°C	+ (4)
<i>StTri 7</i>	57°C	-
<i>StTri 8</i>	53°C	-
<i>StTri 10</i>	53°C	-
<i>StDi 3</i>	53°C	-
<i>StDi 6</i>	51°C	-
<i>StDi 7</i>	49°C	-
<i>StDi 10</i>	55°C	+ (4)

Pozn.: „+“ znamená rozdělení na skórovatelný fragment.

Ačkoli u lokusů *StDi 6* a *StTri 10*, u kterých na agarózovém gelu byly zřejmé fragmenty u většiny vzorků, na polyakrylamidovém gelu nebyl viděn ani jeden. U zbylých 4 lokusů opět byly zřejmé fragmenty u většiny vzorků na agarózovém gelu, na polyakrylamidovém gelu bylo možné vidět proužky jen u osmi vzorků, ty ale nebyly řádně separované, často se objevovalo mnoho proužků nebo „slití“ více proužku dohromady a nebylo možné je vizuálně odečíst. U lokusu *StTri 3* byly úspěšně separovány tři vzorky *S. kraussei* a jeden vzorek *S. feltiae*, u lokusu *StTri 10* to byly také tři vzorky *S. kraussei* a jeden vzorek *S. carpocapsae*, u všech bylo možné zjistit, že byly homozygotní (byl zřetelný jeden proužek).

4.3. Statistická analýza

Výsledné polyakrylamidové gely z testování populací *S. affine* byly po vyfotografování vyhodnoceny vizuálně, výsledky byly zapsány do tabulky v programu GenAlEx 6.501 (Peakall & Smouse, 2006) ve formě číselných hodnot, které udávaly velikost jednotlivých alel. Poté byly vytvořeny vstupní soubory pro programy GenPop, MicroChecker, Bottleneck a GenClone. Pro statistické analýzy bylo použito 9 lokusů uvedených v Tabulce 6.

4.3.1. Variabilita lokusů

Nezávislost lokusů byla analyzována pomocí párového testu na vazebnou nerovnováhu („linkage disequilibrium“) v programu GenePop. Tento test vyšel signifikantní u 4 párů lokusů (*StTri 1* & *StTri 7*, *StTri 4* & *StDi 8*, *StDi 1* & *StTri 9*, *StTri 2* & *StTri 10*), poté byla provedena Bonferroniho korekce, po které byl signifikantní jen jediný pár, a to *StTri 1* & *StTri 7* (výsledky viz Příloha 1).

Lokus *StTri 3* byl monomorfní u sedmi populací, lokusy *StTri 1*, *StTri 2*, *StDi 8* a *StTri 9* byly zcela polymorfní. V Tabulce 8 jsou uvedeny lokusy, které byly monomorfní a u jakých populací.

Nejvíce alel (celkem 4) bylo nalezeno v lokusech *StDi 1* a *StTri 9*, u ostatních byly vždy nalezeny 2 alely. Nejvyšší pozorovaná heterozygotnost byla v lokusu *StDi 8*, nejnižší v *StTri 7*. Nejvariabilnějším lokusem mezi populacemi byl lokus *StTri 7* a nejmenší variabilita byla pozorována u *StDi 8*.

Tabulka 8: Použité mikrosatelitní lokusy. Zkratky jednotlivých populací viz Tabulka 1.

Lokus	Počet alel	H_o	H_E	F_{ST}	Monomorfní lokus
<i>StDi 1</i>	4	0,252	0,282	0,277	Hos, Lista
<i>StTri 1</i>	2	0,119	0,382	0,187	
<i>StTri 2</i>	2	0,342	0,382	0,087	
<i>StTri 4</i>	2	0,122	0,187	0,626	KaRe, Hos, Ruda, Lista
<i>StTri 7</i>	2	0,017	0,256	0,370	VrbR, Cako, Lista, Rome
<i>StDi 8</i>	2	0,542	0,340	0,144	
<i>StTri 9</i>	4	0,447	0,401	0,445	
<i>StTri 10</i>	2	0,207	0,180	0,491	Cako, Chel, Lista, Rome
<i>StTri 3</i>	2	0,028	0,084	0,698	KaRe, Hos, Chel, Skuh, Lista, Lond, Rome

Pozn.: H_o – pozorovaná heterozygotnost, H_E – očekávaná heterozygotnost, F_{ST} - index genetické diference mezi populacemi.

Četnost alel pro jednotlivé lokusy u populací byla testována pomocí programu GenAlEx, výsledky jsou uvedeny v Příloze 2. Dominantní alely (tj. s četností výrazně vyšší než ostatní alely) byly detekovány u lokusů *StDi 1*, *StTri 7*, *StTri 10* a *StTri 3*.

Nulové alely byly nalezeny u všech populací, přičemž u třech lokusů detekovány nebyly (*StDi 8*, *StTri 9*, *StTri 10*). Nejméně nulových alel (jediný lokus s nulovou alelou)

obsahovaly dvě populace Líšťany a Glatigny, maximální počet se 4 lokusy s nulovými alelami byly u populací Kardašova Řečice, Vrbenské rybníky, Čakovec a Skuhrov.

Tabulka 9: Detekce nulových alel. Zkratky jednotlivých populací viz Tabulka 1.

	KaRe	Hos	VrbR	Cako	Chel	Skuh	Ruda	Lista	Lond*	Rome
<i>StDi1</i>	+		+	+	+	+				
<i>StTri 1</i>	+	+	+	+		+		+		
<i>StTri 2</i>	+					+	+			
<i>StTri 4</i>			+	+						+
<i>StTri 7</i>	+	+			+	+	+			
<i>StDi 8</i>										
<i>StTri 9</i>										
<i>StTri 10</i>										
<i>StTri 3</i>			+	+						

* U populace Londres nebyla dostatečná data pro zjištění nulových alel.

4.3.2. Genetická variabilita v rámci populací

Základní parametry genetické variability populací shrnuje Tabulka 10. Pro všech 335 jedinců z 10 - ti populací bylo celkem detekováno 260 různých genotypů, z toho se jich 249 vyskytlo pouze jednou. Efektivní počet alel udává počet stejně častých alel, nejvyšší hodnotu měla populace Skuhrov, nejnižší Líšťany. Heterozygotnost je u všech populací, až na populaci Glatigny, nižší než předpokládaná. Při porovnávání hodnot F_{IS} je patrné, že většina populací obsahuje velký počet homozygotů. Nejvyšší hodnotu F_{IS} (0,377) má populace Kardašova Řečice.

