Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Genetická variabilita přírodních populací entomopatogenní hlístice *Steinernema affine* (*Steinernematidae*) v zemědělské krajině.

Bakalářská práce

Jan Hartmann

Školitelka: PaedDr. Martina Žurovcová, Ph.D.

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

České Budějovice 2017

Bakalářská práce

Hartmann, J., 2017: Genetická variabilita přírodních populací entomopatogenní hlístice *Steinernema affine* v zemědělské krajině. [Genetic variability of natural populations of entomopathogenic nematode *Steinernema affine* in agricultural landscape, Bachelor Thesis, in Czech] - 46 p., Faculty of science, University of South Bohemia, České Budějovice

Annotation

Genetic analysis of 225 samples of entomopathogenic nematodes *Steinernema affine* was conducted with the use of 8 microsatellite loci. Statistical analysis revealed no correlation between genetic and geographic distance. High genetic variability was detected within populations The main influence on genetic variability appears to be random genetic drift and mutation.

Tato práce je součástí grantového projektu GA ČR P504/12/2352.

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

V Českých Budějovicích, 18.4. 2017 .....

Poděkování

Chtěl bych poděkovat své školitelce PaedDr. Martině Žurovcové, Ph. D. za odborné vedení, dohled, cenné rady a informace poskytnuté v průběhu práce, RNDr. Vladimíru Půžovi, Ph.D. za poskytnutí analyzovaného materiálu a za veškeré informace o hlístovkách. Dále bych rád poděkoval Bc. Michaele Raškové za naučení laboratorních technik. Zvláště bych chtěl poděkovat své rodině a přátelům za podporu během celého studia

Obsah

1. Úvod 1
1.1. Entomopatogenní hlístice 1
1.1.1. Způsob života 1
1.1.2. Využití v biologické ochraně 3
1.2 Genetické markery 4
1.2.1. Mikrosatelity 4
1.2.2. Použití mikrosatelitů u hlístic 5
2. Cíle práce 8
3. Materiál a metody 9
3.1. Materiál 9
3.2. Extrakce DNA 10
3.3. PCR amplifikace 11
3.4. Gelová elektroforéza 13
3.4.1. Agarózový gel 13
3.4.2. Vertikální Polyakrylamidová Gelová Elektroforéza 14
3.5. Analýza dat 16
4. Výsledky 18
4.1. Statistická analýza dat 18
4.1.1 Variabilita lokusů 18
4.1.2 Variabilita populací 20
4.1.3 Genetická variabilita mezi populacemi 21
5. Diskuze 30
5.1. Analýza lokusů 30
5.5. Analýza populací 31
6. Závěr 34
7. Literatura 35
8. Přílohy 42

1. Úvod

1.1. Entomopatogenní hlístice

Entomopatogenní hlístice z kmene Nematoda jsou obligátní parazité hmyzu. Dělí se do dvou čeledí *Steinernematidae* a *Heterorhabditidae*. Lze je nalézt v půdách většiny ekosystémů světa (Nermuť et al., 2012).

Jejich životní strategie je založena na symbiotickém vztahu s gramnegativními bakteriemi rodů *Xenorhabdus* (*Steinernematidae*) a *Photorhabdus* (*Heterorhabditidae*) z čeledi *Enterobacteriaceae* (Chaston et al., 2011; Griffin et al., 2005). Bakterie jsou uloženy buď přímo ve střevě, což je příklad rodu *Heterorhabditis*, nebo ve speciálním střevním váčku, jak tomu je u rodu *Steinernema* (Boemare et al.,1993; Chaston et al., 2011). Ačkoliv mají oba rody hlístic mnoho společného, tak si nejsou blízce příbuzné a jejich životní strategie nejspíše vznikla konvergentní evolucí (Griffin et al., 2005).

1.1.1. Způsob života

Entomopatogenní hlístovky žijí v půdě pouze ve stádiu larvy třetího instaru (invazní larva), která hledá vhodného hostitele (Miles et al., 2012). Pro ochranu před nepříznivými vlivy je vybavena silnou kutikulou, uzavřenou trávicí soustavou a energetickými zásobami, což jí chrání před mrazem, vyschnutím, nebo nakažením plísněmi (Griffin et al., 2005). Sucho je značný problém pro larvy hlístic, jelikož půdní vlhkost pomáhá larvám vytvářet obal, který usnadňuje pohyb (Koppenhöfer et al., 2007). Vhodnými strategiemi proti suchu je migrace do nižších půdních vrstev, nebo přečkání nepříznivých podmínek v mrtvém těle hostitele (Půža et al., 2007).

Klíčové pro hlístici je nalezení hostitele v půdě. K tomuto účelu využívá citlivé smyslové orgány na hlavě (amfidy a hlavové papily), kterými zachycuje sloučeniny vylučované hostitelem. Mezi tyto sloučeniny patří amoniak, trimethylamin, nebo vydechovaný oxid uhličitý (Hallem et al., 2011). Jakmile je vhodná oběť nalezena, dojde k průniku do tělní dutiny hostitele přes ústní a řitní otvor, spirakula vzdušnic, nebo penetrací intersegmentální membrány (Nermuť et al., 2012).

Lewis et al. (2006) popisuje dvě strategie napadání hostitele. První je nazývána *crusiser*, kdy hlístice putuje v půdě a aktivně vyhledává svou oběť, zatímco druhá strategie zvaná *ambusher*, kdy larva čeká na místě na procházejícího hostitele.

Jakmile invazní larva pronikne do hostitele, dochází k uvolnění symbiotických bakterií, které se pomnoží a během jednoho až dvou dnů zahubí hostitele septikemií. Namnožené bakterie slouží jako potrava pro hlístice. Dochází k vývoji přes čtvrtý instar do dospělce, hlístice se páří a kladou vajíčka (Nermuť et al., 2012). Je důležité poznamenat, že pohlavní rozmnožování se vyskytuje u první generace pouze u rodu *Steinernema*, zatímco u rodu *Heterorhabditis* jsou dospělci hermafroditičtí a jedinci s odděleným pohlavím vznikají až v následující generaci (Dix et al., 1993; Poinar et al., 1990). U hermafroditů a starších samic dochází k nitroděložnímu líhnutí vajec (endotokia matricida), kdy rodič umírá a slouží jako potrava pro novou generaci (Johingk et al., 1999). Druhá generace se opět vyvíjí až do fáze dospělce a následně se množí. Potomci druhé generace se vyvíjí pouze do třetího instaru a jako invazní larvy opouštějí hostitele (Nermuť et al., 2012).

Za příhodných podmínek proběhne celý cyklus od infekce hostitele až po uvolnění nových invazních larev během 6 - 14 dní (Miles et al., 2012). Pokud se v hostiteli nachází dostatek živin, pak může dojít ke vzniku několika dalších generací před opuštěním hostitele mladými invazními larvami (Griffin et al., 2005).

.Hlístovky jsou rozšířeny po všech kontinentech vyjma Antarktidy a obývají široké spektrum biotopů. Obecně platí, že jejich rozmístění je shlukovitého charakteru, avšak úroveň shlukovitosti se může lišit mezi jednotlivými druhy v závislosti na podmínkách prostředí, ale i na strategii napadání hostitele (Stuart et al., 2006). Schopnost disperze je značně omezená. Jediné stádium schopné samostatného pohybu je invazní larva. Jinak nejspíš převažuje pasivní transport v těle hostitele (Malan a More, 2011; Stuart et al., 2006). Obecně se předpokládá, že jednotlivé populace hlístovek jsou schopné i přes svou oddělenost a omezenou schopnost pohybu do určité míry interagovat mezi sebou, neboli vykazují známky metapopulace (Homminick et al., 1999). Zdá se, že se mohou lišit biotopové preference jednotlivých druhů hlístovek (Mráček et al., 2005). Například *Steinernema affine* se vyskytuje v otevřených prostředích, na lukách jak přirozeně vzniklých, tak uměle udržovaných (Půža a Nermuť, 2015).

1.1.2. Využití v biologické ochraně

Entomopatogenní hlístice jsou vhodné pro ochranu plodin před škůdci, aniž by se muselo použít chemických pesticidů. Jejich účinnost je ovlivněna několika faktory. Mezi ty hlavní patří vlhkost a typ půdy, metoda aplikace hlístovek, nebo vystavení UV záření (Georgis et al., 2006). Během posledních několika let došlo k pokroku v užívání entomopatogenních hlístic jako opatření proti škůdcům. Dochází k užívání hlístic s pomocnými látkami, které rozšiřují pole působnosti i do nadzemních částí rostlin, kam obvykle invazní larvy mají ztížený přístup (Lacey et al., 2015). Gumus et al. (2015) například použili techniku, kdy předem nakaženého hostitele vypustili do prostředí za účelem likvidace hlístic v těžko dostupných, kryptických habitatech.

Entomopatogenní hlístice jsou atraktivním prostředkem k hubení škůdců rostlin. Dosud není dostatečně známá populačně genetická struktura a rozšíření hlístovky *Steinernema affine* v zemědělské krajině. Tyto vědomosti jsou však nezbytně důležité při užívání komerčních hlístovek proti škůdcům, jelikož komerčně dostupné hlístovky mohou nenávratně poškodit původní populace hlístovek. Aby bylo možné hodnotit riziko ohrožení přírodních populací hlístovek komerčními druhy užívanýmch k biokontrole, je důležité prozkoumat jejich rozšíření a populační genetickou strukturu.

1.2. Genetické markery

Genové markery jsou dědičné části DNA o mnoha formách, které slouží k rozeznávání jedinců, populací a druhů. V diploidních organismech je přítomna buď jedna nebo dvě formy (alely) na jeden lokus (Sunnucks, 2000). Existuje několik druhů genových markerů s výhodami a nevýhodami specifickými pro každý z nich. Patří sem alozymy, mikrosatelity, mitochondriální a jaderné sekvence (Selkoe a Toonen, 2006).

1.2.1. Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou tandemově se opakující sekvence obvykle označované jako VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) složené z 1 až 6 párů bází. Sekvence přiléhající k mikrosatelitům se nazývají „flanking regions“. Tyto oblasti mají mnohem menší mutační rychlost než samotné mikrosatelity a jsou obecně konzervované mezi jedinci druhu, nebo velmi blízkými druhy. Tyto přiléhající oblasti jsou využívány pro sestavování primerů pro polymerázovou řetězovou reakci (Meglécz et al., 2007). Na základě počtu opakujících se nukleotidů lze mikrosatelity rozlišit na dinukleotidy, trinukleotidy, tetranukleotidy, nebo hexanukleotidy (Selkoe a Toonen, 2006).

Mikrosatelity lze je nalézt jak v genomu eukaryotních živočichů, tak v chloroplastovém genomu rostlin (Jarne et al., 1996). Jejich výskyt v genomu není omezen pouze na nekódující části. Ze všech známých protein kódujících oblastí se ve 14% vyskytují tandemové repetice. Je však nutné dodat, že množství těchto repetic v kódující části genomu je zhruba 3x větší u eukaryot jak u prokaryot (Li et al., 2004). V kódujících oblastech se převážně vyskytují trinukleotidové a hexanukleotidové repetice, protože u nich nedochází k posunu čtecího rámce kvůli sklouzávání polymerázy při replikaci, jako tomu dochází například u mononukleotidových repetic (Selkoe a Toonen, 2006).

Charakteristickou vlastností, díky které dosahují mikrosatelity vysokých úrovní polymorfismu, je vysoká mutační rychlost. Díky tomu jsou tyto markery vhodné pro určení nedávných drastických změn v populaci (bottleneck) narozdíl od jiných genetických markerů s nižší mutační rychlostí. (Hedrick, 1999). Za hlavní způsoby mutace mikrosatelitů jsou považovány sklouzávání polymerázy během replikace a nerovnoměrná rekombinace (Jarne a Lagoda, 1996).

Mikrosatelity se těší velké oblibě u populačních biologů díky svým vlastnostem, jako například malá velikost detekováného lokusu (umožňuje jednoduchou manipulaci a

spolehlivé zjišťování dat), vysoká úroveň polymorfismu, či kodominantní dědičnost, díky které lze snadno rozeznat heterozygotního jedince od homozygotního. (Luikart a England, 1999). Nevýhody mikrosatelitů spočívají v jejich druhové specifičnosti, kdy se vyvinuté primery mohou použít pouze pro populace stejného druhu, nebo v některých případech pouze u velmi blízce příbuzných druhů (Temperley et al., 2009). Problémem mohou být tzv. nulové alely, neboli mutace v místě nasedání primeru, které brání namnožení produktu. Důsledkem nulových alel můžou být neúspěšné amplifikační reakce, nebo nadměrné množství homozygotů v našich datech (Carlsson, 2008). Při elektroforetické separaci se mohou objevit alely o stejné velikosti, ale jiného původu. Tento jev se nazývá homoplázie a jeho důsledkem je zkreslení alelové diverzity populací a genového toku (Selkoe a Toonen, 2006).

1.2.2. Použití mikrosatelitů u hlístic

Mikrosatellity byly vždy oblíbenými genovými markery u vyšších eukaryot, ale u hlístic nebývaly hojně užívány (Otsen et al., 2000).

Jednou z prvních prací, ve které se použily mikrosatelity na hlístici byla od Fisher a Viney (1996). Zabývali se osmi mikrosatelitními lokusy parazitické hlístice myší *Strongyloides ratti*. Zkoumali úspěšnost amplifikace mikrosatelitů polymerázovou řetězovou reakcí, ale žádnou populačně genetickou analýzu neprováděli. Tito autoři provedli o dva roky později populačně genetickou analýzu 10ti populacích tohoto druhu, ale za použití jiných genových markerů (AFLP) (Fisher a Viney 1998) .

Ke zkoumání evoluční minulosti háďátka *Caenorhabditis elegans* využili Haber et al. (2005) 10 trinukleotidových a tetranukleotidových mikrosatelitů. Mikrosatelitní lokusy byly použity na populacích již dříve studovaných společně s dalšími novými populacemi ze severozápadního Německa. Jejich výsledky poukazují na zvyšující se diferenciaci háďátek se zvětšující se vzdáleností. Variabilita byla přitom u vybraných háďátek nízká. *C. elegans* je horlivým kolonizátorem, v čemž mu pomáhá rychlé rozmnožování samooplozením. Neblahým důsledkem je však snížená variabilita.

Další studie byly zaměřené na parazitické druhy. Parazitická hlístice ovcí *Teladorsagia circumcineta* byla podrobena populačně genetické analýze skupinou Grillo et al. (2007). Využili 5 mikrosatelitních markerů na populace chované v laboratoři společně s populacemi ze Spojených tátů, Velké Británie, Nového Zélandu a Francie. Pozorovali

vysokou úroveň polymorfismu spíše uvnitř populací, než mezi nimi. Výjimkou byla populace z Francie, která vykazovala velkou míru diferenciace populací z ostatních států. Po dalším testování došli k závěru, že sběr ve Francii obsahoval dvě sympatrické populace s minimálním nebo žádným genovým tokem mezi nimi. Tento výsledek zdůrazňuje důležitost molekulárních metoda při přesném určování druhů.

Silvestre et al. (2009) zkoumali populační strukturu dvou parazitických hlístic *Teladorsagia circumcincta* a *Haemoconchus contortus*. Bylo použito 7 mikrosatellitních markerů. Zjistili velkou genetickou divergenci v populacích *H. contortus* nejspíše v důsledku genetického driftu, zatímco u *T. circumcinta* byla genetická divergence výrazně nižší.

Jak si Yi et al. (2016) všiml, mikrosatelity byly použity již v několika zemích na studium parazitické hlístice *Haemonchus contortus*. Yi et al. (2016) použili 8 mikrosatelitních lokusů k analýze 7 populací tohoto parazita. Zjistili velkou vnitropopulační variabilitu a slabou divergenci mezi populacemi. V Číně jde o první práci tohoto druhu na hlístici *Haemonchus contortus*, která je základním kamenem pro budoucí práce v tomto směru na území Číny.

Další dvě studie se zabývaly háďátkem borovým (*Bursaphelenchus xylophilus*), které je fylogeneticky velmi blízko k *S. affine*. Jung et al. (2010) pozorovali velkou alelovou diverzitu navzdory nízké heterozygotnosti a odlišnost od populací z Číny a Japonska, ale vzhledem k malému počtu vzorků nemohli vyvodit definitivní závěry. Mallez et al. (2015) zkoumali genetickou diverzitu háďátka borového za použití 16 mikrosatelitních lokusů v původních populacích v Severní Americe a v invazivních populacích v Japonsku, Portugalsku a na ostrově Madeira. Dále porovnávali vztahy mezi jednotlivými populacemi z odlišných kontinentů, za účelem určení původního habitatu invazivních populací Evropy. Přesněji se zajímali, jestli do Evropy introdukované populace byly zavlečeny pouze z Amerického kontinentu, nebo zde měly svůj podíl i populace z Asie. V přirozených populacích Ameriky byla prokázána vysoká úroveň variability mezi populacemi. V Evropských populacích byla úroveň polymorfismu velmi nízká, nebo zde žádná variabilita nebyla vůbec pozorována. To naznačuje na početně malou zakládající populaci. Původ invazních populací se nepovedlo uspokojivě prokázat.

Zajímavou metodou zkoumali Wang et al. (2013) genetickou variabilitu entomopatogenní hlístovky *Steinernema monticolum*. Metodou „single-enzyme amplified

fragment lenght polymorphism“ (amplifikace polymorfních úseků DNA po restrikčním štípání jedním enzymem) srovnávali 32 populací. Došli k závěru, že většina variability se nachází uvnitř populací a neshledali korelaci mezi genetickou a geografickou vzdáleností. Avšak použitá metoda není vhodná pro analýzu heterozygotnosti, čímž je nevhodná pro určování genetické struktury populací (Mueller a Wolfenbarger, 1999).

Entomopatogenní hlístovka *Steinernema affine* z hlediska populační genetiky studována ještě nebyla. Rašková (2015) položila důležité základy k práci tohoto typu zavedením mikrosatelitních markerů pro tento druh hlístice. Cílem této práce je provést populační analýzu hlístice *Stenernema affine* s použitím zavedených primerů.

2. Cíle práce

- Pomocí vybraných mikrosatelitních lokusů provést skríning přírodních populací hlístic rodu *Steinernema affine*.
- Na základě získaných dat provést populačně genetickou analýzu daného druhu.

3. Materiál a metody

3.1. Materiál

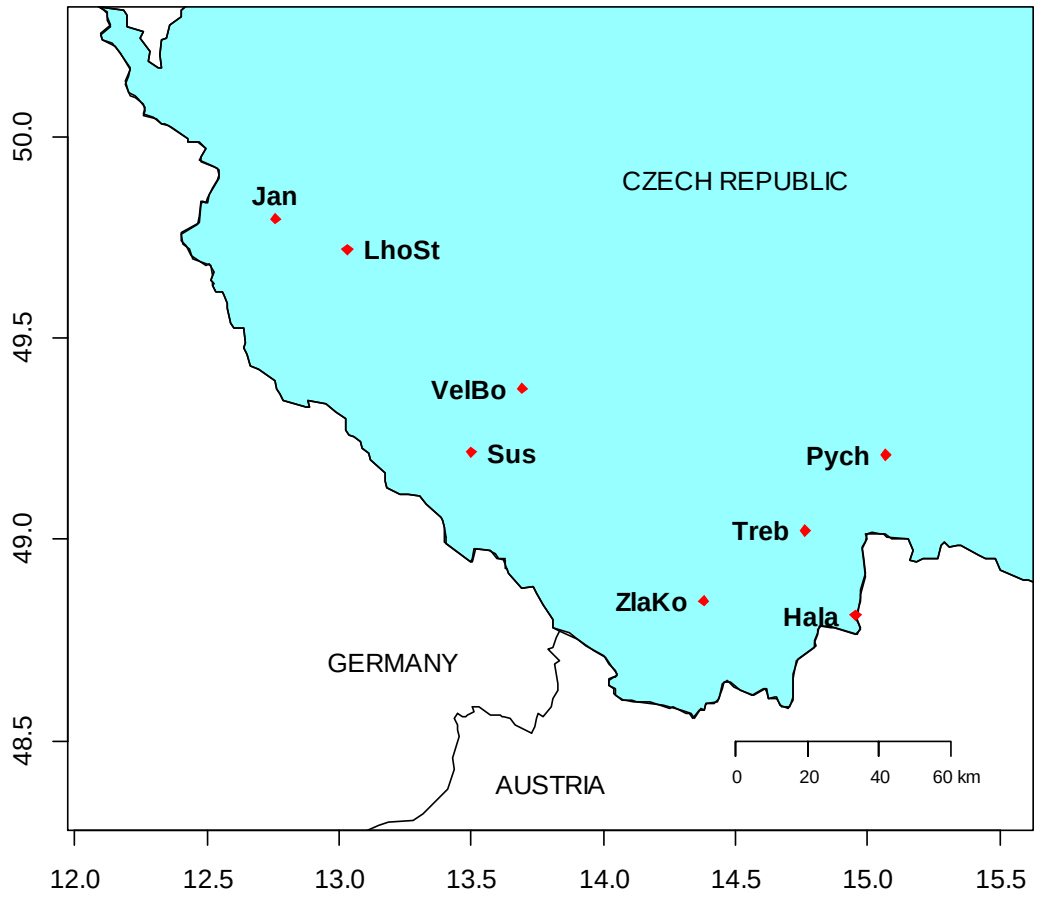
Vzorky byly odebrány v terénu v rámci výzkumu laboratoře entomopatogenních hlístic, ENTÚ, BC CAS, a to RNDr V. Půžou, Ing. J. Nermuťem, Ing. K. Šimáčkovou a Dr. N. Herrerem. V rámci odběru bylo na každé lokalitě provedeno 5 dílčích odběrů zeminy do hloubky 16 cm z oblasti o ploše okolo 100m^2. Těchto pět dílčích odběrů pak bylo smícháno dohromady.

Smíchané vzorky půdy byly rozděleny na poloviny do Petriho misek. Izolace z jedné misky probíhala za laboratorní teploty (kolem 22°C) a u druhé za teploty 15°C. Hlístice byly izolovány za použití techniky „Galleriových pastí“. Tato metoda je založena na nastražení larev zavíječe voskového (*Galleria mellonela*) do vzorků půdy. Hlístice infikují tyto larvy, které do tří dnů hynou a následně jsou pitvány za účelem zjištění počtu a určení dospělých hlístic. Determinaci provedl RNDr. V. Půža.. Z každé populace pak bylo vybráno dle možností zhruba 15 - 30 samic (oproti samcům obsahují větší množství DNA díky své několikrát větší velikosti), které byly dále uchovávány živé, nebo v -20°C do dalšího zpracování.

Hlístice pocházely z přírodních populací z Jižních a Západních Čech. Jména populací s přesnými souřadnicemi a počty vzorků jsou uvedeny v Tabulce 1. Na Obrázku 1 je znázorněna geografická poloha sběrových lokalit jednotlivých populací hlístic *Steinernema affine*. Celkem bylo zpracováno 225 jedinců z osmi populací.

Tabulka 1: Lokality a počty jedinců populací hlístic *Steinernema affine.*

Populace	Zkratka	Počet jedinců	Místo sběru	Nadmořská výška (m. n. m.)	Typ lokality	Souřadnice GPS
1448	Jan	24	Janov	495	Obilné pole	49.796N, 12.761E
1389	LhoSt	31	Lhota u Stříbra	480	Úhor	49.720N, 13.032E
1459	VelBo	32	Velký Bor	470	Úhor	49.375N, 13.692E
1454	Sus	33	Sušice	540	Louka	49.217N, 13.499E
1437	ZlaKo	23	Zlatá Koruna	520	Řepkové pole	48.848N, 14.380E
1351	Treb	16	Třeboň	450	Podmáčená louka	49.022N, 14.764E
1434	Hala	36	Halámky	460	Obilné pole	48.812N, 14.955E
1356	Pych	30	Pýchov	500	Pole obilné	49.210N, 15.069E
Celkem		225				



Obrázek 1: Lokality populací hlístic na mapě ČR. Zkratky populací viz Tabulka 1.

3.2. Extrakce DNA

U každé populace byla DNA extrahována z jednotlivých hlístic, a to standardním protokolem za pomoci extrakčního pufru (Cox a Hebert, 2001). Pufr na jednu zkumavku s jednou hlísticí se skládal ze 17,7 µl dH_2O, 2 µl pufru pro PCR reakci (Top - bio 10x Taq pufr), 0,2 µl 1% Tween a 0,1 µl proteinázy K (100 µg/ml). Vzorky byly promíchány ve vortexu a pak centrifugovány. Po centrifugaci byly vzorky vloženy na 20 minut do mrazáku. Poté byly vzorky vloženy do vodní lázně a inkubovány při teplotě 65 °C na 60 minut. Dále následovala inkubace po dobu 8 minut při teplotě 95 °C. Izolovaná DNA byla po celém procesu uchována v mrazícím zařízení.

3.3. PCR amplifikace

Pro analýzu bylo použito celkem 8 mikrosatelitních markerů, které byly ze souboru primerů dodaného firmou Genoscreen otestovány v předchozí studii (Rašková, 2015). Markerové lokusy byly jak trinukleotidové, tak dinukleotidové. Veškeré detaily ohledně použitých primerů jsou shrnuty v Tabulce 2.

Tabulka 2: Seznam a charakteristika použitých primerů.

Marker	Délka PCR produktu (bp)	Nukleotidová sekvence 5´-> 3´	Sekvence repetice
StDi 1	299	F: TGTTTGTAAGCCTGCACACTG R: CCGTATTGTTTCCGTTCCAA	$(TG)_5$
StDi8	195	F: ATTTTGCGAATCACATCCCT R: CCTCCTGTCTTGAAGTGGCT	$(AG)_8$
StTri1	313	F: CTTCGTTATGTGAGCGCCG R: GGATTTAGGAGGAAACTGAACTGA	$(CTT)_4$
StTri2	193	F: ATGGGTCTGACTTCGATTGG R: CTGTTCGGATCCATTTCACA	$(AGG)_5$
StTri4	183	F: TGTGCTGTGCATGTGTCTCT R: CAGCACATCTGCCTGTTTGT	$(AAG)_5$
StTri7	139	F: TCTATCGCCGTATCTCACCTG R: CAGACGGAGCGAAACTCTTC	$(TTC)_5$
StTri9	107	F: TTCGCCGAGTTATATTTTCCC R: TTCTTCAGCTTTCTGACCGC	$(ACA)_5$
StTri10	100	F: TCGCTCTCGGTTCTTTTCTG R: ACGGAAAAGGGAAGCCAAC	$(CAG)_5$

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

Reakční směs pro PCR byla míchána v 200 ml zkumavkách vždy na ledu. Směs na jeden vzorek obsahovala: 6,75 µl dH_2O, 1,25 µl PCR pufru (10x TopBio Taq Buffer complete), 1 µl DNTPs (Thermo Scientific Fermentas), 0,75 µl Primer Forward, 0,75 µl Primer Reverse, 0,5 µl BSA (Thermo Scientific Fermentas), 0,1 µl UNIS Taq polymeráza (Top-Bio s. r. o.). Celkový objem směsi činil 11,1 µl a poté byl smíchán s 1µl extrahované DNA.

PCR reakce probíhala v přístroji TProfessional TRIO PCR Thermocycler (Biometra Product Line) dle standardního profilu, který zahrnuje 5 fází: predenaturace, denaturace, annealing, elongace a závěrečná elongace. Po dokončení reakce byly produkty uchovávány při nízké teplotě (4 °C). Profily pro reakce k jednotlivým primerům jsou uvedeny v Tabulce 3. Teplota annealingu byla měněna jak při optimalizaci profilů, tak i při PCR reakcích přírodních populací, které se po dřívějších amplifikacích jevily jako špatně namnožené.

Tabulka 3: Profily PCR reakce pro jednotlivé primery.