Tabulka 10: Celkové hodnoty pro jednotlivé populace. Zkratky jednotlivých populací viz Tabulka 1.

Populace	N	MLG_s	N_e	H_O	H_E	HWE - P deficit	HWE - P excess	Multilocus F_{IS}	Bottleneck P
<i>KaRe</i>	45	32	1,483	0,168	0,277	*	ns	0,377	0,02734*
<i>Hos</i>	30	26	1,489	0,198	0,272	*	ns	0,195	0,00781*
<i>VrbR</i>	30	27	1,518	0,214	0,291	*	ns	0,307	0,03711*
<i>Cako</i>	47	32	1,404	0,210	0,241	*	ns	0,327	0,14844
<i>Chel</i>	30	24	1,443	0,192	0,255	*	ns	0,271	0,05469
<i>Skuh</i>	45	44	1,683	0,325	0,375	*	ns	0,147	0,00391*
<i>Ruda</i>	30	26	1,384	0,171	0,247	*	ns	0,264	0,19141
<i>Lista</i>	18	14	1,319	0,180	0,184	ns	ns	0,027	0,03152*
<i>Lond</i>	30	27	1,594	0,332	0,383	*	ns	0,227	0,00391*
<i>Rome</i>	30	21	1,463	0,316	0,244	ns	*	-0,136	0,03906*

$P > 0,05$ ns, $P < 0,05$ *

Pozn.: N – počet jedinců v populaci, MLG_s – počet multilokusových genotypů, N_e – efektivní počet alel na populaci, H_O – pozorovaná heterozygotnost, H_E – očekávaná heterozygotnost, HWE - P deficit – nedostatek heterozygotů, HWE - P excess – nadbytek heterozygotů, F_{IS} – hodnota fixačního indexu, Bottleneck P – Wilcoxonův test.

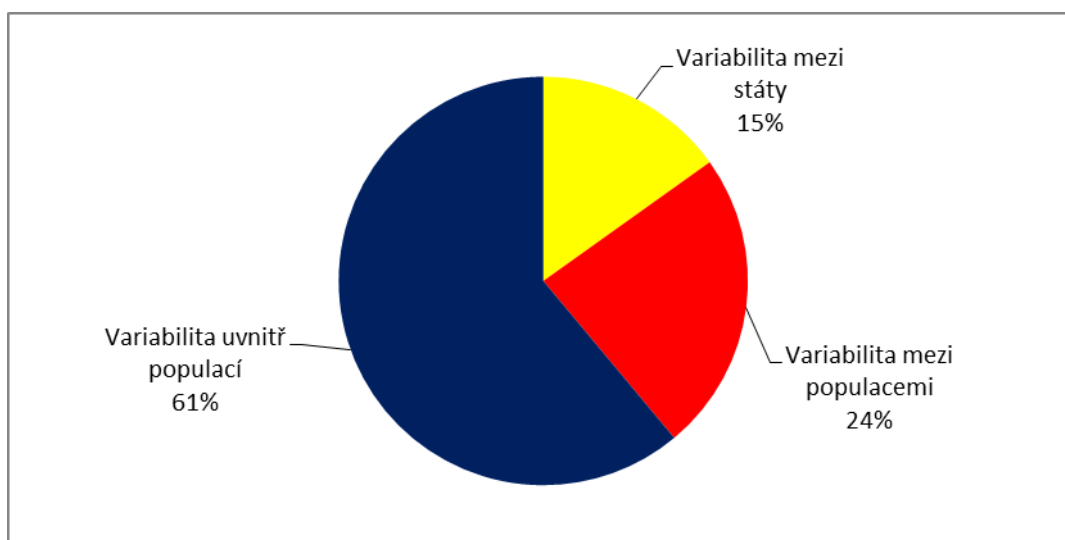
Rozdělení 11 - ti opakovaných multilokusových genotypů v populacích shrnuje Tabulka 11.

Tabulka 11: Multilokusové genotypy. Zkratky jednotlivých populací viz Tabulka 1.

Genotyp č.	Počet jedinců celkem	Populace (počet jedinců)							
		KaRe	Hos	VrbR	Cako	Chel	Skuh	Ruda	Lista
17	6		2		4				
18	6		1	1	4				
46	3		2			1			
51	2	1	1						
79	2						1	1	
96	2		1		1				
101	6	1			3	2			
115	2			1					1
118	2			1					1
120	5			3					2
130	3	1				2			

4.3.3. Genetická variabilita mezi populacemi

Analýza molekulární variance (AMOVA) zjišťuje, jaká část z celkové variance je mezi populacemi, uvnitř populací a mezi státy. Graf pro tento model je na Obrázku 3, kde je vidět, že největší variabilita byla nalezena uvnitř populací.



Obrázek 3: Výsledný graf modelu AMOVA.

Při této analýze je také stanoveno, jak jsou jednotlivé úrovně variability významné; v tomto případě byly všechny indexy signifikantní: $F_{RT} = 0,151$ (genetická diferenciace mezi regiony), $F_{ST} = 0,389$ (genetická diferenciace mezi populacemi), $F_{SR} = 0,281$ (genetická diferenciace mezi populacemi v regionu).

Variabilitu mezi populacemi také vyjadřují párové hodnoty fixačního indexu F_{ST} (Wrightovy F - statistiky) (Weir & Cockerham, 1984) a jeho signifikanci hodnoty P (pravděpodobnost založenou na 999 permutací), které jsou uvedeny v Tabulce 12.

Tabulka 12: Párové hodnoty fixačního indexu F_{ST} (pod diagonálou) a hodnoty pravděpodobnosti P (nad diagonálou). Zkratky jednotlivých populací viz Tabulka 1.