Primer	Predenaturace		Denaturace		Annealing		Elongace		Závěrečná elongace		Uchovávání	
	Teplota [°C]	Čas [sec]	Teplota [°C]	Čas [sec]	Teplota [°C]	Čas [sec]	Teplota [°C]	Čas [sec]	Teplota [°C]	Čas [sec]	Teplota [°C]	Čas [sec]
StDi1	94	120	94	30	53,55,57,59	45	72	60	72	120	4	∞
StDi8	94	120	94	30	53,55,57	45	72	60	72	120	4	∞
StTri1	94	120	94	30	53,55	45	72	60	72	120	4	∞
StTri2	94	120	94	30	53,55,57	45	72	60	72	120	4	∞
StTri4	94	120	94	30	51,55,61	45	72	60	72	120	4	∞
StTri7	94	120	94	30	55,57,59	45	72	60	72	120	4	∞
StTri9	94	120	94	30	53, 57,59	45	72	60	72	120	4	∞
StTri10	94	120	94	30	53,55,59	45	72	60	72	120	4	∞

Pozn.: Fáze Denaturace, Annealing a Elongace se po sobě opakovaly 35x.

3.4. Gelová elektroforéza

Po každé amplifikační reakci byla provedena separace DNA fragmentů gelovou elektroforézou, a to pro ověření správného průběhu PCR a výsledného množství DNA v reakci. Pokud byly v agarózovém gelu viditelné proužky, pak byla provedena vertikální elektroforéza v nativním akrylamidovém gelu pro přesnější separaci a určení velikosti fragmentů.

3.4.1. Agarózový gel

Elektroforéza probíhala v 3 % agarózovém gelu. Gel byl připraven ve skleněné nádobě, kam se navážilo 6 gramů agarózy (SERVA Agarose) a doplnilo se k rysce 200 ml TAE pufrem (40 mM TRIS - Acetate, 1 mM EDTA, pH = 8). Celá směs byla zahřívána v mikrovlnné troubě. Po ohřátí byla nádoba chlazena za neustálého míchání pod proudem studené vody, dokud teplota roztoku neklesla na zhruba 45 °C. Do ochlazené směsi bylo přidáno 15 µl ethidium bromidu (0,5 µl/µg). Gel byl nalit do předem připravené vany, hřebínky byly přidány pro tvorbu jamek na vzorky. Celá vana byla skryta před světlem a hodinu se nechal gel ztuhnout. Ztuhlý gel byl rozřezán podle potřeby, rovnou použit anebo uložen do ledničky v 1x TAE pufru.

Do jamek gelu byly nanášeny 3 µl vzorku smíchané s 4 µl nanášecího pufru (70 % dH_2O, 30 % glycerol, špetka bromfenolové modři). Elektroforéza byla spuštěna po dobu 30 - 45 minut pod napětím 125 V. Velikost fragmentů byla odhadována pomocí komerčního velikostního standardu (GeneRuler^{TM} 50 bp DNA Ladder, Fermentas). Vzorky v gelu byly zviditelněny pod UV světlem v transiluminátoru (UVP Transiluminator). Obraz byl zachycen digitální kamerou.

3.4.2. Vertikální polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE)

Agarózový gel nebyl pro naše účely dostatečně přesný při separaci PCR produktů. Z tohoto důvodu byl použit gel polyakrylamidový, ve kterém probíhá separace mnohem přesněji. Elektroforéza byla prováděna na přístroji „Cleaver Scientific oniPAGE Maxi, VS20D“ a to pro každý marker zvlášť.

Elektroforetická separace probíhala na 7 % polyakrylamidových gelech o rozměrech 15 x 15 cm. Gel byl stvořen z 35,4 ml dH_2O; 11,7 ml 30 % akrylamidu; 2,5 ml 10x TBE pufru(45 mM Tris - borate, 0,5 mM EDTA, pH = 8); 350 µl 10 % APS (persulfát amonný); 50 µl TEMED. TEMED se přidával do celého roztoku až po utěsnění spodní hrany skel koncentrovanějším gelem. Celý roztok ,ještě před tím než byl přidán TEMED, byl odvzdušněn za podtlaku v exsikátoru po dobu 20 minut. Odvzdušnění zbavuje gel molekul kyslíku, které brání rovnoměrné polymerizaci gelu.

Pro utěsnění dolní hrany skel byl namíchán koncentrovanější gel tzv. „zátka“. Tento gel se skládal z 1,75 ml roztoku smíchaných přísad na polyakrylamidový gel (vyjma 50 µl TEMEDu), 17,5 µl 10% APS a 17,5 µl TEMEdu. Tento koncentrovaný gel tuhne rychleji a tím zabrání unikání roztoku ještě před tím, než se zpolymerizuje.

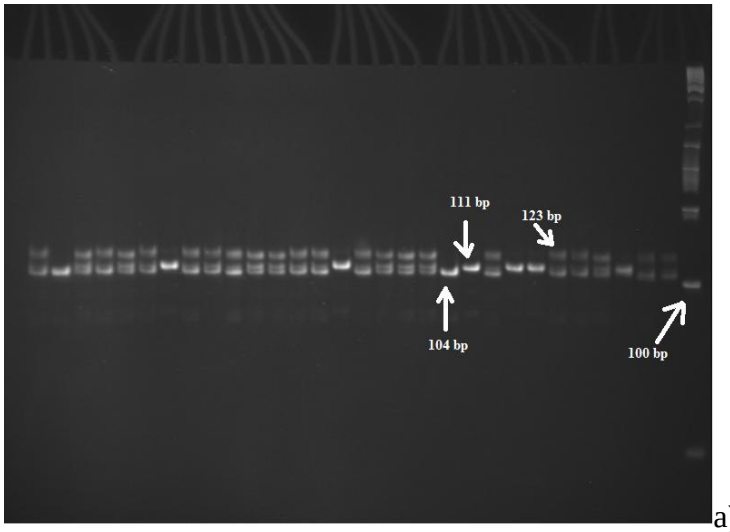
Po utvoření „zátky“ bylo do původního roztoku přidáno 50 µl TEMEDu. Celý roztok byl promíchán a nalit mezi připravená skla. Po nalití byly mezi skla umístěny hřebeny pro vytvoření jamek na nanášení vzorků. Gel byl ponechán 45 minut ke zpolymerizování.

Mezitím bylo do elektroforetické vany nalito 6 l 0,5x TBE pufru. Po ztuhnutí gelu byly vyndány hřebeny, gel vložen do elektroforézy a do utvořených jamek bylo nanášeno 4 µl vzorku s 4µl nanášecího pufru (Cresol red). K určování velikostí DNA byl na gel nanesen velikostní standard GeneRuler^{TM} 50 bp DNA Ladder Frementas.

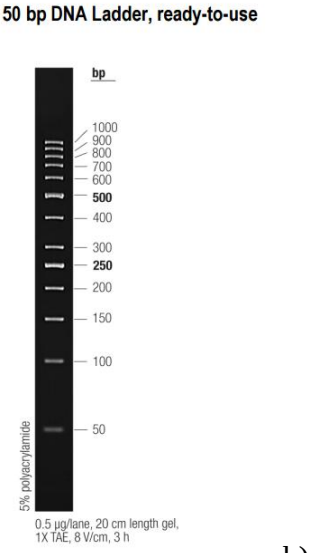
Elektroforéza probíhala při napětí 180 V po dobu 170 minut.

Po dokončení elektroforézy byla celá aparatura rozebrána a gely umístěny k obarvení do lázně sestávající z 0,5x TBE pufru s ethidium bromidem o celkové koncentraci 1mg/ml. Lázeň s gely byla promíchávána na třepačce po dobu 15 minut. Po obarvení byly vzorky v gelu zviditelněny v UV transiluminátoru (UVP Transiliminator) a digitální kamerou pořízeny fotografie gelů.

Na Obrázku 2a, b je polyakrylamidový gel pod UV světlem s již separovanými vzorky (velikosti alel popsány šipkami) a detaily použitého velikostního standardu GeneRuler^{TM} 50bp DNA Ladder, Fermentas.



a)



b)

Obrázek 2a, b: Polyakrylamidový gel se vzorky z populace Pýchov, lokus StTri9 a použitý velikostní standard GeneRuler^{TM} 50bp Ladder.

3.5. Analýza dat

Z fotografií polyakrylamidových gelů byly odečteny velikosti separovaných fragmentů, tj. provedena genotypizace jedinců. Tyto údaje byly zaznamenány do tabulky v programu Microsoft Excel ve formátu požadovaném pro další vyhodnocování v programu GenAlEx 6.501 (Peakall a Smouse 2006, 2012). Data byla zaznamenávána jako čísla označující velikosti amplifikovaných alel. Podle potřeby pak byla data transformována do jiných formátů pro ostatní výpočetní software.

V programu GenAlEx 6.501 (Peakall a Smouse 2006, 2012) byly spočteny základní parametry variability populací, jakými jsou pozorovaná heterozygotnost (H_O), očekávaná heterozygotnost (H_E), efektivní počet alel (N_E). Dále byly spočteny fixační indexy pro jednotlivé populace (F_{IS}) a pro populace mezi sebou (F_{ST}), genetická vzdálenost populací podle Neiho (Nei, 1972) a geografická vzdálenost mezi jednotlivými populacemi (km).

Multilokusové genotypy vznikají kombinací všech použitých mikrosatelitních lokusů u každého jedince. K určení jejich počtu byl použit program R společně s balíčkem popr (Kamvar et al., 2016; Kamvar et al., 2014).

Míra vzájemné vzdálenosti dvou populací často ovlivňuje jejich společnou genetickou diferenciaci, tato korelace se naýzvá „Isolation by distance“. Pro testování zda tato korelace mezi našimi populacemi existuje, byl použit Mantelův test v programu GenAlEx (Peakall a Smouse 2006, 2012), který porovnává matice párových genetických vzdáleností a matice geografických vzdáleností populací.

Vypočtená genetická vzdálenost (Nei, 1972) byla použita pro analýzu hlavních komponent Principal coordinate analysis (PCoA). Tato metoda je založena na vytvoření grafu o dvou osách. Do tohoto grafu jsou pak vyznačeny body, jejichž vzájemné vzdálenosti jsou odvozeny podle umístění na škále os (Chae et al., 2006). Výsledný obraz pomáhá orientovat se v datech a rychle určit podobnost souborů dat charakterizovaných mnoha neznámými.

V místech vazby primerů může docházet k mutacím, což vede buď k neúspěšným amplifikacím některých alel a tím pádem se heterozygot jeví jako homozygot na separačním gelu, nebo nedojde k tvorbě produktu vůbec, což se pak označuje, jako dvojitý nulový homozygot. Následkem těchto mutací mohou být pozorovány odchylky od Hardy - Weinbergovy rovnováhy, a to především výrazným poklesem frekvence heterozygotů.

Alely vzniklé na základě těchto mutací se nazývají nulové alely a pro jejich zjištění v populacích byl použit program MICRO-CHECKER 2.2.3. (van Oosterhout et al., 2004).

K výpočtu Hardy-Weinbergovy rovnováhy, přesněji k zjištění nadbytku a nedostatku heterozygotů v populacích, a také vazebné nerovnováhy mezi lokusy, byl použit program Genepop 4.2. (Rousett, 2008). Pro výsledné hodnoty vazebné nerovnováhy byla spočtena Bonferroniho korekce. Tato korekce upravuje hodnoty signifikance při několikanásobných porovnávacích testech, aby se předešlo chyby prvního typu (zamítnutí nulové hypotézy i přes její pravdivost) (Armstrong, 2014).

Pravděpodobnost nedávné redukce efektivní velikosti populací byla vypočtena za užití programu Bottleneck 1.2.02 (Piry et al., 1997). Výpočet byl proveden Wilcoxonovým testem za dvoufázového mutačního modelu. Parametry byly zvoleny dle doporučení autorů programu následovně: Variance = 10 a 90% podíl SMM (Step-wise Mutation Model) k TPM (Two-phase Model).

Pro analýzu variability uvnitř a mezi populacemi byla užita analýza molekulární variance (AMOVA) spočítaná v programu Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier a Lischer, 2010). Tento program na rozdíl od jiných softwarů umožňuje snadnou manipulaci s populacemi při jejich rozdělování do skupin.

Pro provedení shlukové analýzy a následného vytvoření dendogramu populací na základě genetické distance (Nei, 1972) byl použit program Populations 1.2.31 software (Langella, 1999). Výsledný dendogram byl znázorněn v programu MEGA (Tamura et al., 2013).

Populační struktura byla analyzována v programu STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard et al., 2000), umožňujícím rozdělení celkového souboru do skupin (shluků) geneticky nejbližších jedinců Bayesovským postupem. Během analýzy byly použity 4 modely, v nichž jsou kombinované možné demografické scénáře - tedy zda jde o populace smíšené (admixture/nonadmixture) a zda jsou alely v korelaci (correlated/independent). Parametry byly stanoveny následovně: iterace = 10, burn - in period = 50000 a MCM = 100000 (Markovovův řetězec pro Monte Carlo). Pro výsledné hodnocení proběhlých simulací a stanovení nejpravděpodobnější hodnoty K (počet shluků populací) byl použit internetový program STRUCTURE HARVESTER (Earl a vonHoldt, 2012).

4. Výsledky

4.1. Statistická analýza dat

Z polyakrylamidových gelů byly odečteny velikosti produktů polymerázové řetězové reakce. Velikosti vzorků byly zaznamenány do programu GenAlEx (Peakall a Smouse 2006, 2012) jako hodnoty, které udávaly velikost alel. Z tohoto souboru byly vytvořeny data ve formátu pro další programy. Celkem bylo analyzováno 225 jedinců z osmi populací.

4.1.1 Variabilita lokusů

Tabulka 4 shrnuje základní charakteristiky variability pro každý lokus napříč populacemi. Tři lokusy se prokázaly jako monomorfní u tří populací. Největší počet alel (5) bylo nalezeno u lokusu *StTri9*. U lokusů *StDi1* a *StTri2* byly prokázány 3 alely. U zbytku lokusů byly prokázány alely pouze 2. Kromě lokusu *StTri7* je u všech zbývajících pozorovaná heterozygotnost menší než očekávaná.

Tabulka 4: Základní parametry variability použitých mikrosatelitních lokusů.

Lokus	Počet alel	H_O	H_E	F_{ST}	Monomorfní lokus
StDi1	3	0.099	0.380	0.332	
StDi8	2	0.144	0.201	0.061	Jan
StTri1	2	0.156	0.370	0.043	
StTri2	3	0.198	0.476	0.207	
StTri4	2	0.173	0.191	0.030	LhoSt
StTri7	2	0.289	0.231	0.066	
StTri9	5	0.481	0.512	0.133	
StTri10	2	0.078	0.197	0.440	Hala

Pozn.: H_O - pozorovaná heterozygotnost, H_E - předpokládaná heterozygotnost, F_{ST} - index genetické diferenciace.