	KaRe	Hos	VrbR	Cako	Chel	Skuh	Ruda	Lista	Lond	Rome
<i>KaRe</i>	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
<i>Hos</i>	0,159	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
<i>VrbR</i>	0,316	0,372	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
<i>Cako</i>	0,110	0,171	0,269	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
<i>Chel</i>	0,069	0,141	0,221	0,091	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
<i>Skuh</i>	0,332	0,344	0,255	0,379	0,302	0,000	0,001	0,001	0,001	0,001
<i>Ruda</i>	0,411	0,442	0,337	0,455	0,339	0,146	0,000	0,001	0,001	0,001
<i>Lista</i>	0,332	0,391	0,090	0,278	0,231	0,279	0,354	0,000	0,001	0,001
<i>Lond</i>	0,359	0,419	0,408	0,361	0,379	0,239	0,375	0,354	0,000	0,001
<i>Rome</i>	0,356	0,449	0,425	0,417	0,435	0,289	0,461	0,432	0,251	0,000

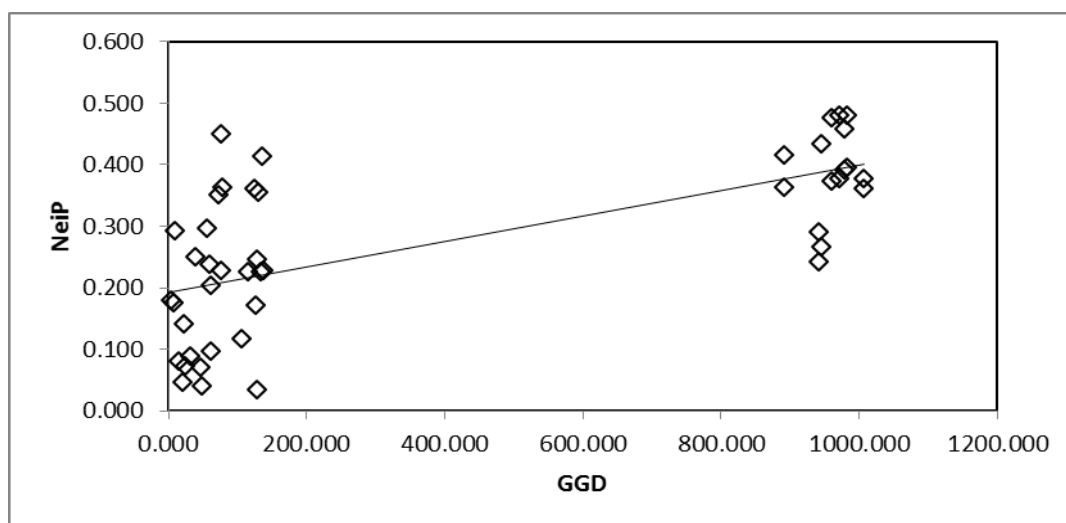
Pro testování možnosti izolace populací na základě vzdáleností byly nejdříve vypočteny párové genetické distance podle Neiho (1972), které lépe odrážejí variabilitu dat na úrovni DNA (Tabulka 13). Tyto hodnoty byly Mantelovým testem porovnány s F_{ST} , a jelikož zde vyšla pozitivní korelace ($P = 0,004$), bylo možné tuto záměnu provést.

Tabulka 13: Matice genetických (Nei, 1972) a geografických (nad diagonálou, v km) vzdáleností. Zkratky jednotlivých populací viz Tabulka 1.

	<i>KaRe</i>	<i>Hos</i>	<i>VrbR</i>	<i>Cako</i>	<i>Chel</i>	<i>Skuh</i>	<i>Ruda</i>	<i>Lista</i>	<i>Lond</i>	<i>Rome</i>
<i>KaRe</i>	0,000	30,79	39,00	46,39	47,93	78,08	123,59	136,59	1007,18	1007,16
<i>Hos</i>	0,090	0,000	8,45	15,60	23,73	72,94	129,08	127,59	982,78	982,69
<i>VrbR</i>	0,250	0,292	0,000	7,73	22,76	75,97	133,85	128,63	977,81	977,71
<i>Cako</i>	0,070	0,081	0,176	0,000	20,47	75,44	134,75	125,97	970,72	970,62
<i>Chel</i>	0,040	0,072	0,141	0,047	0,000	55,15	115,15	105,98	960,42	960,36
<i>Skuh</i>	0,364	0,351	0,229	0,450	0,297	0,000	61,52	58,65	941,82	941,95
<i>Ruda</i>	0,361	0,356	0,227	0,413	0,227	0,097	0,000	61,17	944,12	944,46
<i>Lista</i>	0,229	0,247	0,034	0,171	0,117	0,238	0,203	0,000	891,05	891,28
<i>Lond</i>	0,378	0,397	0,392	0,377	0,374	0,243	0,267	0,364	0,000	3,26
<i>Rome</i>	0,361	0,480	0,458	0,481	0,476	0,291	0,435	0,416	0,179	0,000

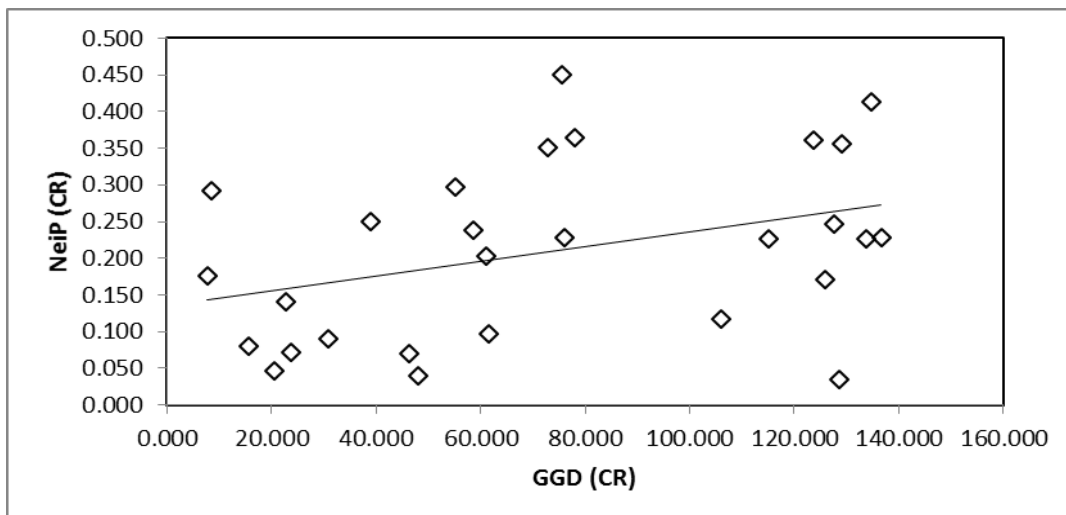
Dalším Mantelovým testem byly porovnávány hodnoty genetické vzdálenosti podle Neiho (1972) mezi populacemi a geografickou vzdáleností. Výpočet byl proveden nejdříve pro všechny populace (ČR i Francie), poté jen pro ČR. Na Obrázku 4 a) můžeme vidět, že tato závislost funguje, ale výsledky testu mohly zkreslit populace z Francie, protože nebyly testovány populace, které pochází z míst mezi ČR a Francií. Proto byl tento test proveden na krátké vzdálenosti – jen u populací ČR (Obrázek 4 b)) – vyšel nesignifikantní, zde není závislost geografické vzdálenosti na genetické.

a) Izolace vzdáleností všech populací.



$P = 0,004^*$

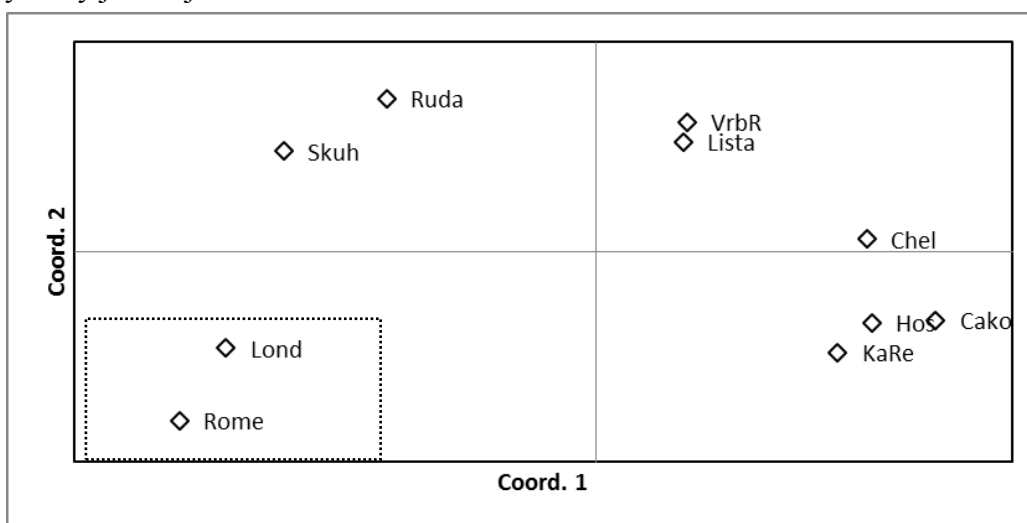
b) Izolace vzdáleností u populací v ČR.



$P = 0,065$

Obrázek 4: Výsledky Mantelova testu: a) všech populací, b) populace ČR. GGD – geografická vzdálenost.

Neiho genetické vzdálenosti byly použity také pro výpočet a konstrukci grafu metodou PCoA. Populace, které jsou si geneticky příbuzné, by měly v grafu vytvořit skupiny. Na tomto grafu lze vidět, že se francouzské populace seskupily správně, ale české jsou umístěné ve všech ostatních kvadrantech, což neodpovídá skutečné geografické poloze. Například Líšňany a Vrbenské rybníky jsou ve skutečnosti od sebe skoro nejdále ze všech míst sběru v ČR (viz Obrázek 2) a v tomto modelu můžeme vidět, že se seskupily. Dále geograficky nejblíže jsou u sebe Hosín, Vrbenské rybníky a Čakovec, na Obrázku 5 by měly být u sebe, však Vrbenské rybníky jsou v jiném kvadrantu.



Obrázek 5: Genetická příbuznost zobrazená modelem PCoA. Zkratky jednotlivých populací viz Tabulka 1.

5. Diskuze

5.1. Izolace DNA a materiál

Vzhledem k malé velikosti jednotlivých hlístovek (cca 0,7 – 1,8 mm) byla použita izolace DNA metodou, která minimalizuje její ztráty. Finální objem byl však i tak velmi omezený – z každého jedince bylo možné vyextrahovat přibližně 12 µl DNA. Proto byl během mé práce používán materiál z chovů, u nichž je možnost hlístovky namnožit a předejít tak vyčerpání zásob DNA, přičemž čerstvé vzorky z terénu zůstaly uchovávány pro zpracování po optimalizaci celé metodiky.

5.2. Mikrosatelitní lokusy, PCR a elektroforetická verifikace

Skríning populací *S. affine* byl po optimalizaci podmínek úspěšný, po vizuálním odečtu dat byla tato data použita pro sestavení souborů pro statistické analýzy.

Druhý skríning různých druhů *Steinernema* tolik úspěšný nebyl. Po optimalizaci profilů vybraných primerů, které byly separovány na agarózovém gelu, byla provedena nová PCR reakce všech testovaných vzorků, ty byly poté separovány na polyakrylamidovém gelu, ale v tomto případě k očekávané separaci fragmentů nedošlo – fragmenty nebyly čitelné, nebo zde bylo hodně „proužků“, ale u většiny vzorků fragmenty nebyly viditelné vůbec a proto nebylo možné odečítat alely. To mohlo být zapříčiněno technickými potížemi, primery nenasadaly zcela přesně (může se stát, že napoprvé nasednou, ale podruhé již ne), mohou se zde vyskytovat nulové alely, atd.. Mezidruhá amplifikace je ale v zásadě možná, protože u dvou lokusů z osmi byly odečitatelné další 3 příbuzné druhy. Pro úspěšný skríning bych doporučila zaklonování PCR produktů, osekvenování a případné navržení druhově specifických primerů.

5.3. Statistická analýza

Vzhledem k tomu, že se populační genetikou pomocí mikrosatelitů zabývalo zatím jen velmi málo prací, je porovnávání našich dat zatím jen ve velmi obecné rovině.

5.3.1. Variabilita lokusů

Vazebná nerovnováha nenaznačila závislost lokusů na sobě, proto všechny mohly být použity pro další analýzy.

U 6 lokusů z 8 byly nalezeny nulové alely, celkem byly detekovány u všech populací, ale ne u stejných lokusů. Relativně vysoký počet nulových alel může mít několik příčin - testované linie pocházely z chovu – výpočet totiž probíhá z pozorovaného a odhadovaného počtu homozygotů, a ten bývá v liniích vyšší (Sivasundar & Hey, 2002). U lokusů *StDi 1*, *StTri 7*, *StTri 3* to mohlo také zapříčinit nerovnoměrné zastoupení alel, které opět navyšuje počet homozygotů.

Nulová alela vzniká mutací v místě, které je homologní k sekvenci primeru a tím znemožňuje průběh PCR reakce; v případě heterozygota je pak tento jedinec seskórován jako homozygot pro nenulovou alelu, zatímco v případě homozygota pro nulovou alelu nedojde k amplifikaci vůbec. Přímou prokázat nulovou alelu lze osekvenováním PCR produktu homozygotů (získaný fragment je ale nutno zaklonovat a sekvenovat více klonů) zkoumaného lokusu a následně upravit nasedající primer tak, že se posune o několik nukleotidů vedle mutace (Dakin & Avise, 2004). Lokusy s nulovými alelami jsou obvykle z analýz vyřazovány, Carlsson (2008) prokázal, že i v případě vysokého výskytu nulových alel u mikrosatelitů je jejich vliv na statistické analýzy malý.