Frekvence četnosti alel jednotlivých lokusů jsou znázorněny na grafech v příloze (Příloha 2). Několik lokusů vykazovalo silný nadbytek jednoho typu alely oproti ostatním. Tyto lokusy byly *StDi8*, *StTri7*, *StTri4* a *StTri1*.

Na základě nadbytku homozygotů byla pomocí programu Mikrochecker 2.3.3 (van Oosterhout, 2006) odhadnuta přítomnost nulových alel napříč všemi populacemi. Nulové alely se vyskytly alespoň na jednom lokusu ve všech populacích kromě populace ze Třeboně. Jediný lokus bez nulových alel byl lokus *StTri7*. Detaily, u kterých lokusů a u jakých populací se vyskytovaly nulové alely, jsou uvedené v Tabulce 5.

Tabulka 5: Výskyt nulových alel u lokusů napříč populacemi. Zkratky jednotlivých populací viz Tabulka 1.

	LhoSt	ZlaKo	VelBo	Jan	Sus	Hala	Treb	Pych
StDi1	x	x		x	x	x		x
StDi8								
StTri1	x	x	x	x	x			
StTri2	x	x	x		x	x		x
StTri4					x			
StTri7								
StTri9				x				
StTri10			x	x	x			

Ke zjištění nezávislosti lokusů (Linkage disequilibrium) byl proveden párový test na vazebnou nerovnováhu. Test byl proveden v programu GenPop. Z 28 porovnání vyšly pouze tři páry signifikantní. Pak byla provedena Bonferroniho korekce, po které byly signifikantní dva páry lokusů. Tyto lokusy byly *StDi1 x StTri1*, *StTri1 x StTri2*. Přesné výsledky testu jsou uvedeny v Příloze 1.

4.1.2 Variabilita populací

Charakteristiky populací jsou shrnuty v Tabulce 6. Ze všech 225 jedinců bylo detekováno 171 různých genotypů, z toho 136 se vyskytlo pouze jednou. Pozorovaná heterozygotnost byla u všech populací menší, než očekávaná. Nejmenší pozorovaná heterozygotnost byla u populace Zlatá Koruna, zatímco nejvyšší byla u populace Halámky. Možný vliv snížené velikosti populací, neboli bottleneck, byl pozorován pouze u dvou populací (Halámky, Janov).

Tabulka 6: Parametry pro charakteristiku jednotlivých populací. Zkratky jednotlivých populací viz Tabulka 1.

Populace	*N*	*MLGs*	N_E	H_O	H_E	F_{IS}	*HWE p deficit*	*HWE p excess*	*Bottleneck p*
Jan	24	21	1.702	0.185	0.356	0.364	*	ns	0.02344*
LhoSt	31	22	1.500	0.163	0.264	0.357	*	ns	0,53125
VelBo	32	27	1.770	0.279	0.384	0.237	*	ns	0.07422
Sus	33	20	1.357	0.112	0.251	0.513	*	ns	0.74219
ZlaKo	23	16	1.381	0.087	0.237	0.366	*	ns	0.38281
Treb	16	16	1.623	0.188	0.346	0.449	*	ns	0.94531
Hala	36	33	1.757	0.346	0.376	0.040	*	ns	0.01563*
Pych	30	29	1.690	0.259	0.344	0.143	*	ns	0.94531

Pozn.: ns - $p>0.05$; * - $p<0.05$; *N* - počet jedinců; *MLGs* - Počet multilokusových genotypů; N_E - efektivní počet alel na populaci; H_O - pozorovaná heterozygotnost; H_E - očekávaná heterozygotnost; F_{IS} - fixační index; *Bottleneck p* - hladina významnosti pro Wilcoxonův test; *HWE P excess* - hladina významnosti pro nadbytek heterozygotů; *HWE p deficit* - hladina významnosti pro nedostatek heterozygotů.

V Tabulce 7 jsou vypsány typy a počty multilokusových genotypů, které se vyskytovaly v populacích více než jednou.

Tabulka 7: Multilokusové genotypy (*MLG*) a jejich distribuce mezi populacemi. Zkratky jednotlivých populací viz Tabulka 1.

Genotyp	Počet jedinců celkem	Počet jedinců daného *MLG* v populaci							
		Jan	LhoSt	VelBo	Sus	ZlaKo	Treb	Hala	Pych
3	2		1			1			
53	8		4		1		1	1	1
55	8	3				5			
68	3		2						
70	2		1					1	
72	4		2		1			1	1
80	3		1			2			
87	2	1					1		
157	3					1		2	

4.1.3 Genetická variabilita mezi populacemi

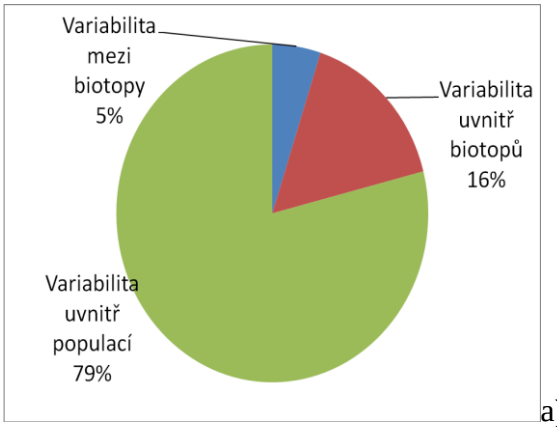
V programu Arlequin 3.5.2.2 byla vypočítána Analýza Molekulární Variance (AMOVA). Tato metoda zjišťuje podíl variability mezi jednotlivými úrovněmi populační struktury hlístic. Populace byly rozděleny do skupin podle nadmořské výšky, biotopu a geografické vzdálenosti. V Tabulce 8 je způsob rozdělení populací do skupin použitých k analýze. AMOVA byla pak provedena na těchto rozděleních. Rozdělení podle geografické vzdálenosti prokázalo nulovou variabilitu mezi skupinami. Ani jeden způsob rozdělení populací se nakonec neprojevil jako signifikantní. V Tabulce 9 je způsob rozdělení populací do skupin použitých k analýze. Grafické znázornění výsledků je zobrazeno na Obrázku 3a, b, c.

Tabulka 8: Výsledky testu AMOVA se skupinami rozdělenými podle biotopu.

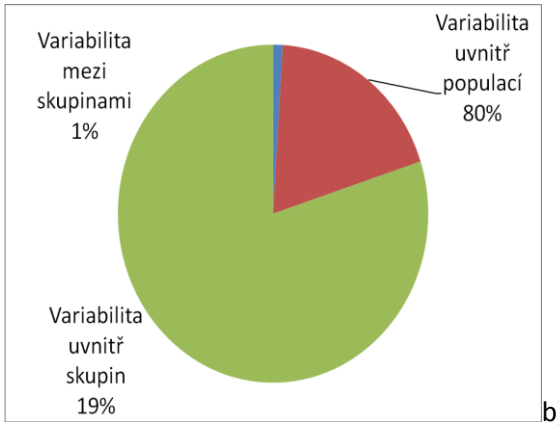
Způsob rozdělení	Zdroj variance	Suma čtverců	Variance (%)	F - statistiky	*p* - hodnota
Biotop	Mezi skupinami	55.202	5	0.211	0.148
	Uvnitř skupin	79.624	16	0.173	<0.001
	Uvnitř populací	569.59	79	0.046	<0.001
Nadmořská výška	Mezi skupinami	22.093	1	0.006	0.358
	Uvnitř skupin	112.733	19	0.198	<0.001
	Uvnitř populací	569.59	80	0.203	<0.001
Geografická poloha	Mezi skupinami	32.965	0	0.024	0.691
	Uvnitř skupin	101.861	20	0.214	<0.001
	Uvnitř populací	569.59	80	0.195	<0.001

Tabulka 9: Rozdělení populací do skupin pro test AMOVA.

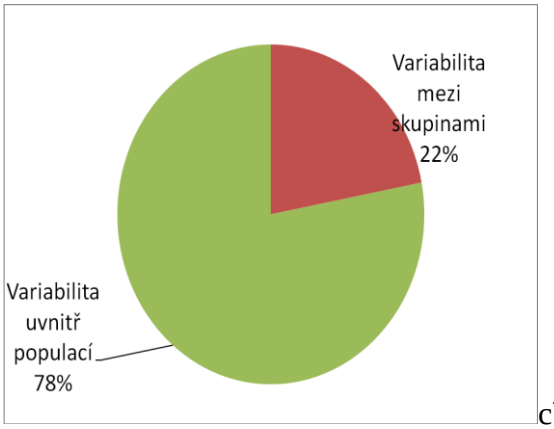
Rozdělení	Skupiny	Populace
Biotop	Pole	Zlatá Koruna, Janov, Halámky, Týchov
	Louka	Velký Bor, Lhota u Stříbra
	Úhor	Třeboň, Sušice
Nadmořská výška	Pod 500 m	Lhota u Stříbra, Velký Bor, Halámky, Třeboň, Janov
	Nad 500m	Týchov, Zlatá koruna, Sušice
Geografická poloha	Skupina 1	Janov, Lhota u Stříbra
	Skupina 2	Velký Bor, Sušice
	Skupina 3	Třeboň, Zlatá Koruna, Halámky, Týchov



a)



b)



c)

Obrázek 3: Graf rozdělení variability uvnitř populací, uvnitř skupin a mezi skupinami. Populace bylyrozděleny podle: a) biotopu, b) nadmořské výšky, c) geografické polohy.

Variabilitu mezi populacemi je také možné vyjádřit párovými fixačními indexy F_{ST} (Wrightovy F - statistiky) (Weir a Cockerham, 1984). K výpočtu těchto hodnot bylo využito programu GenAlEx (Peakall a Smouse 2006, 2012) a jsou vypsány v Tabulce 10. Pod diagonálou jsou hodnoty F_{ST} a nad diagonálou hodnoty signifikance P (pravděpodobnost je založena na 999 permutacích).

Tabulka 10: Párové hodnoty F_{ST} s hodnotami signifikance nad diagonálou. Zkratky jednotlivých populací viz Tabulka 1.

	Jan	LhoSt	VelBo	Sus	ZlaKo	Treb	Hala	Pych
Jan	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
LhoSt	0.236	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
VelBo	0.162	0.179	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Sus	0.251	0.237	0.319	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001
ZlaKo	0.19	0.095	0.251	0.162	0.000	0.001	0.001	0.001
Treb	0.126	0.213	0.279	0.121	0.172	0.000	0.003	0.001
Hala	0.192	0.162	0.268	0.082	0.169	0.046	0.000	0.001
Pych	0.177	0.112	0.229	0.142	0.113	0.136	0.094	0.000

Pozn.: Nejvyšší hodnota F_{ST} byla u páru Sušice x Velký Bor (0,319). Nejmenší hodnota F_{ST} byla u páru Halámky x Třeboň (0,046). Všechna srovnání jsou signifikantní.

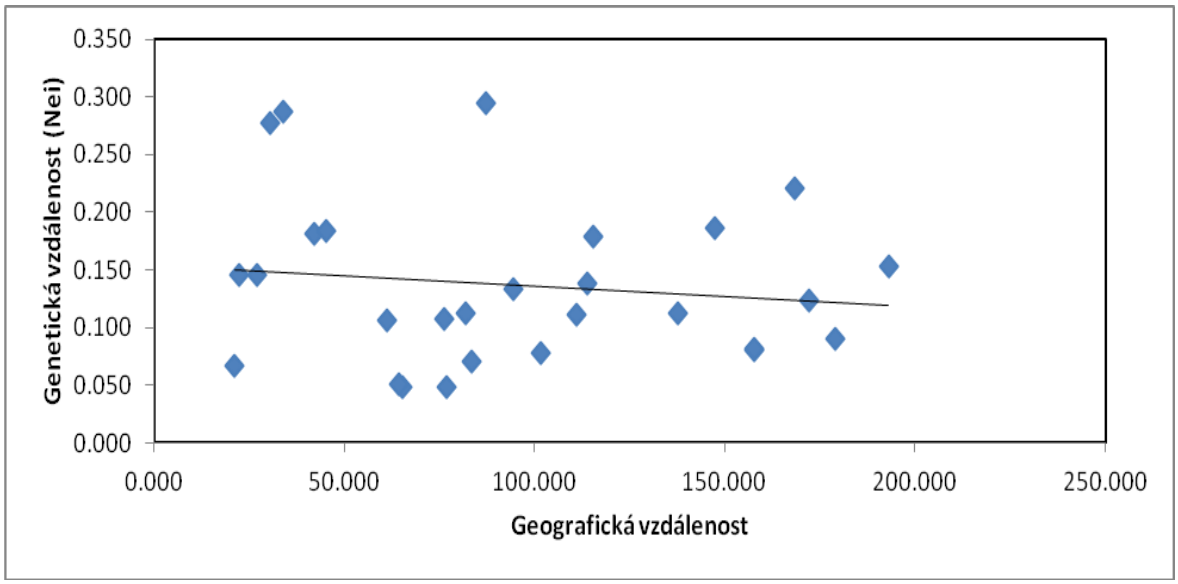
Dále byly vypočítány párové genetické vzdálenosti podle Neiho (Nei, 1972). Tyto vzdálenosti jsou lepším parametrem než párové fixační indexy F_{ST} k přesnému sestrojování dendrogramů z mikrosatelitních dat (Takezaki a Nei, 2007). Genetické vzdálenosti a F_{ST} byly porovnány Mantelovým testem, a protože zde vyšla pozitivní korelace (p = 0,01), pak bylo možné učinit jejich záměnu. V následující Tabulce 11 je matice genetických vzdáleností podle Neiho (Nei, 1972) pod diagonálou a nad diagonálou jsou vypsané geografické vzdálenosti mezi populacemi.

Tabulka 11: Matice genetických vzdáleností podle Neiho (Nei, 1972) a geografických vzdáleností (v km). Zkratky jednotlivých populací viz Tabulka 1.