5.3.2. Genetická variabilita populací

Pro všech 335 vzorků bylo detekováno celkem 260 různých genotypů z toho 95,77% jich bylo unikátních. To potvrzuje jejich použitelnost pro populačně-genetické analýzy, kde je u markeru nutná vyšší variabilita pro možnost detekce populační struktury, migrace i dalších mikroevolučních jevů.

Sledovaná heterozygotnost v našem souboru byla vždy (až na populaci Glatigny) nižší než očekávaná a pohybovala se mezi 0,168 – 0,332. Naproti tomu Jung et al. (2010) zaznamenali heterozygotnost u korejských přírodních populace háďátka borového (*Bursaphelenchus xylophilus*), hodnoty mezi 0,47059 – 0,77941, které jsou o mnoho vyšší. Zkoumané hlístovky *S. affine* byly udržovány v chovu, čímž se zvyšuje pravděpodobnost

vlivu tzv. „bottlenecku“ tedy zvýšená možnost inbrídingu v důsledku velmi malé velikosti populace. Následně je pak detekován vysoký počet homozygotů, což se v předložené práci projevilo. Obdobný jev pozorovali Sivasundar & Hey (2002) u laboratorních linií *C. elegans*.

Mantelův test pro porovnání genetické a geografické vzdálenosti byl vytvořen pro dva modely. První model byl vytvořen pro všechny zkoumané populace. Z tohoto výsledku vyplývá, že je zde genetická závislost na geografické vzdálenosti. Druhý model byl vytvořen pouze pro populace v ČR a vyšel nesignifikantní. Genetická vzdálenost se tedy projevila v korelaci s geografickou, jen pokud byly srovnávány populace z velkých vzdáleností – tedy francouzské versus české. Naopak srovnání pouze českých populací izolaci nepotvrdilo, což může být opět zkresleno dobou, po níž byly linie rozmnožovány v chovu. Na druhou stranu zde ale může být i další vysvětlení - Jung et al. (2010) u háďátka borového (*Bursaphelenchus xylophilus*) geografickou strukturu přírodních populací nepozorovali, a vztah mezi geografickou polohou a genetickou variabilitou se jevil více ovlivněn antropogenním faktorem než přírodní disperzí.

Podobně se jeví i výsledky metody PCoA, kde se ve vytvořeném grafu populace z Francie seskupily správně, ale populace z České republiky nikoli.

Z grafu metody AMOVA lze vyčíst, že největší část variance, která byla signifikantní je uvnitř populací (61%), nízká mezi populacemi a mezi státy je nejmenší (15%). Výsledky testu AMOVA, který prováděli Jung et al. (2010) na háďátku borovém ukázaly, že největší genetický rozdíl byl také uvnitř populací, genetická variance mezi státy (Korea, Čína a Japonsko) byla signifikantní, ale nízká (5,6%). Souhrnně lze říci, že předložené výsledky potvrzují užitečnost mikrosatelitních markerů pro studium nematod a dalších malých organismů.

6. Závěr

Podařilo se úspěšně zoptimalizovat, naamplifikovat a zanalyzovat 9 z 20 vybraných mikrosatelitních lokusů pro 335 jedinců *Steinernema affine* z deseti populací z laboratorních chovů. Při předběžné statistické analýze se prokázala nezávislost lokusů, a byla naznačena možnost existence nulových alel. Celkově však bylo patrné, že výsledky byly laboratorním chovem ovlivněny, neboť byl detekován nadbytek homozygotů. I přes tento výsledek se však populace jeví jako geneticky diferencované, závislost mezi geografickou a genetickou vzdáleností naopak potvrzena nebyla.

U mezidruhové amplifikace se podařilo zoptimalizovat 8 mikrosatelitních lokusů, ale v další analýze se všech 26 jedinců druhů *Steinernema* nepodařilo naamplifikovat a nebylo možné provést statistické vyhodnocení. Pouze dva lokusy u tří příbuzných druhů se zatím jeví jako jediné vhodné pro další výzkum. Pro vyloučení nulových alel bychom doporučovali další analýzu a zejména zaklonování a následnou charakterizaci alel jednotlivých lokusů, které by bylo užitečné i pro mezidruhovou aplikaci.

Touto prací byly vytvořeny základní podklady pro výzkum populačně-genetické struktury pomocí mikrosatelitů u entomopatogenních hlístic.

7. Literatura

Adams B. J., Nguyen K. B. 2002. Taxonomy and systematics. In: Gaugler, R., Kaya, H. K., (Eds.), *Entomopathogenic nematodes in Biol. Control. CRC Press, Boca Raton, Florida, 357–372.*

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

Bird A. F., Akhurst R. J., 1983. The nature of the intestinal vesicle in nematodes of the family Steinernematidae. *Int. J. Parasitol.* 13, 599 – 605.

Bisch, G., Pagès, S., McMullen II, J. G., Stock, S. P., Duvic, B., Givaudan, A., Gaudriault, S., 2015. *Xenorhabdus bovienii* CS03, the bacterial symbiont of the entomopathogenic nematode *Steinernema weiseri*, is a non-virulent strain against lepidopteran insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 124 (2015) 15 – 22.

Carlsson, J., 2008. Effects of Microsatellite Null Alleles on Assignment Testing. *Journal of Heredity* 99(6): 616 – 623.

Castagnone-Sereno, P., Danchin, E. GJ, Deleury, E., Guillemaud, T., Malausa, T., Abad, P., 2010. Genome-wide survey and analysis of microsatellites in nematodes, with a focus on the plant-parasitic species *Meloidogyne incognita*. *BMC Genomics* 11: 598.

Dakin, E. E., Avise, J. C. (2004). Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity* 93:504–509.

Dowds, B. C. A., 2002. Virulence mechanisms. In: Gaugler, R. editor. *Entomopathogenic Nematology. 1st ed. New York, NY, USA: CABI Publishing, 79-98.*

Fisher, C. M., Viney, M. E., 1996. Microsatellites of parasitic nematode *Strongyloides ratti*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 80, 221 – 224.

Foltan, P., Půža, V. (2009). To complete their life cycle, pathogenic nematode–bacteria complexes deter scavengers from feeding on their host cadaver. *Behavioural processes* 80, 76-79.

Haber, M., Schüngel, M., Putz, A., Müller, S., Hasert, B., Schulenburg, H., 2005. Evolutionary History of *Caenorhabditis elegans* Inferred from Microsatellites: Evidence of Spatial and Temporal Genetic Differentiation and the Occurrence of Outbreeding. *Molecular Biology and Evolution* vol. 22 no. 1.