	Jan	LhoSt	VelBo	Sus	ZlaKo	Treb	Hala	Pych
Jan	0.000	21.252	81.859	83.589	157.714	168.505	193.037	178.910
LhoSt	0.178	0.000	61.150	65.311	137.654	147.413	172.172	157.689
VelBo	0.146	0.133	0.000	22.432	77.034	87.160	111.194	101.493
Sus	0.183	0.139	0.277	0.000	76.173	94.524	115.288	114.010
ZlaKo	0.123	0.049	0.187	0.082	0.000	34.092	42.275	64.431
Treb	0.111	0.145	0.294	0.078	0.106	0.000	27.227	30.535
Hala	0.182	0.108	0.288	0.051	0.112	0.048	0.000	45.105
Pych	0.153	0.071	0.221	0.091	0.067	0.112	0.080	0.000

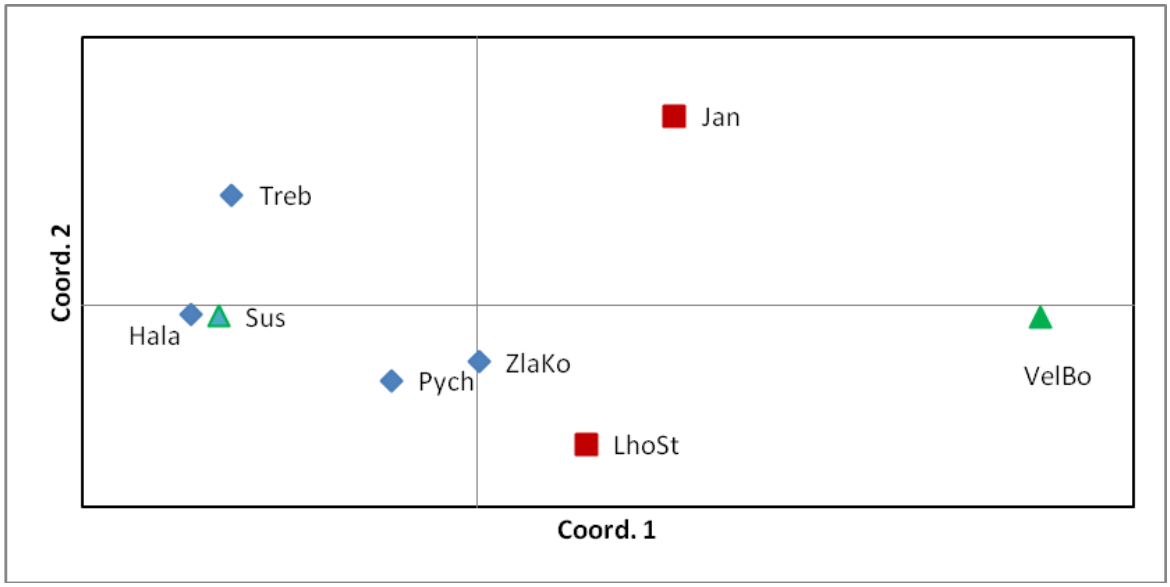
Pozn.:Geografické vzdálenosti jsou nad diagonálou. Genetické vzdálenosti jsou pod diagonálou.

Mantelovým testem byla testována korelace mezi genetickou a geografickou vzdáleností. Test vyšel nesignifikantní p = 0,19. Na Obrázku 4 je výsledný graf testu pro izolaci vzdáleností.



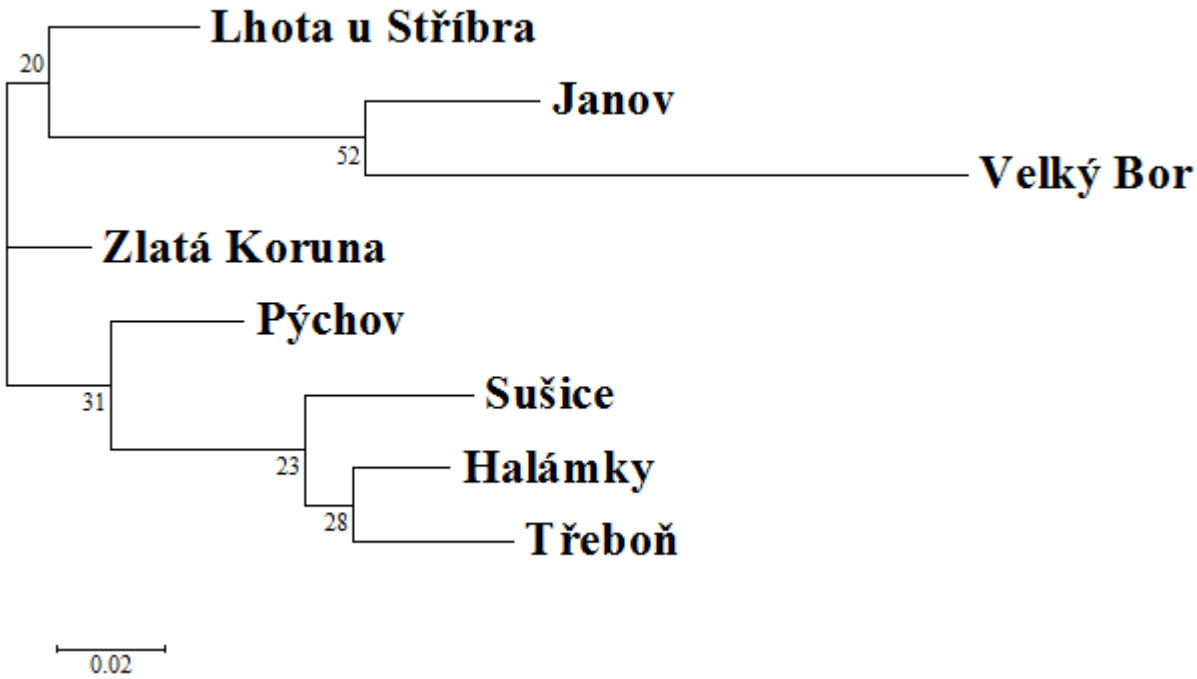
Obrázek 4: Graf korelace geografických (v km) a genetických (Nei, 1972) vzdáleností.

Výsledek testu PCoA s použitím Neiho genetických vzdáleností (Nei, 1972) je zobrazen na Obrázku 5. První osa (coordinate 1) vysvětluje 46,84% z celkové variability a druhá osa (coordinate 2) vysvětluje 23,59%. Dohromady tyto osy vysvětlují 70,43% variability. Ačkoliv populace vytvářejí náznaky shluků, je jasné, že tato uskupení nejsou založena na sdíleném biotopu, nadmořské výšce, nebo geografické vzdálenosti. Nejblíže jsou populace Sušice a Halámky, ale jde o populace vzdálené 115 km a obývají odlišný biotop (Sušice - louka, Halámky - pole).



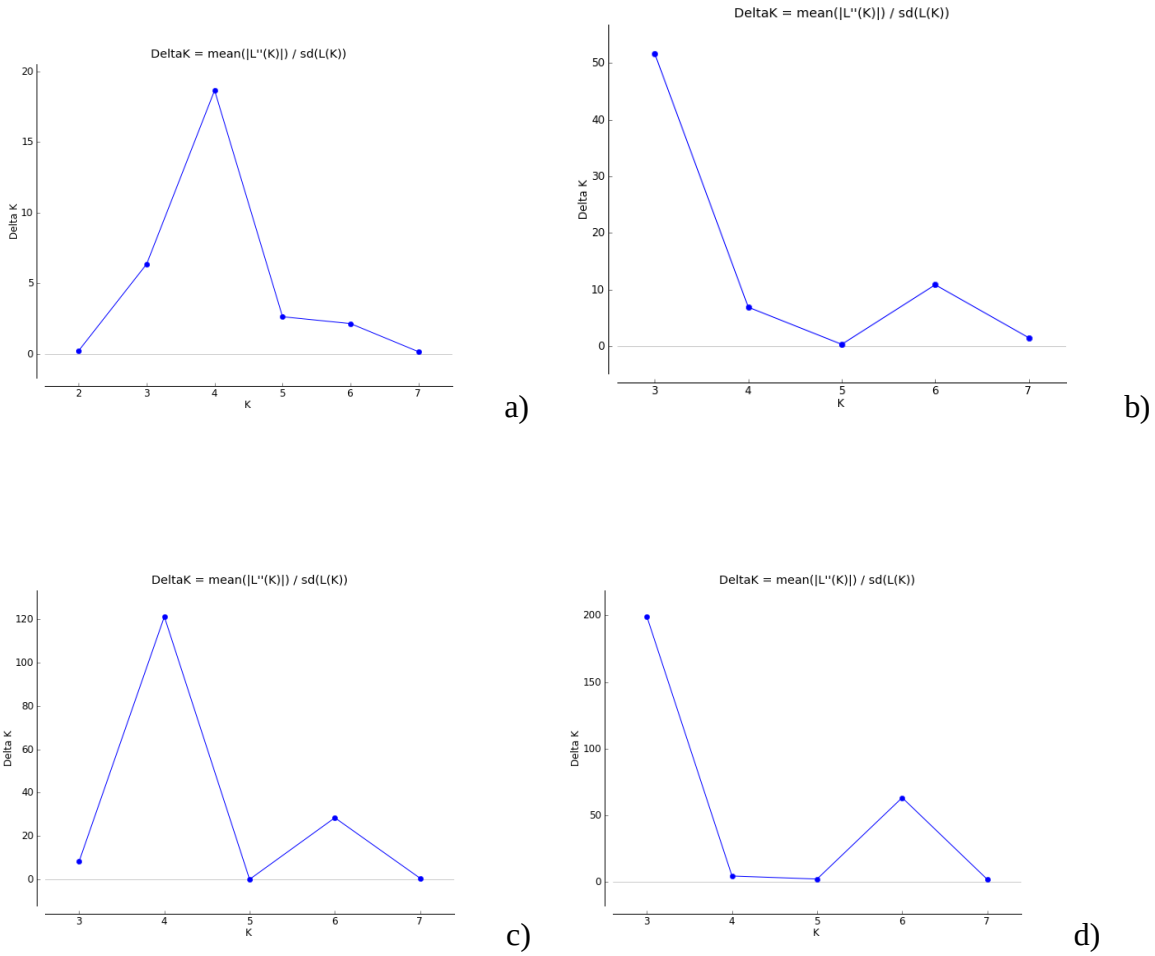
Obrázek 5: Příbuznost populací zpřehledněna metodou PCoA. Zkratky jednotlivých populací viz Tabulka 1. (Populace stejné značky jsou si blízké geograficky)

Na základě genetických distancí (Nei, 1972) mezi populacemi byla provedena shluková analýza a vytvořen dendogram algoritmem NJ (Neighbour - joining). Dendogram na Obrázku 6 opět shlukuje populace v rozporu s geografickou vzdáleností a podpora jednotlivých větví je velmi nízká.

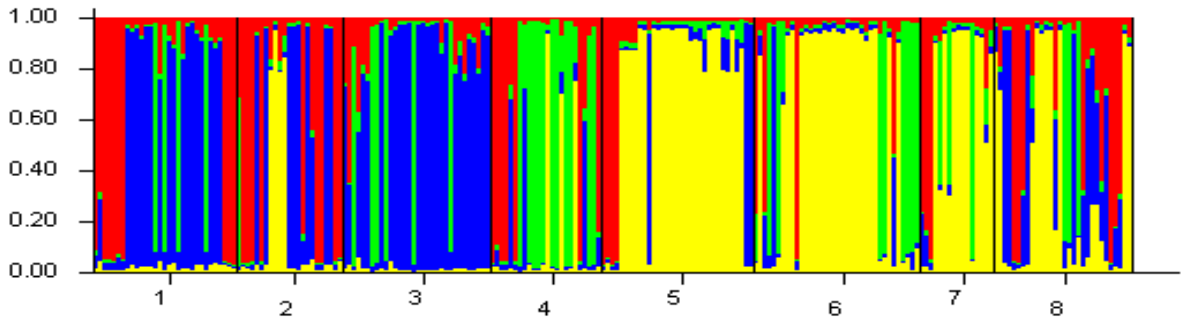


Obrázek 6: NJ dendrogram přírodních populací *Steinernema affine*. Podpora jednotlivých větví byla stanovena bootstrapem (1000 opakování).

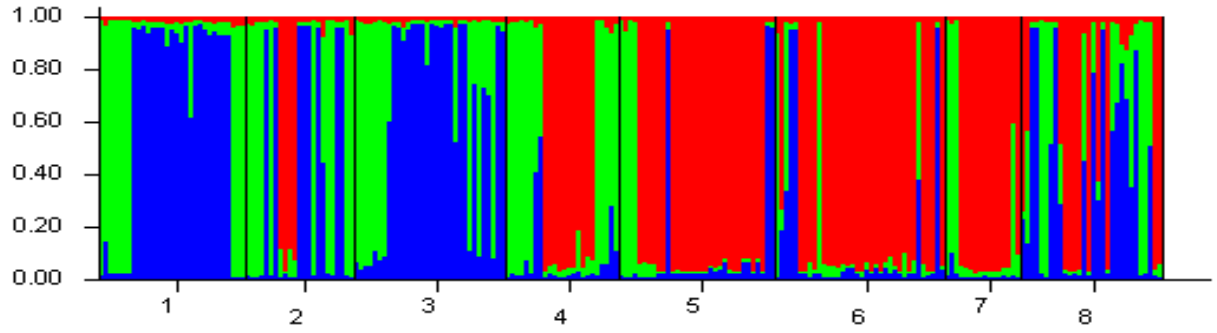
Za pomocí programů STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) a STRUCTURE HARVESTER (Earl a vonHoldt, 2012) byly vypočteny hodnoty ΔK, které určují pravděpodobný počet shluků populací na základě 4 modelů. Pro 1. model admixture - correlated bylo K = 4, pro 2. admixture - independent bylo K = 3, pro 3. model nonadmixture - correlated vyšlo K = 4 a u 4. modelu nonadmixture - independent vyšel výsledek K = 3. Grafické znázornění výsledků modelu pomocí grafů je na Obrázcích 7 a, b, c, d. Čárové grafy znázorňují příslušnost jednotlivců ke genetickým skupinám na Obrázcích 8a, b, c, d.