Hazir, S., Kaya, H. K., Stock, S. P., Keskin, N., 2003. Entomopathogenic Nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) for Biological Control of Soil Pests. *Turk J Biol* 27, 181 – 202.

Hodgkin, J., Doniach, T., 1997. Natural variation and copulatory plug formation in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 146: 149 – 164.

Jung, J., Han, H., Ryu, S. H., Kim, W., 2010. Microsatellite variation in the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Steiner and Bührer) Nickle in South Korea. *Genes & Genomics* 32: 151 – 158.

Laumond C., Mauleon H., Kermarrec A., 1979. Données nouvelles sur le spectre d'hotes et le parasitisme du nématode entomophage *Neoplectana carpocapsae*. *Entomophaga*. 24:13–27.

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

Li, Y., Korol, A. B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E., 2002. Microsatellites: genomic distribution, stative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11, 2453 – 2465.

Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209 – 220.

Miles, C., Blethen, C., Gaugler, R., Shapiro-Ilan, D., Murray, T., 2012. Using Entomopathogenic Nematodes for Crop Insect Control. A *Pacific Northwest extension publication*, PNW544.

Morgante, M., Olivieri, A. M., 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* 3, 175 – 182.

Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283 – 292.

- Nermut, J., Půža, V., Mráček, Z., 2012.** Entomopatogenní a moluskoparazitické hlístice - neviditelní půdní zabijáci. *Živa*.
- Otsen, M., Plas, M. E., Lenstra, J. A., Roos, M. H., Hoekstra, R., 2000.** Microsatellite diversity of isolates of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Molecular and Biochemical parasitology* 110, 69 – 77.
- Peakall, R., Smouse, P. E., 2006.** GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288 – 295.
- Piry, S., Luikart, G., Cornuet, J.-M.** BOTTLENECK : A program for detecting recent effective population size reductions from allele data frequencies. (<http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/software/Bottleneck/pub.html>), staženo: 10.4.2015.
- Poinar Jr., G. O., 1979.** Nematodes for Biological Control of insects. *CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida*, pp. 249.
- Půža, V., 2009.** Mezidruhová kompetice a hostitelské spektrum entomopatogenních hlístovek (Steinernematidae, Nematoda). Doktorská dizertační práce. Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita. 70 pp.
- Regeai, S. O., Dolan, K. M., Fitzpatrick, D. A., Browne, J. A., Jones, J. T., Burnell, A. M., 2009.** Novel primers for the amplification of nuclear DNA introns in the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* and their cross-amplification in seven other *Heterorhabditis* species. *Molecular Ecology Resources* 9, 421 – 424.
- Roussett, F., 2008.** GENPOP '007: a complete re-implementation of the GENPOP software for Windows and Linux. *Molecular Biology Resources* 8: 103 – 106.
- Selkoe, K. A., Toonen, R. J., 2006.** Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9: 615 – 629.
- Schlötterer, C., 2000.** Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109: 365 – 371.
- Sivasundar, A., Hey, J., 2003.** Population Genetics of *Caenorhabditis elegans*: The Paradox of Low Polymorphism in a Widespread Species. *Genetics* 163: 147 – 157.

Tautz, D., 1989. Hypervariability of sample sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research, Volume 17, Number 16.*

Tóth, G., Gáspári, Z., Jurka, J., 2000. Microsatellites in Different Eucaryotic Genomes: Survey and Analysis. *Genome Research 10: 967 - 981.*

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

Warren, S. T., Nelson, D. L., 1993. Trinucleotide repeat expansions in neurological disease. *Current Opinion in Neurobiology 3, 752 – 759.*

Weir, S. B., Cockerham, C. C., 1984. Estimating F-Statistic for the Analysis of Population Structure. *Evolution, Vol. 38, No. 6, 1358-1370 pp.*

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.*

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.*

Wooster, R., Cleton-Jansen, A. –M., Collins, N., Mangion, J., Cornelis, R. S., Cooper, C. S., Gusterson, B. A., Ponder, B. A. J., von Deimling, A., Wiestler, O. D., Cornelisse, C. J., Devilee, P., Stratton, M. R., 1994. Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. *Nature Genetics 6, 152 – 156.*

Internetové zdroje:

URL 1: http://web.natur.cuni.cz/zoologie/biodiv/ME/5_POPULACE.pdf; citováno: 14. 4. 2015

URL 2: http://www.fs.fed.us/NFGEL/documents/geneticfactsheets/Vol_5_screen.pdf, citováno: 20. 4. 2015.

8. Přílohy

Seznam příloh:

Příloha 1: Výsledky párového testu na vazebnou nerovnováhu („linkage disequilibrium“).

Příloha 2: Četnost alel pro jednotlivé lokusy u populací.

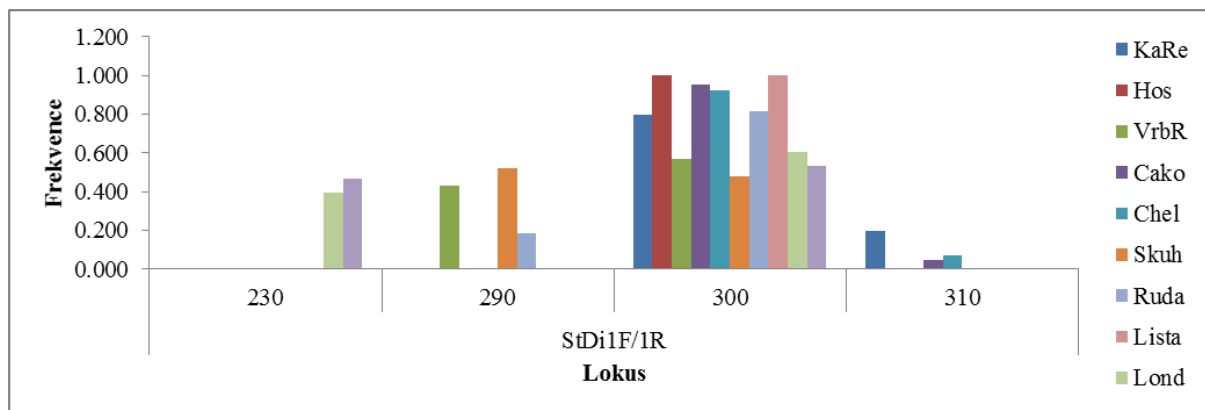
Příloha 1: Výsledky párového testu na vazebnou nerovnováhu („linkage disequilibrium“).