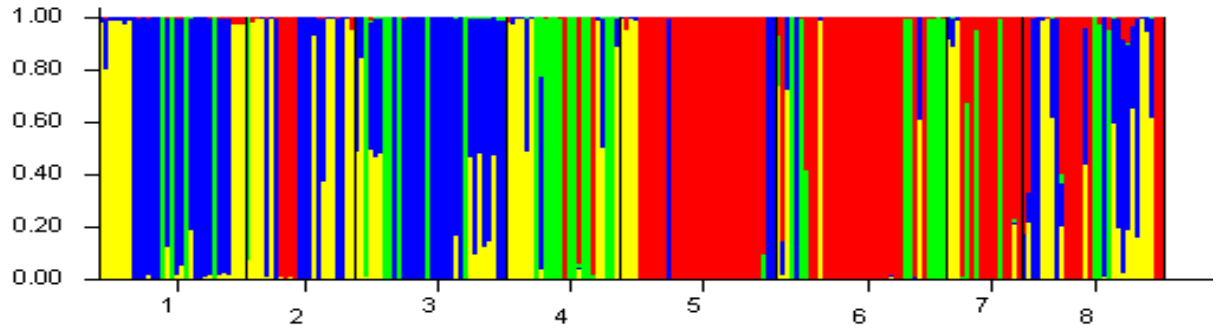
Obrázek 7: grafické znázornění teoretických počtu shluků populací podle jednotlivých modelů a) admixture-correlated, b) admixture-independent, c) nonadmixture-correlated, d) nonadmixture-independent.



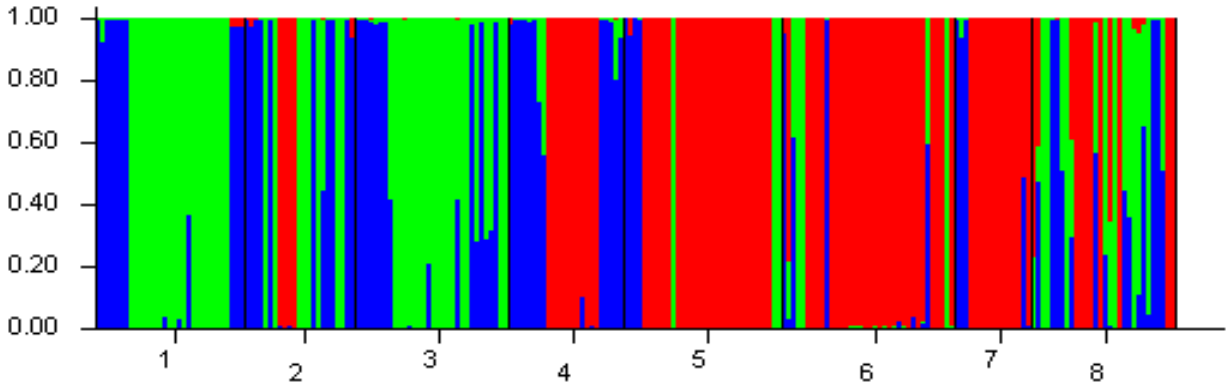
a) Admixture - correlated (K = 4)



b) Admixture - independent (K = 3)



c) Nonadmixture - correlated (K = 4)



d) Nonadmixture - independent (K =3)

Obrázek 8: Příslušnost jedinců do genetických shluků.

Pozn.: Populace jsou označeny číslicemi na ose x, 1 - Lhota u Stříbra, 2 - Zlatá Koruna, 3 - Velký Bor, 4 - Janov, 5 - Sušice, 6 - Halámky, 7 - Třeboň, 8 - Býchov)

5. Diskuze

Jelikož nebyla dosud provedena žádná populačně genetická analýza entomopatogenních hlístovek *Steinernema affine*, je možné pouze srovnání s prací M. Raškové (2015), která se soustředila na zavedení mikrosatelitní genotypizace na hlístovkách z laboratorních chovů. U těchto chovů je velká pravděpodobnost snížené genetické variability díky genetickému driftu, nebo silného inbrídingu a s ním zvýšený výskyt homozygotů. Při porovnání s příbuznými druhy je nutné zohlednit odlišnou ekologii, resp. způsob života, který může ovlivnit pohyblivost v prostředí a tím i genový tok mezi populacemi.

5.1. Analýza lokusů

Počet alel se pohyboval od 2 až po 5, zatímco v laboratorních chovech od 2 do 4 alel, což je velmi podobné. Pozorovaná heterozygotnost až na lokus *Strti7* nepřekročila heterozygotnost očekávanou. Nejnižší hodnota pozorované heterosigosity činila 0,078, nejvyšší 0,481. Heterozygotnost u populací z laboratorního chovu se pohybovala v rozmezí 0,017 - 0,542, byla tedy v podstatě podobná. Monomorfní lokusy se našly pouze 3. Při populační analýze hlístovek z chovů (Rašková, 2015) bylo objeveno více monomorfních lokusů (5).

Párový test na vazebnou nerovnováhu vyšel signifikantní jen u dvou lokusů. Vzhledem k tomu, že se jedná o tak malé číslo z celkového počtu srovnání, je minimální šance, že by mohlo dojít k zkreslení analýzy dat.

Nulové alely byly nalezeny u 6 z osmi lokusů. Stejné množství lokusů s výskytem nulových alel bylo i v analýze hlístovek z chovů (Rašková, 2015). Test na nulové alely nevyloučil zachování Hardyho - Weinbergovo rovnováhy v jednotlivých populacích, a proto nebylo nutné dané lokusy, či jedince vyloučit. Ačkoliv nulové alely vznikají mutací, mohlo dojít i k technickým problémům jakými jsou například slabá amplifikace kvůli neodhalené přítomnosti inhibitorů, malé množství templátové DNA, nebo její degradace. „Dvojitých nulových“ homozygotů bylo 20 ze všech 225 jedinců a 8 markerů, což je 1800 homozygotů, nebo heterozygotů. Počet „nulových“ homozygotů se rovná 1 % celkového počtu. Zda - li se jedná skutečně o nulové alely by mohlo objasnit zaklonování těchto vzorků a jejich následné osekvenování. Obvykle se lokusy s nulovými alelami vyřazují z

analýz, ale Carlsson (2008) prokázal, že i větší míra mikrosatelitních nulových alel nezkresluje signifikantně statistickou analýzu.

5.2. Analýza populací

U všech populací vyšel deficit heterozygotů signifikantní. Pouze u dvou populací vyšel signifikantní Wilcoxonův test na bottleneck, což by mohlo vysvětlit deficit heterozygotů aspoň u těchto populací. U laboratorních populací vyšel Wilcoxonův test signifikantní pro 7 populací z 10, což je typickým jevem v umělých chovech tohoto typu. Pozorovaná heterozygotnost mezi populacemi se pohybovala v rozmezí 0,087 - 0,346 a nikdy nebyla vyšší jak očekávaná heterozygotnost. Oproti tomu Jung et al. (2010) pozorovali heterozygotnost háďátka borového (*Bursaphelenchus xylophilus*) z Korejských populací v rozmezí 0,47059 - 0,77941. I přes takto velkou heterozygotnost byly tyto hodnoty menší než očekávaná heterozygotnost.

Pro celý soubor o 225 jedincích se vyskytlo 184 multilokusových genotypů. Z těchto 184 genotypů bylo 95,11 % unikátních, což je srovnatelné s 95,77 % zastoupením unikátních genotypů u populací chovaných v chovech.

Analýza molekulární variance (AMOVA) zjišťuje podíl variability mezi jednotlivými úrovněmi populační struktury a mezi populacemi. Byly celkem provedeny 3 různé analýzy na základě rozdělení populací podle obývaného biotopu, nadmořské výšky a geografického uspořádání populací. Jung et al. (2010) pozorovali rozdělení většiny variability uvnitř populací a stejně jako u našich tří analýz byla většina variability uvnitř populací. U uspořádání podle biotopu vyšla variabilita mezi rozdílnými biotopy 5 % a nebyla prokázána jako signifikantní. Signifikance nebyla prokázána mezi odlišnými nadmořskými výškami a geograficky oddělenými populacemi. Tyto výsledky naznačují na homogenitu všech populací.

Dále následoval Mantelův test pro posouzení, zda existuje korelace mezi geografickou a genetickou vzdáleností. Test nevyšel signifikantní ($p = 0,19$). Ve výsledném grafu je možno vidět, že se genetická vzdálenost nezvyšuje s geografickou vzdáleností, ale zůstává víceméně stejná. Široký rozptyl bodů v grafu nasvědčuje genetickému driftu.

Následující metodou Principal Coordinate Analysis (PCoA) byl sestaven graf z hodnot genetických vzdáleností (Nei, 1972). V grafu se shlukují geneticky příbuzné

populace k sobě. V naprosto ideálním případě by se populace shloučily do tří uskupení na základě geografické vzdálenosti. Mezi blízkými populacemi by mohl existovat genový tok, který by blízké populace vzájemně homogenizoval. Tato úvaha odporuje výsledku našeho testu, kdy se populace neshlukují vůbec kromě populací Halámky a Sušice, které jsou však od sebe vzdáleny 115 km. Tento výsledek nám jen potvrdil předchozí Mantelův test a analýzu molekulární variance.

V programu Populations (Langela, 1999) byla provedena shluková analýza z genetických vzdáleností (Nei, 1972). Výsledný dendogram byl vytvořen Neighbour joining (NJ) metodou s bootstrapem o 1000 opakováních. Shluky opět neodpovídají geografickému uspořádání. Populace Halámky a Sušice zde vyšly seskupeny jako ve výsledku předešlé metody PCoA. Podpora jednotlivých větví je velmi nízká.

V programu STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) byly spuštěny 4 modely pro zjištění vhodného ΔK (počet seskupení populací). Internetovým programem STRUCTURE HARVESTER (Earl a vonHoldt, 2012) byly výsledky převedeny do grafu. Pro modely admixture - independent a nonadmixture - independent vyšlo K = 3 a pro modely admixture - correlated a nonadmixture - correlated vyšlo K = 4. Podle čárových grafů jsou populace rozděleny stejně při každém modelu. Opět je potvrzena absence vztahu genetické vzdálenosti s geografickou vzdáleností. V čárovém grafu jsou si nejvíce podobny populace Halámky a Sušice, i když jsou každá v jiném kraji. Podobně na tom jsou v čárovém grafu populace Velký Bor a Lhota u Stříbra, podle grafu jsou si velmi podobné, ale geograficky jsou poměrně dost vzdálené.

Podle Blaxter et al. (1998) se kmen hlístice (Nematoda) dělí do pěti základních linií. Příklady druhů uvedené v úvodu této práce spadají do linie 4. a 5. Samotná *Steinernema affine* patří do 4. linie společně s druhy *Bursaphelenchus xylophilus a Strongyloides ratti*. Druhy *Caenorhabditis elegans, Teladorsagia circumcineta* a *Haemoconchus contortus* patří do 5. linie. Jelikož bylo na výběr z druhů mnohem příbuznějších naší hlístici, byla z porovnávání 5. linie vynechána.

Studie od Jung et al. (2010) se zabývala háďátkem borovým *Bursaphelenchus xylophilus* na území Jižní Korey, Japonska a Číny. Pozorovaná heterozygotnost byla stejně jako u našich populací nižší než očekávaná. V našem případě dosahovala H_O mnohem menších hodnot (0,087 - 0,346), zatímco u háďátka borového dosahovala hodnot mnohem vyšších (0,47059 - 0,77941). Korelace geografické a genetické vzdálenosti u Korejských

populací nebyla zjištěna, stejně tak jako nebyla zjištěna u našich populací. Genetická variabilita Korejských populací byla z valné většiny uvnitř populací (91 %), zatímco mezi populacemi rozdělenými podle geografie byla variabilita minimální a nesignifikantní, podobně jako v naší práci. Mallez et al. (2015) provedli studii také na háďátku borovém, avšak na Izolaci vzdáleností jim vyšel signifikantní. Nutno však dodat, že velké množství lokusů bylo monomorfních (Portugalsko - 15 z 16, Japonsko 10 z 16), což by mohlo být způsobeno nedávnou kolonizací areálu velmi malou populací. Háďátko *Bursaphelenchus xylophilus* je narozdíl od námi studované hlístovky parazitem borovic. K napadení stromu potřebuje háďátko hmyz, který slouží jako přenašeč. Tato skutečnost se podepisuje na genetické variabilitě druhu. Háďátko se totiž musí před opuštěním stromu včas uchytit na ještě zakukleném hmyzu, aby jej přeneslo dál. Šance na proniknutí do stromu není 100 %. Tyto dva faktory způsobují silný genetický drift, což se promítá do genetické struktury druhu (Mallez et al., 2015).

Fisher a Viney (1998) provedli populačně genetickou analýzu parazitické hlístice krys *Strongyloides ratti* z 10ti populací. Pozorovaná heterozygotnost dosahovala hodnot v rozmezí od 0,074 po 0,379, což je velmi podobné s rozmezím pozorované heterozygotnosti u našich populací *Steinernema affine* (0,087 - 0,346). Pozorovaná heterozygotnost byla menší v 6ti populacích z 10ti, což je mnohem lepší výsledek než v našich populacích, kde pozorovaná heterozygotnost byla menší ve všech populacích. Variabilita byla rozdělena uvnitř populací (73 %), mezi jednotlivými subpopulacemi v krysách (25 %) a mezi geografickými umístěními (2 %).

V těchto studiích můžeme vidět několik podobností. Příkladem je častá nižší pozorovaná heterozygotnost, či podobná struktura genetické variability. Přesného porovnání je ale těžko docílit, z důvodu rozdílných způsobů života. Entomopatogenní hlístovky jsou v kmeni Nematoda svou patogenitou vůči hmyzu unikátní, a proto je těžké srovnávat i blízké druhy.

6. Závěr

Podařilo se provést populačně genetickou analýzu 8mi přírodních populací entomopatogenních hlístovek *Steinernema affine*. U všech populací byla zjištěna poměrně vysoká genetická variabilita, přičemž se tyto populace jevily jako velmi diferencované, bez známek genového toku.

Závislost mezi geografickou a genetickou vzdáleností nebyla potvrzena ani jednou analýzou. Stejně tak nebyl prokázán vliv podobných habitatů na genetickou příbuznost. Jedná se nejspíše o populace bez genového toku mezi sebou, kde hlavní vliv na genetickou variabilitu mají mutace a náhodný genetický drift.

Otázkou pro další výzkum je velké množství homozygotů. I když z celkového souboru dat bylo nulových alel nepatrné množství, nelze vyloučit možnost přítomnosti nulových alel skrytých mezi homozygoty. Vysoké hodnoty F_{IS} naznačují, že by mohlo docházet k častému příbuzenskému křížení, nejspíše díky demografickým změnám.

7. Literatura:

Půža V., Mráček Z. (2007). Natural population dynamics of entomopathogenic nematode *Steinernema affine* (*Steinernematidae*) under dry conditions: Possible nematode perzistence within host cadavers? *Journal of invertebrae Pathology 96, 89 -92.*

Johingk S.-A., Ehlers R.-U. (1999). Endotokia matricida in hermaphrodites of *Heterorhabditis* spp. and the effect of the food supply. *Nematology 1, 717 - 726.*

Goodrich - Blair H., Clarke D.J., (2007). Mutualism and pathogenesis in *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: two roads to the same destination. *Molecular Microbiology 64, 260 - 268.*

Nermuť J., Půža V., Mráček Z. (2012). Entomopatogenní a moluskoparazitické hlístice - neviditelní půdní zabijáci. *Živa 1, 10 - 13.*

Griffin C. T., Boemare N. E., Lewis E. E. (2005). Biology and behaviour. In: Grewal P. S., Ehlers R.-U., Shapiro - Ilan D. I. Nematodes as biocontrol agents. *CABI Publishing, US,. 47 - 64.*

Lacey L. A., Grzywacz D., Shapiro - Ilan D. I., Frutos R., Brownbridge M., Goettel M. S. (2015). Insect pathogens as biocontrol agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology 132, 1 - 41.*

Gumus A., Karagoz M., Shapiro - Ilan D., Hazir S. (2015). A novel approach to biocontrol: Release of live insect hosts preinfected with entomopathogenic nematodes. *Journal of Invertebrate Pathology 130, 56 - 60.*

Georgis R., Koppenhöfer A.M., Lacey L. A., Bélair G., Duncan L. W., Grewal P. S., Samish M., Tan L., Torr P., van Tol R. W. H. M. (2006). Successes and failures in the use of parasitic nematodes for pest control. *Biological control 32, 203 - 123.*

Koppenhöfer A. M., Fuzy E. M. (2007). Soil moisture effects on infectivity and persistence of the entomopathogenic nematodes *Steinernema scarabaei, S. glaseri, Heterorhabditis zelandica, and H. bacteriophora*. *Applied Soil Ecology 35, 128 - 139.*

Chaston J.M., Suen G., Tucker S. L., Andersen A. W., Bhasin A., et al. (2011). The Entomopathogenic Bacterial Endosymbionts *Xenorhabdus* and *Photorhabdus*: Convergent Lifestyles from Divergent Genomes. PLoS ONE 6

Dix I., Burnell, A. M., Griffin C. T., Joyce S. A., Nugent J. M. (1992). The identification of biological species in the genus Heterorhabditis (Nematoda: Heterorhabditidae) by cross breeding second-generation amphimictic adults. *Parasitology 104, 509–518.*

Poinar G. O. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhabditidae (1990). In: Gaugler, R. and Kaya, H.K. Entomopathogenic nematodes in biological control. *CRC Press, Boca Raton, Florida, 23–61.*

Miles C., Blethen C., Gaugler R., Shapiro - Ilan D., Murray T. (2012). Using Entomopathogenic Nematodes for Crop Insect Pest Control. *A Pacific Northwest Extension publication, PNW 544.*

Peakall R., Smouse P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update.

Lewis E. E., Campbell J., Griffin Ch., Kaya H., Peters A. (2006). Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biological control 38, 66 - 79.*

Peakall, R. and Smouse P.E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes. 6, 288-295.*

Chae S. S., Warde W. D. (2006). Effect of using principal coordinates and principal components on retrieval of clusters**.** *Computational Statistics & Data Analysis 50, 1407 - 1417.*

van Oosterhout C., Hutchinson W. F., Wills D. P. M., Shipley P. (2006). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes 4, 535 - 538.*

Rousset, F. (2008). Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources 8: 103-106.*

Boemare N. E., Akhurst R. J., Mourant R. G. (1993). DNA Relatedness between Xenorhabdus spp. (Enterobacteriaceae), Symbiotice Bacteria of Entomopathogenic

Nematodes, and a Proposal To Transfer Xenorhabdus luminescens to a New Genus, Photorhabdus gen. nov. *International Journal of Systemtic Bacteriology 43, 249 - 255.*

Sunnucks P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *TREE 15, 199 - 203.*

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

Hallem E. A., Dillman A. R., Hing A. V., Zhang Y., Yano J. M., DeMarco S. F., Sternberg P. W. (2011). A Sensory Code for Host Seeking in Parasitic Nematodes. *Current Biology 21, 377 - 383.*

Luikart G., England P. R. (1999). Statistical analysis of microsatellite DNA data. *TREE 14, 253 - 255.*

Li Y., Korol A. B., Fahima T., Nevo E. (2004). Microsatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution**.** *Molecular Biology and Evolution 21, 991 - 1007.*

Jarne P., Lagoda P. J. L. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *TREE 11, 424 - 429.*

Hedrick P. W. (1999). Perspective: Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution 53, 313 - 318.*

Maglécz E., Anderson S. J., Bourguet D., Butcher R., Caldas A., Cassel-Lundhagen A., d´Acier A. C., Dawson D. A., Faure N., Fauvelot C., Franck P., Harper G., Keyghobadi N., Kluetsch C., Muthulakschmi M., Nagaraju J., Patt A., Péténian F., Silvain J. F., Wilcock H. R. (2007). Microsatellite flanking region similarities among different loci within insect species. *Insect Molecular Biology 16, 175 - 185.*

Temperley N. D., Webster L. M. I., Adam A., Keller L. F., Johnson P. C. D. (2009). Cross-Species Utility of Microsatellite Markers in Trichostrongyloid Nematodes. *Journal of Parasitology 95, 487 - 489.*

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

Rousset, F., (2008). Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources 8, 103-106.*

Piry, S., Luikart, G., Cornuet, J.-M., (1999). BOTTLENECK : A program for detecting recent effective population size reductions from allele data frequencies. (http://www1.montpellier.inra.fr/CBGP/software/Bottleneck/bottleneck.html), staženo: 10. 4. 2017.

Malan A. P., Moore S. D. (2011). Isolation and identification of entomopathogenic nematodes from citrus orchards in South Africa and their biocontrol potential against false codling moth. *Journal of Invertebrate Pathology 108, 115 - 125.*

Stuart R. J., Barbercheck M. E., Grewal P. S., Taylor R. A. J., Hoy C. W. (2006). Population biology of entomopathogenic nematodes: Concepts, issues, and models. *Biological Control 38, 80 - 102.*

Mráček Z., Bečvář S., Kindlmann P., Jersáková J. (2005). Habitat preference for entomopathogenic nematodes, their insect hosts and new faunistic records for the Czech Republic. *Biological Control 34, 27 - 37.*

Excoffier L., Lischer H.E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources. 1, 564-567.*

Nei M. (1972). Genetic distance between populations. *The American Naturalist 106, 283 - 292.*

Langella O. (1999). Populations 1.2.31: Population genetics software. (http://bioinformatics.org/populations/#ancre_fonctionnalites), staženo: 10. 4. 2017

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

Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data, *Genetics 155, 945 - 959.*

Rašková M. (2015). Použití mikrosatelitních markerů u populací entomopatogenních hlístic rodu *Steinernema*. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita, pp. 39.

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.*

Yi F., Gasser R. B., Li F., Bao M., Huang W., Zou F., Zhao G., Wang Ch., Yang X., Zhou Y., Zhao J., Fang R., Hu M. (2016). Population structure of Haemonchus contortus from seven geographical regions in China , determined on the basis of microsatellite markers. *Parasites & Vectors 9.*

Silvestre A., Sauve C., Cortet J., Cabaret J. (2009). Contrasting genetic structures of two nematodes, determined on the basis of neutral microsatellite markers and selected anthelmintic resistance markers. *Molecular Ecology 18, 5086 - 5100.*

Cox A. J., Hebert P. D. N. (2001). Colonization, extinction, and phylogeographic patterning in freshwater crustacean, *Molecular Ecology 10, 371 - 386.*

Půža V., Nermuť J. (2015). Entomopathogenic nematodes in the Czech Republic: diversity, occurrence and habitat preferences. In: Campos-Herrera R. (ed.) Nematode pathogenesis of insects and other pests - ecology and applied technologies for sustainable plant and crop protection, *Springer International Publishing Switzerland, 419-429*.

Hominick W.M. (2002). Biogeography. In: Gaugler R. (Ed.), Entomopathogenic nematology, *CABI publishing, Wallingford, Oxon, UK,. 115–137.*

Haber M., Schüngel M., Putz A., Müller S., Hasert B., Schulenburg H. (2005): Evolutionary History of *Caenorhabditis elegans* Inferred from Microsatellites: Evidence for Spatial and Temporal Genetic Differetiation and the Occurence of Outbreeding. *Molecular Biology and Evolution 22, 160 - 173.*

Grillo V., Jackson F., Cabaret J., Gilleard J. S. (2007): Population genetic analysis of the ovine parasitic nematode Teladorsagia circumcincta and evidence for a cryptic species. *International Journal for Parasitology 37, 435 - 447.*

Armstrong R.A. (2014). When to use Bonferroni correction. *Opthalmic & Physiological Optics 34, 502 - 508.*

Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A.,Kumar S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution 30,2725-2729*

Kamvar Z. N., López-Uribe M. M., Coughlan S., Grünwald N. J., Lapp H., Manel S. (2016). Developing educational resources for population genetics in R: An open and collaborative approach. *Molecular Ecology Resources 17, 120 - 128.*

Weir B. S., Cockerham C. C. (1984). Estimating F - Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution 38, 1358 - 1370.*

Kamvar Z. N., Tabima J. F., Grünwald N. J. (2014). *Poppr*: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partialy clonal, and/or sexual reproduction**.** *PeerJ 2*

Jung J., Han H., Ryu S. H., Kim W. (2010). Microsatellite variation in the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus* (Teiner and Buhrer) Nickle in South Korea. *Genes & Genomics32, 151 - 158.*

Wang H., Jung Y. H., Son D., Choo H. Y. (2013). High level of genetic diversity among *Steinernema monticolum* in Korea revealed by single-enzyme amplified fragment lenght polymorphism. *Journal of Invertebrate Pathology 113, 146 - 151.*

Mueller U.G., Wolfenbarger L.L. (1999). AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in Ecology and Evolution 14, 389–394.*

Mallez S., Castagone Ch., Espada M., Vieira P., Eisenback J. D., Harrel M., Mota M., Aikawa T., Akiba M., Kosaka H., Castagone-Sereno P., Guillemaud T. (2015). Worldwide invasion routes of pinewoode nematode:What can we infer from population genetics analyses? *Biological Invasions17, 1999 - 1213.*

Blaxter M. L., De Ley p., Garey J. R., Liu L. X., Scheldeman P., Vierstraete A., Vanfleteren J. R., Mackey L. Y., Dorris M., Frosse L. M., Vida J. T., Thomas K. (1998). A molecular evolutionary framework for the phylum Nematoda. *Nature 392, 71 - 75.*

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

Fisher M. C., Viney M. E. (1998). The population genetic structure of the facultatively sexual parasitic nematode *Strongyloides ratti* in wild rats. *Proceedings of the Royal Society B 265, 703 - 709.*

Takezaki N., Nei M. (2008). Empirical Tests of the Reliability of Phylogenetic Trees Constructed with Microsatellite DNA. *Genetics 178, 385 - 392.*

8. Přílohy

Seznam příloh:

Příloha 1: Výsledky testu na vazebnou nerovnováhu

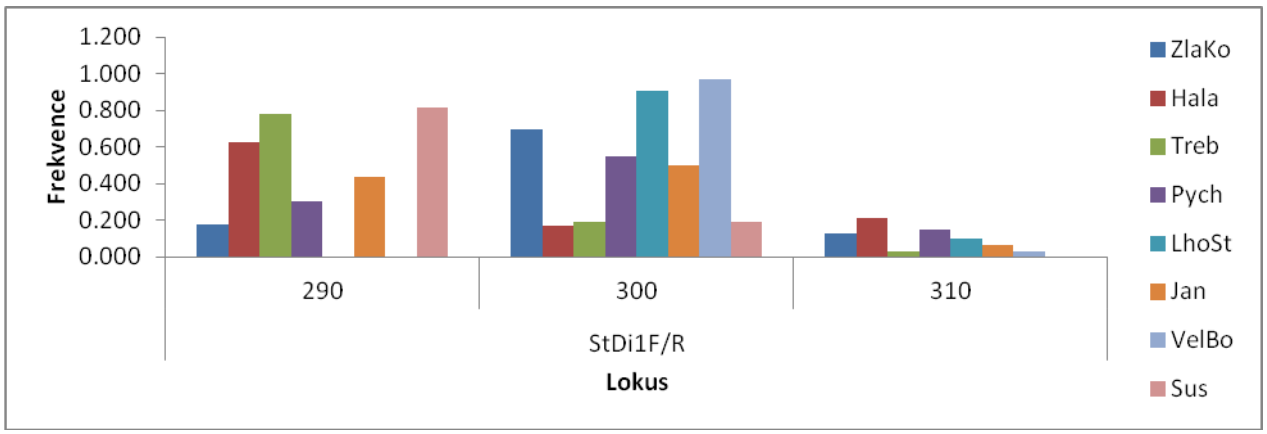
Příloha 2: Grafy četností alel pro jednotlivé lokusy.

Příloha 1: Kombinace párů lokusů a výsledky pro test na vazebnou nerovnováhu.