Kombinace páru lokusů	P	Bonferroniho korekce
<i>StDi 1 & StTri 1</i>	0,327839	0,002083
<i>StDi 1 & StTri 2</i>	0,653220	0,005000
<i>StTri 1 & StTri 2</i>	0,875566	0,012500
<i>StDi 1 & StTri 4</i>	0,611804	0,004545
<i>StTri 1 & StTri 4</i>	0,101111	0,001613
<i>StTri 2 & StTri 4</i>	0,380749	0,002273
<i>StDi 1 & StTri 7</i>	0,398548	0,002500
<i>StTri 1 & StTri 7</i>	0,000025*	0,001389
<i>StTri 2 & StTri 7</i>	0,430855	0,003125
<i>StTri 4 & StTri 7</i>	0,054630	0,001563
<i>StDi 1 & StDi 8</i>	0,687074	0,005556
<i>StTri 1 & StDi 8</i>	0,834341	0,008333
<i>StTri 2 & StDi 8</i>	0,230431	0,001786
<i>StTri 4 & StDi 8</i>	0,037501	0,001515
<i>StTri 7 & StDi 8</i>	0,946989	0,025000
<i>StDi 1 & StTri 9</i>	0,004696	0,001429
<i>StTri 1 & StTri 9</i>	0,294445	0,002000
<i>StTri 2 & StTri 9</i>	0,501544	0,003571
<i>StTri 4 & StTri 9</i>	0,374181	0,002174
<i>StTri 7 & StTri 9</i>	0,157999	0,001667
<i>StDi 8 & StTri 9</i>	0,293231	0,001923
<i>StDi 1 & StTri 10</i>	0,403154	0,002632
<i>StTri 1 & StTri 10</i>	0,724546	0,006250
<i>StTri 2 & StTri 10</i>	0,019645	0,001471
<i>StTri 4 & StTri 10</i>	0,989122	0,050000
<i>StTri 7 & StTri 10</i>	0,599573	0,004167
<i>StDi 8 & StTri 10</i>	0,386423	0,002381
<i>StTri 9 & StDi 10</i>	0,440727	0,003333
<i>StDi 1 & StTri 3</i>	0,565235	0,003846
<i>StTri 1 & StTri 3</i>	0,932043	0,016667
<i>StTri 2 & StTri 3</i>	0,243397	0,001852
<i>StTri 4 & StTri 3</i>	0,827236	0,007143

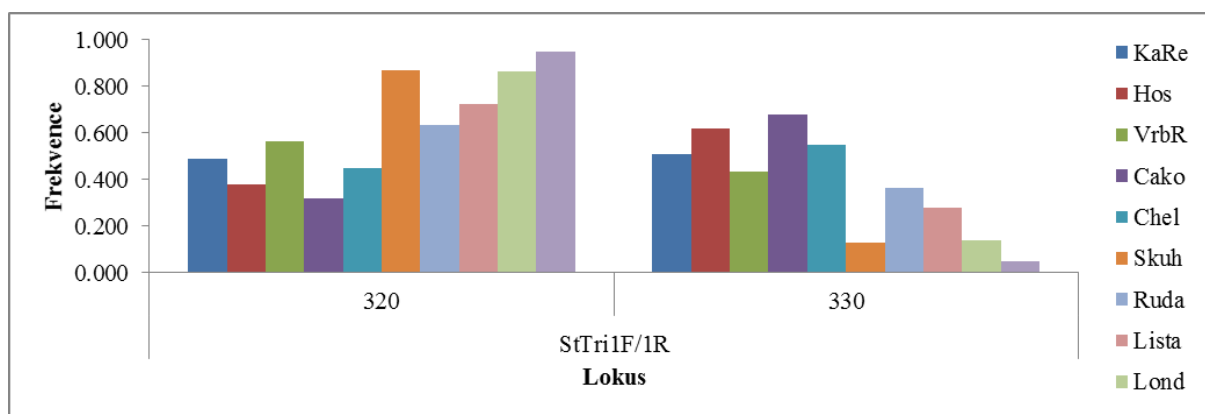
<i>StTri 7 & StTri 3</i>	0,420790	0,002778
<i>StDi 8 & StTri 3</i>	0,852952	0,010000
<i>StTri 9 & StTri 3</i>	0,210997	0,001724
<i>StTri 10 & StTri 3</i>	0,424650	0,002941

Příloha 2 a - h: Četnost alel pro jednotlivé lokusy u populace. Zkratky jednotlivých populací viz Tabulka 1.

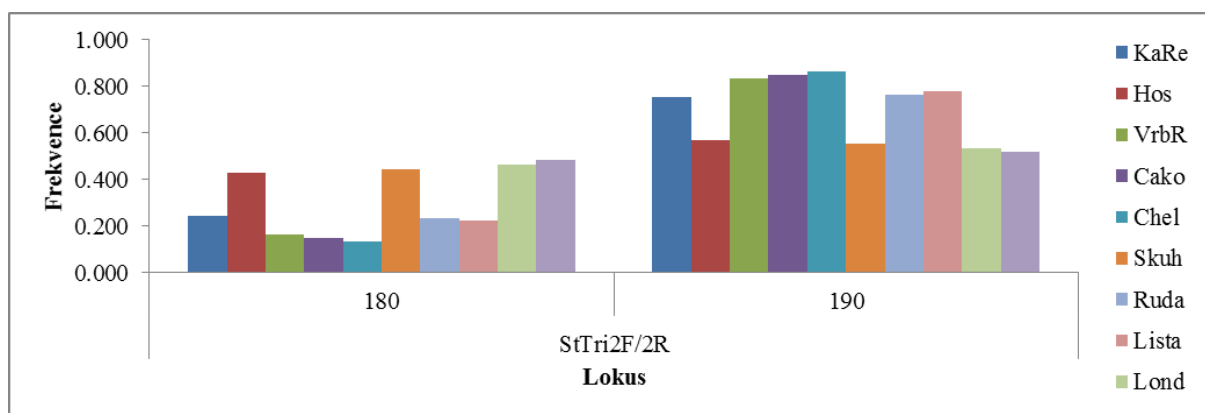
Příloha 2 a: Lokus *StDi 1*.



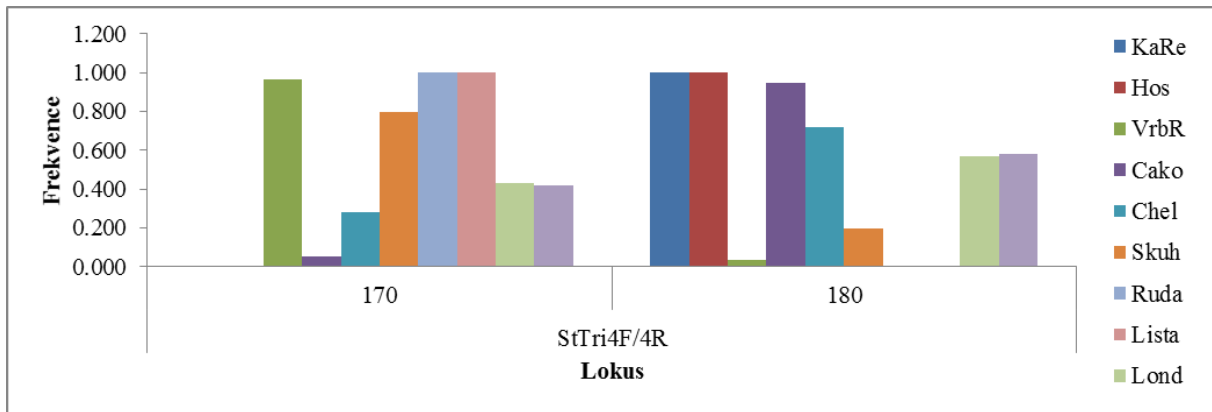
Příloha 2 b: Lokus *StTri 1*.



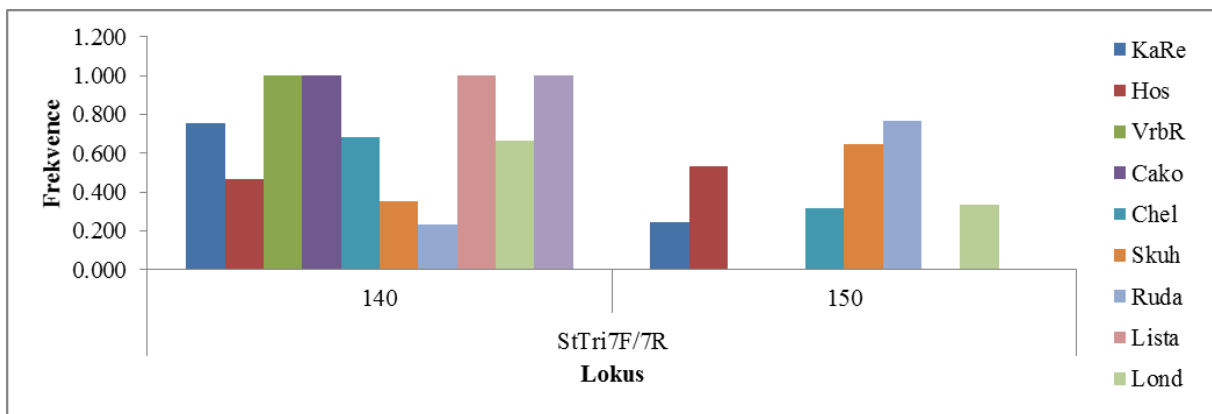
Příloha 2 c: Lokus *StTri 2*.



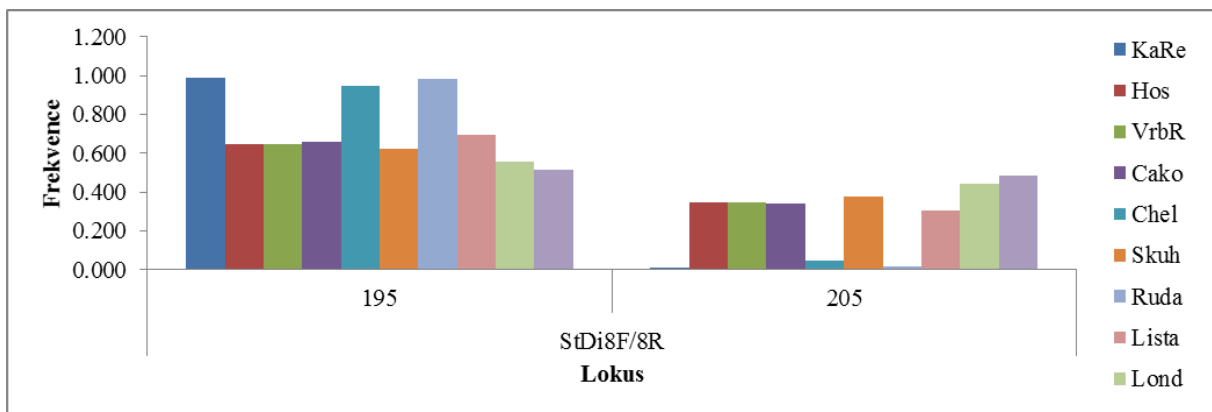
Příloha 2 d: Lokus *StTri 4*.



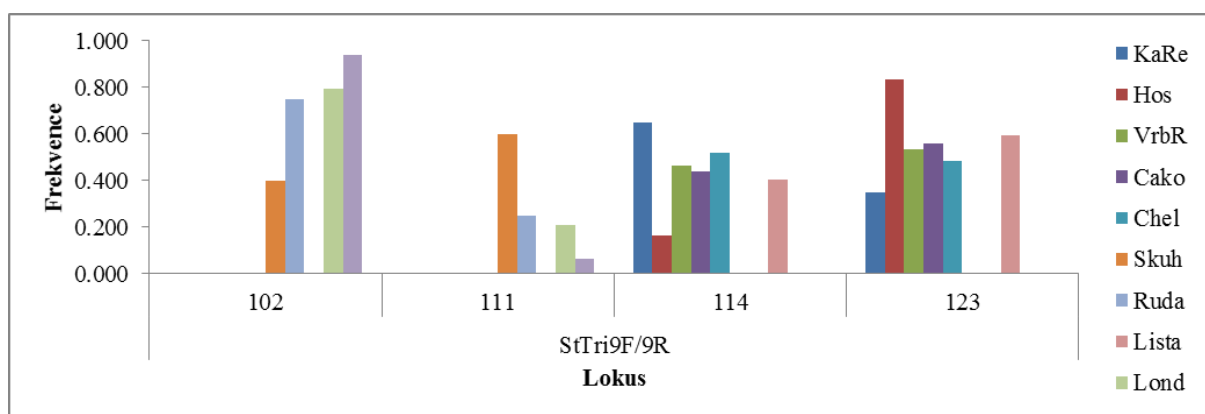
Příloha 2 e: Lokus *StTri 7*.



Příloha 2 f: Lokus *StDi 8*.



Příloha 2 g: Lokus *StTri 9*.



Příloha 2 h: Lokus *StTri 10*.