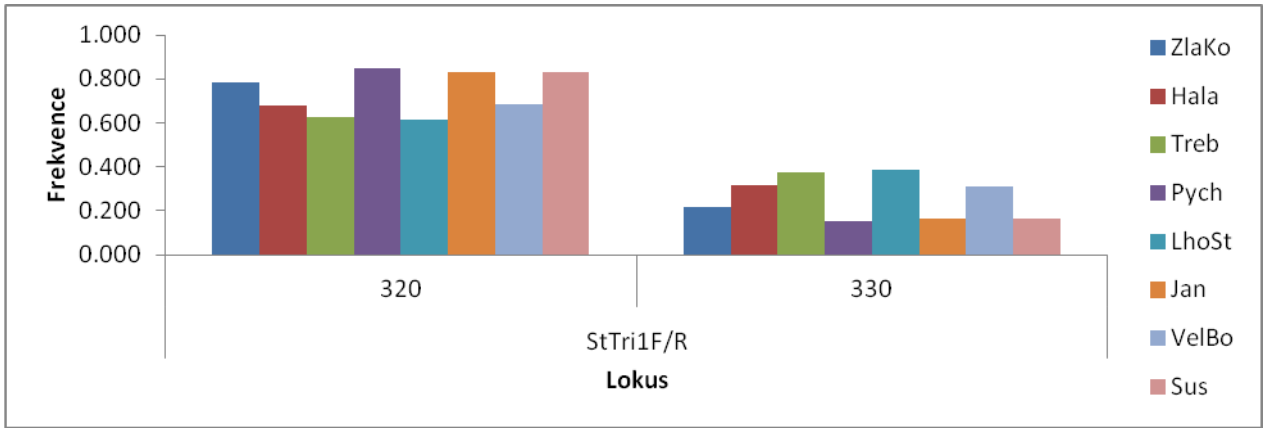
Kombinace lokusů	P	Bonferroniho korekce
StDi1 x StTri1	0.015276	0.0179
StDi1 x StTri2	0.112929	0.0227
StTri1 x StTri2	0.003195	0.0185
StDi1 x StTri4	0.195538	0.0238
StTri1 x StTri4	0.984073	0.25
StTri2 x StTri4	0.843683	0.125
StDi1 x StTri10	0.776248	0.1
StTri1 x StTri10	0.202712	0.025
StTri2 x StTri10	0.707735	0.0556
StTri4 x StTri10	0.325026	0.0313
StDi1 x StDi8	0.740175	0.0714
StTri1 x StDi8	0.612381	0.0455
StTri2 x StDi8	0.424097	0.0385
StTri4 x StDi8	0.088444	0.02
StTri10 x StDi8	0.674797	0.05
StDi1 x StTri9	0.274011	0.0263
StTri1 x StTri9	0.292249	0.0278
StTri2 x StTri9	0.316358	0.0294
StTri4 x StTri9	0.106335	0.0217
StTri10 x StTri9	0.093069	0.0208
StDi8 x StTri9	0.352439	0.0357
StDi1 x StTri7	0.920696	0.1667
StTri1 x StTri7	0.755593	0.0833
StTri2 x StTri7	0.32611	0.0333
StTri4 x StTri7	0.048289	0.0192
StTri10 x StTri7	0.998508	0.5
StDi8 x StTri7	0.583142	0.0417
StTri9 x StTri7	0.720244	0.0625

Příloha 2 a - h: Grafy alelových frekvencí v jednotlivých lokusech. Zkratky jednotlivých populací viz Tabulka 1.

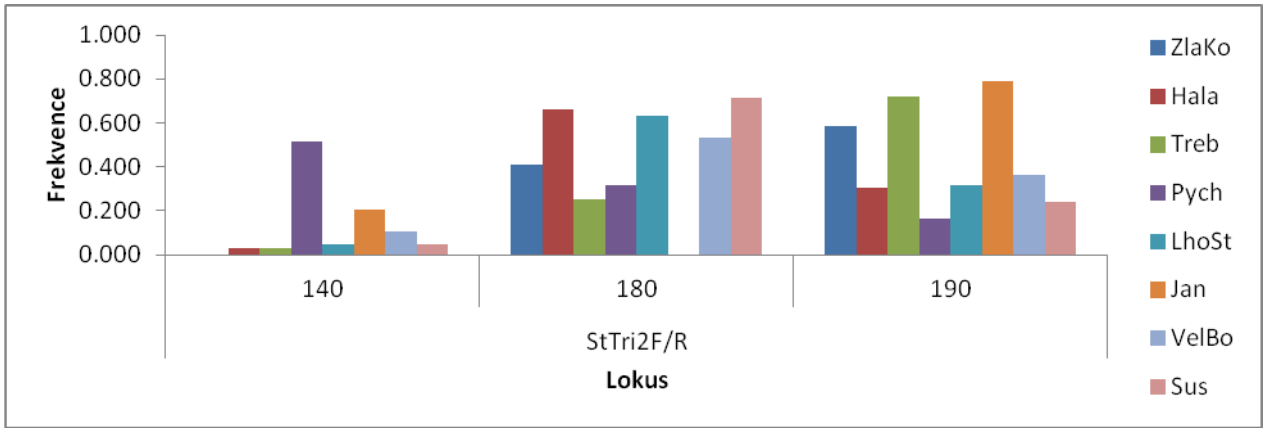
Příloha 2a: Lokus *StDi1*.



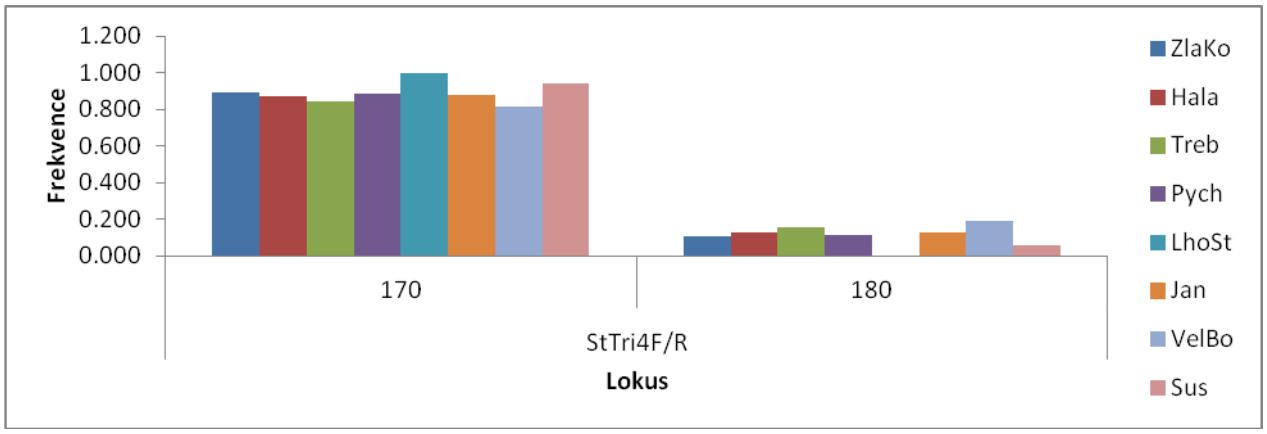
Příloha 2b: Lokus *StTri1*.



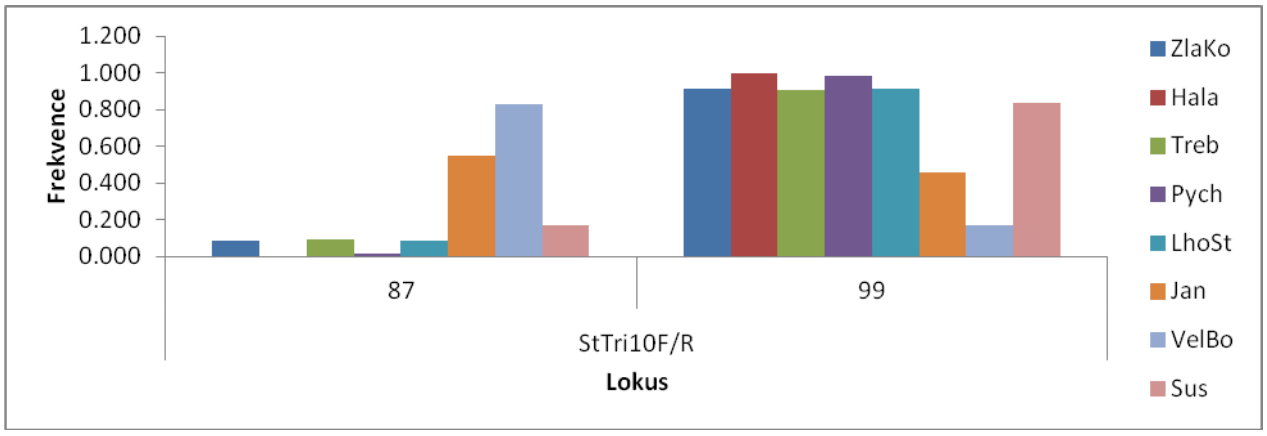
Příloha 2c: Lokus *StTri2*.



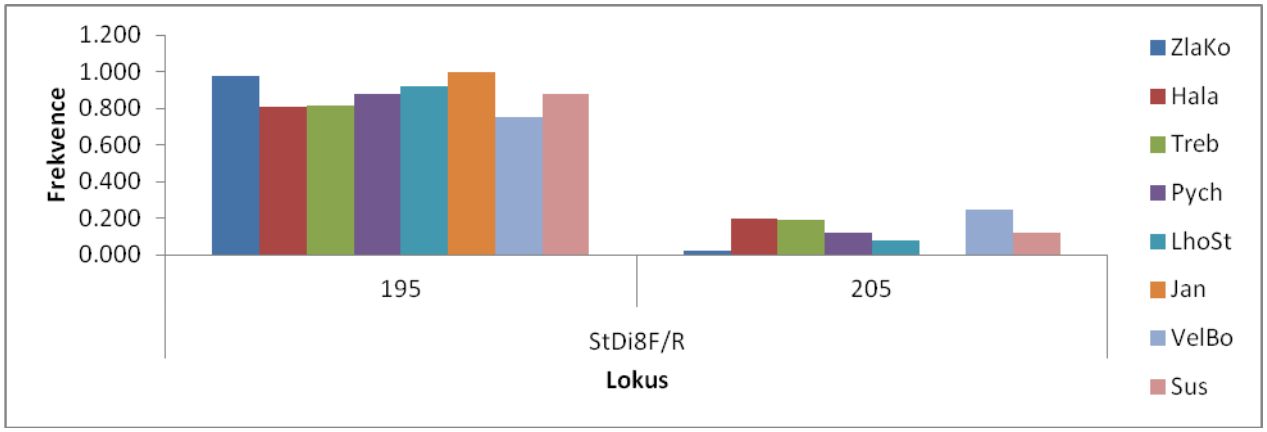
Příloha 2d: Lokus *StTri4*.



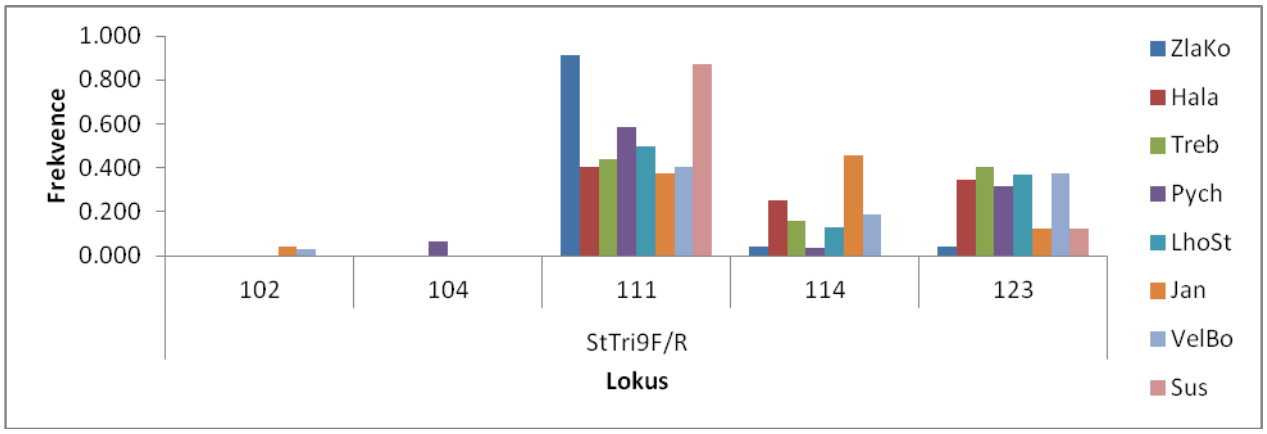
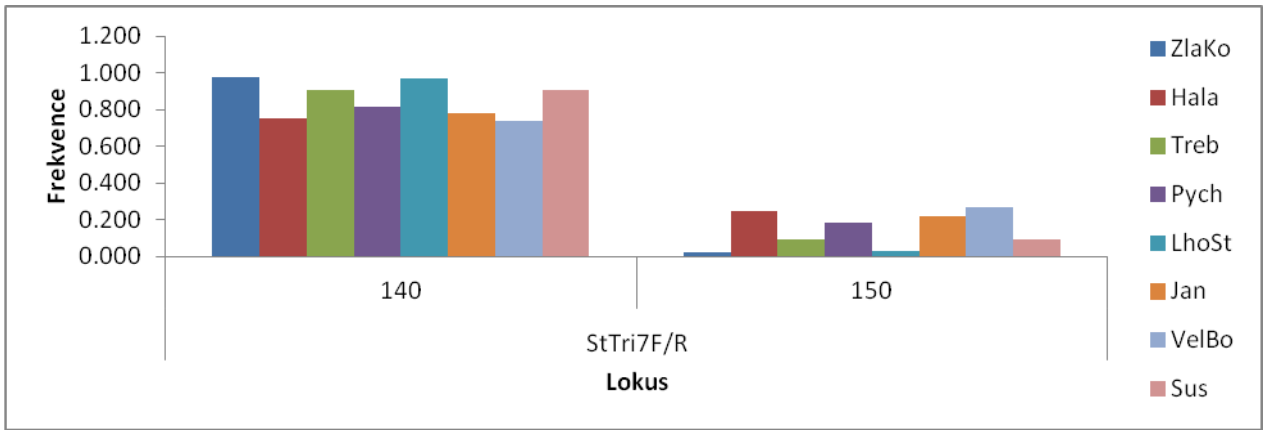
Příloha 2e: Lokus *StTri10*.



Příloha 2f: Lokus *StDi8*.



Příloha 2g: Lokus *StTri9*.



Příloha 2h: Lokus *StTri7*.